

ANEXO A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE  
LA LÍNEA CELULAR “*HVR-3*” EN EL BANCO  
NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES.

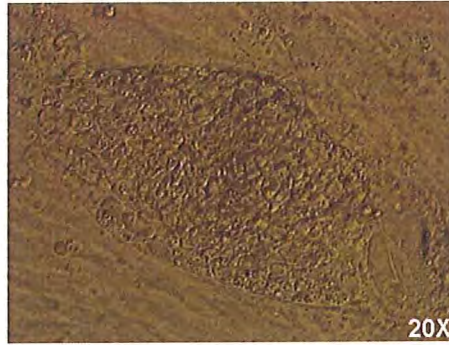
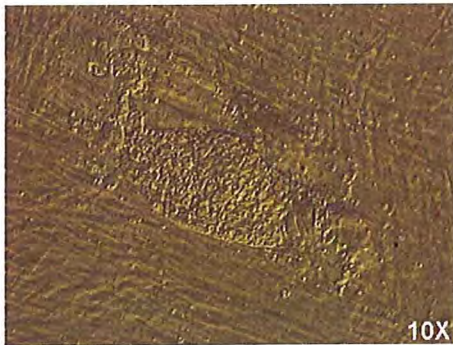
## **I- Derivación**

La línea fue derivada de un preembrión descartado para su transferencia en un ciclo de PGD, ya que uno de sus progenitores es portador de Hemofilia B. El proceso de descongelación y aislamiento de la masa celular interna se detallan en el documento de trazabilidad de la línea.

## **II- Cultivo y Pases**

Una vez sembrado el blastocisto y tras doce días de cultivo se realizó el primer pase utilizando como soporte celular fibroblastos fetales humanos inactivados.

Para asegurar el mantenimiento de la línea, además de realizar semanalmente un pase mecánico se congela 1 a 3 viales de la línea. Actualmente, la línea se encuentra en pase 55.



*Aspecto de la Masa Celular Interna (MCI) de HVR-3 tras 6 días en cultivo.*

## **III- Caracterización de HVR-3**

### **III.1- Fenotipo:**

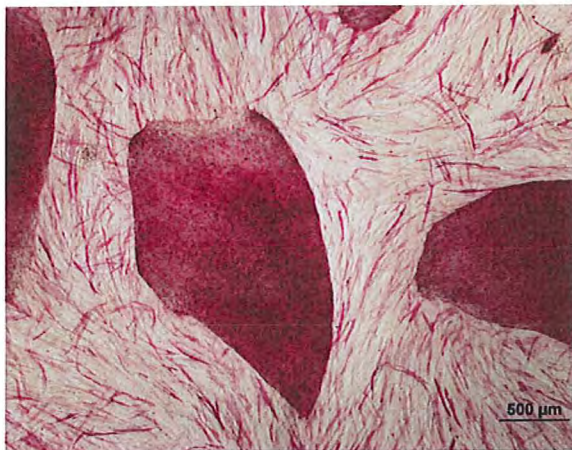
La línea presenta una morfología de colonia indiferenciada. Morfología característica de células madre: colonias aplanadas, translúcidas y con bordes definidos, con células homogéneamente dispuestas en monocapa, y ratio núcleo/citoplasma elevado



*Imagen estereomicroscópica de una colonia de CTE HVR-3 sobre fibroblastos humanos (HEFs) inactivados con mitomicina C.*

### III.2- FA:

La tinción para fosfatasa alcalina (Stemgent Alkaline Phosphatase Staining Kit II) nos muestra una colonia teñida de color rosa violáceo indicador del estado de no diferenciación de las CTEs.



*Tinción fosfatasa alcalina positiva de colonias de hCTEs en cultivo sobre HEFs y una colonia de hCTEs sobre Matrigel.*

### III.3- Marcadores de pluripotencialidad:

La expresión de los marcadores se analizó mediante las siguientes técnicas de Biología Molecular:

#### III.3.1- RT-PCR.

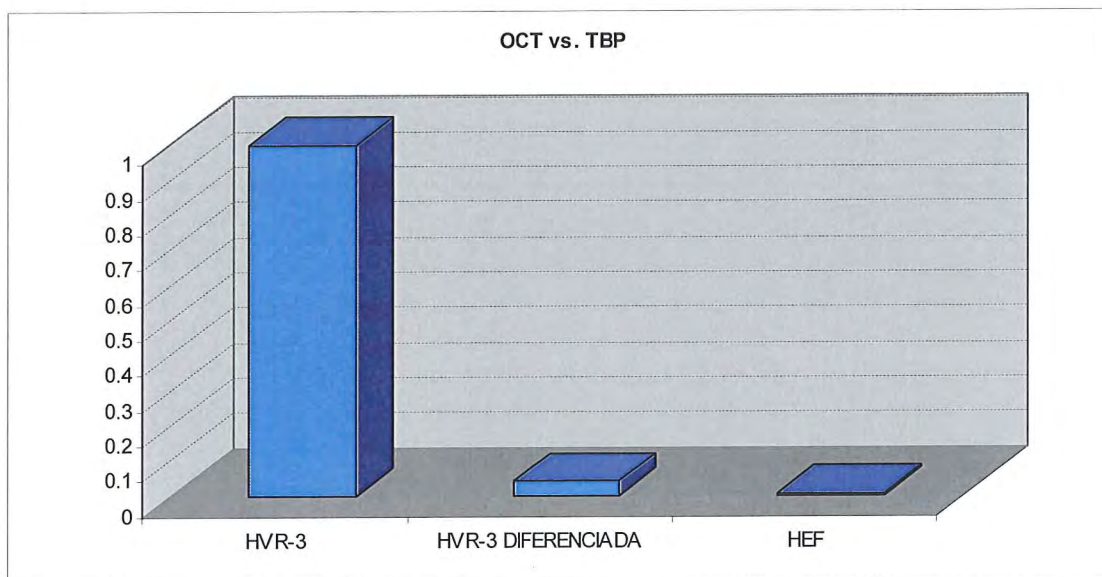
Se realizaron RT-PCR de los marcadores de no diferenciación Oct, Sox2, Nanog, Tert y utilizando como control  $\beta$ -actina.



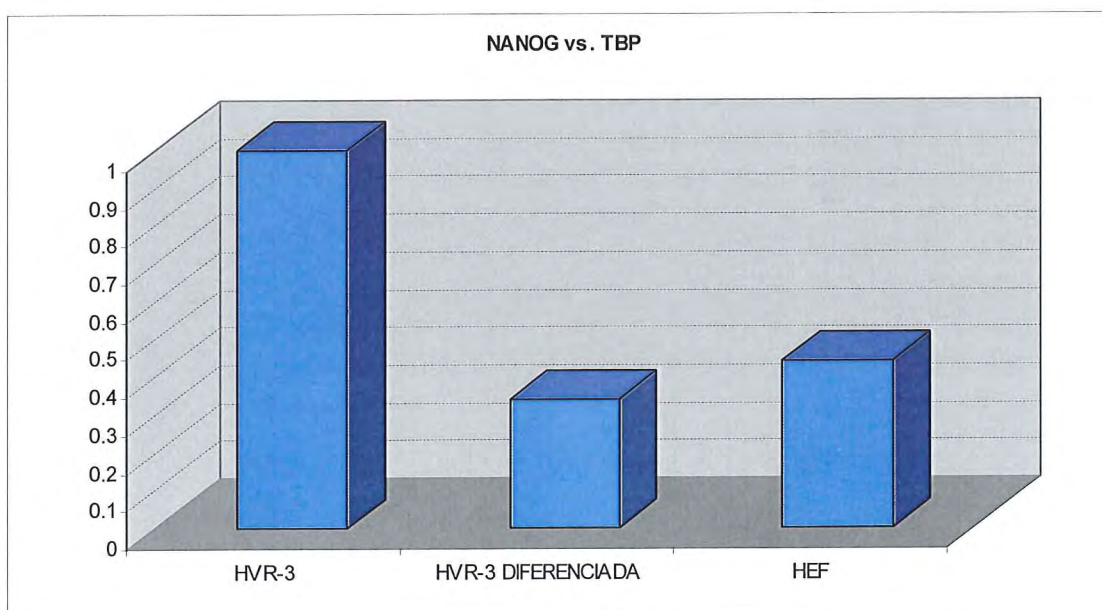
*Detección de expresión de marcadores de no diferenciación Oct, Sox2, Nanog, Tert y  $\beta$ -actina en la línea de hCTEs mediante RT-PCR.*

### III.3.2- Real Time PCR

Se realizó qPCR de los marcadores de no diferenciación Oct y Nanog utilizando como control TBP



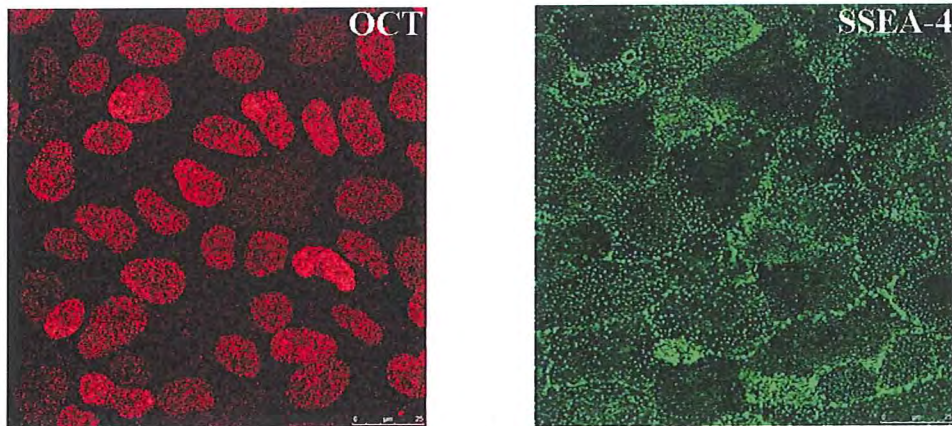
*Estudio por qPCR que muestra los niveles relativos de expresión de Oct. El análisis está basado en el método DDCT y corregido sobre la expresión de TBP*



*Estudio por qPCR que muestra los niveles relativos de expresión de Nanog. El análisis está basado en el método DDCT y corregido sobre la expresión de TBP*

### III.3.3- Inmuno

Se ha analizado la expresión de antígenos de superficie así como nucleares empleando técnicas de inmunofluorescencia, utilizándose anticuerpos monoclonales SSEA4, TRA-1-60 y TRA-1-81 (de superficie) y Oct-4 (nuclear) sobre células crecidas en cultivo. Todos ellos dieron marcaje positivo.

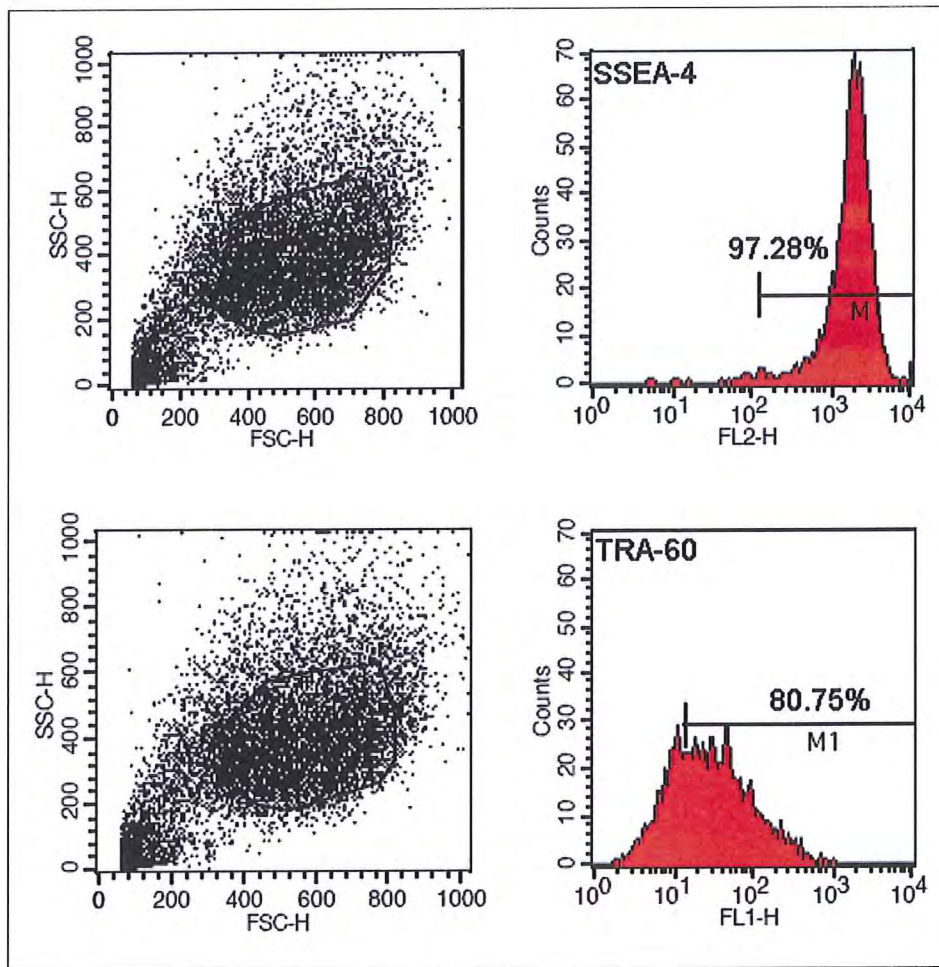


*Detección por Inmunofluorescencia los marcadores de no-diferenciación Oct-4 y SSEA-4*

### III.4- Citometría

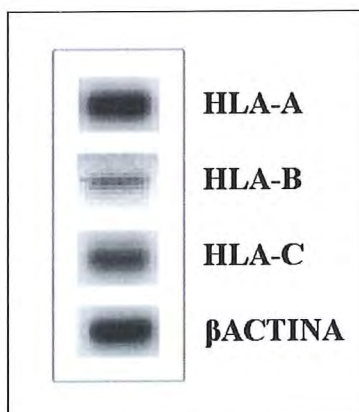
Antígeno	%
SSEA-4	97.27 ± 1.13 (n=4)
TRA-1-60	80.75±17.59 (n=5)

*Análisis de citometría de flujo de marcadores de no-diferenciación*

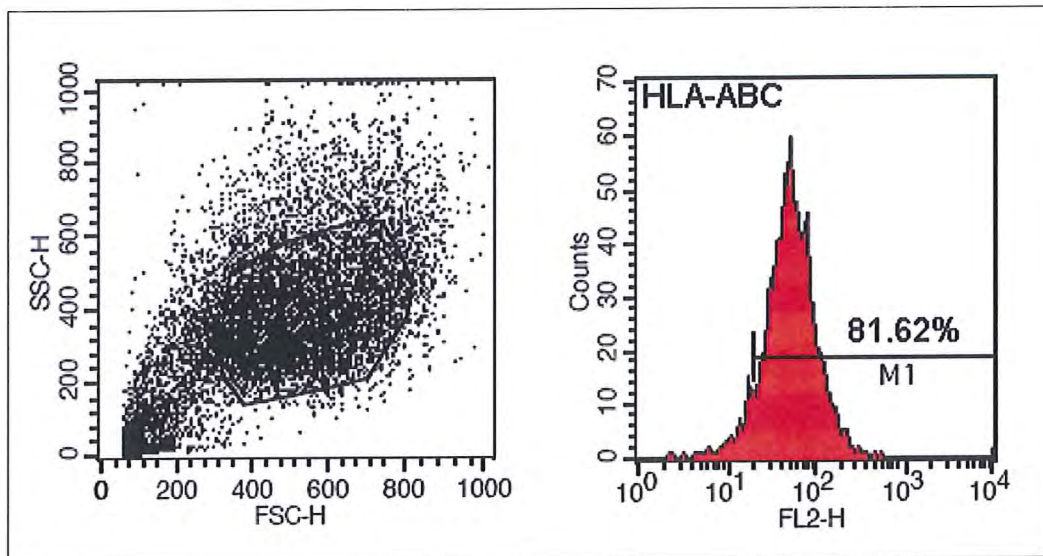


*Histogramas de citometría de flujo de marcadores de no diferenciación*

### III.5- Expresión HLA



*Expresión de los distintos isotipos HLA por RT-PCR.*

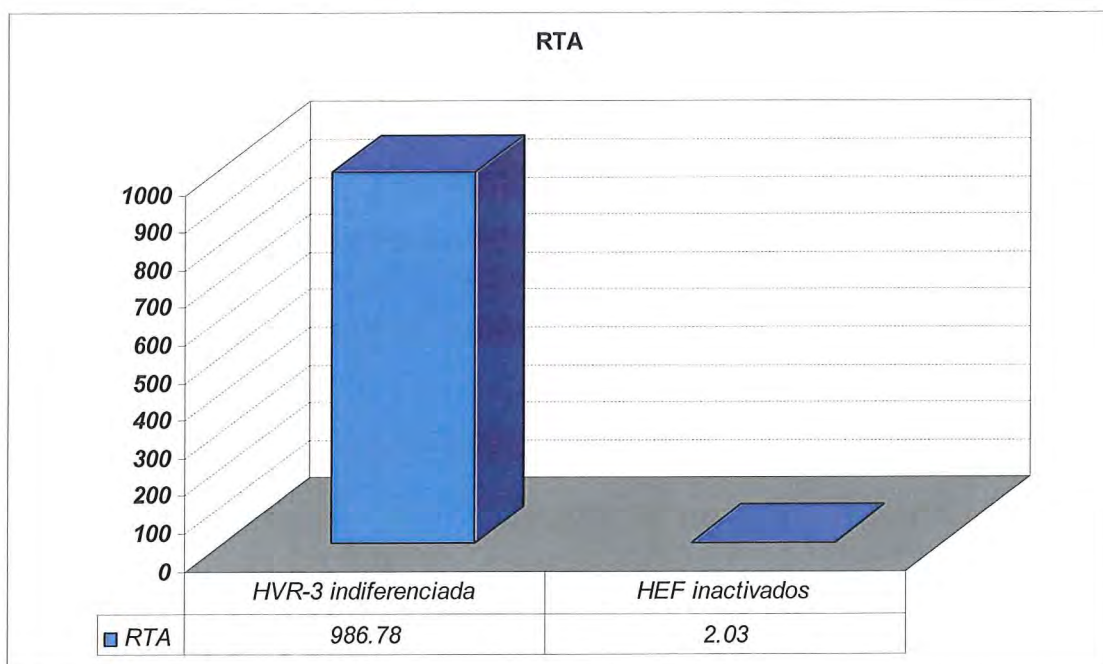


Antígeno	%
HLA-ABC	81.62 ± 16.94 (n=2)

*Histogramas y Análisis de citometría de flujo de marcadores de HLA-ABC*

**III.6- Determinación de la actividad telomerasa**

La detección de la actividad telomerasa característica de células inmortales se ha realizado mediante una reacción de PCR utilizando un kit específico (Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup>, Roche). El análisis de la actividad telomerasa se realizó sobre células intactas de HVR-3 indiferenciadas en pase 20 y diferenciadas en pase 31 (tras la formación de cuerpos embrionarios en placas AggreWell) y sobre fibroblastos embrionarios humanos inactivados con mitomicina C (n=2).



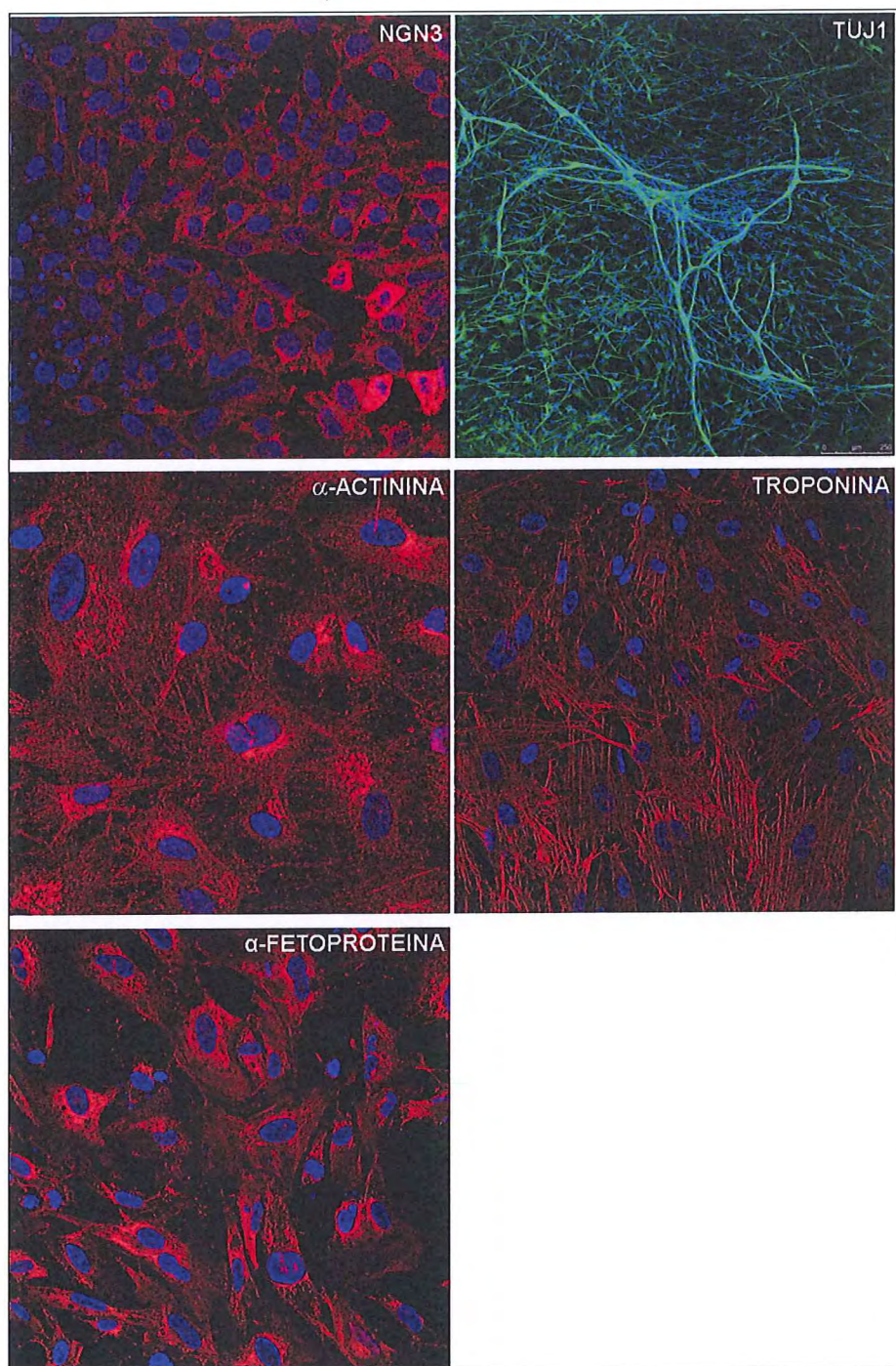
### **III.7- Diferenciación *in vitro***

Se llevó a cabo un protocolo de diferenciación espontánea mediante la formación de cuerpos embrionarios siguiendo dos protocolos:

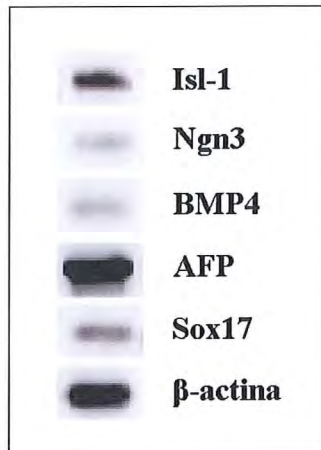
- en gota pendiente durante 2 días, seguido del cultivo en placa de baja adherencia durante 14 días. Se realizó cambio de medio en días alternos con medio KSR sin bFGF.

- mediante el empleo de placa AggreWell (Stem Cell Technology) para la formación de cuerpos embrionarios. Para ello, se disgregaron las colonias con acutasa y tras el recuento celular se disponen en la placa durante 24 horas. A continuación se traspasan a una placa de baja adherencia y se continúa el cultivo empleando medio KSR sin bFGF. Se realiza cambio de medio en días alternos durante 14 días.





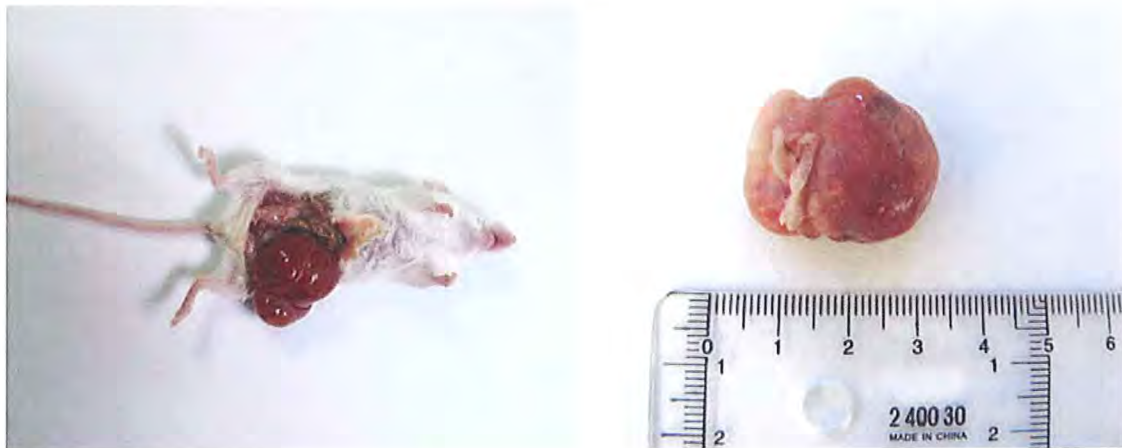
*Diferenciación in vitro a ectodermo (Células positivas para Ngn3 y Tuj1), a mesodermo (Células positivas para  $\alpha$ -actinina y troponina) y a endodermo (Células positivas para  $\alpha$ -fetoproteína)*



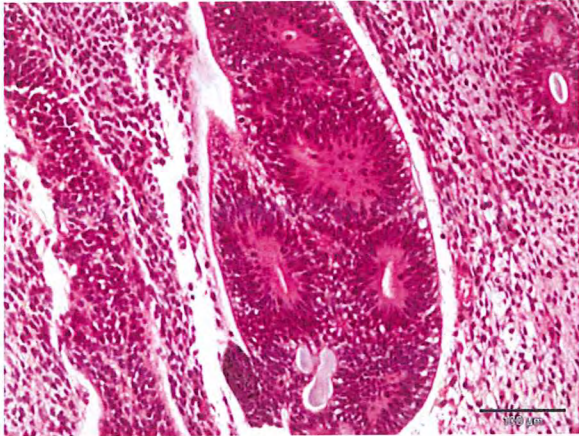
*Detección de los marcadores para las tres capas embrionarias en la línea de hCTEs mediante RT-PCR: endodermo ( $\alpha$ -fetoproteína y Sox17), ectodermo (Isl1 y Ngn3) y mesodermo (BMP4).  $\beta$ -actina como control interno*

### III.8- Diferenciación *in vivo*

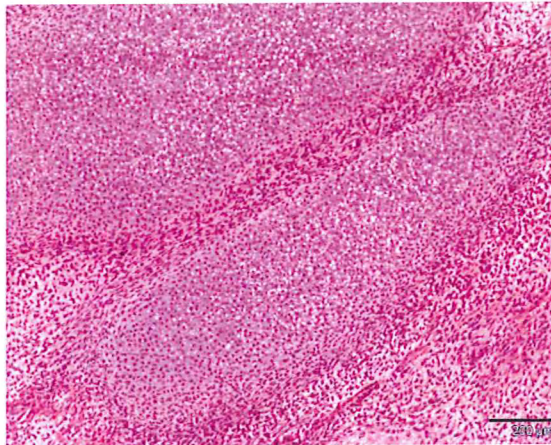
A las 6-8 semanas de inocular en testículo las CTEh indiferenciadas en 6 ratones inmunodeprimidos NOD-SCID Beige, se formaron teratomas en todos ellos. En los teratomas se observan los distintos componentes tisulares derivados de las distintas hojas embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo.



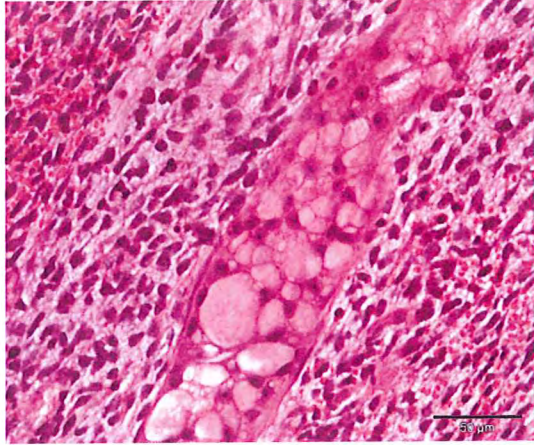
Se observa la existencia de rosetas neuronales originadas a partir de ectodermo y que darán lugar el tejido nervioso. También aparecen áreas de tejido cartilaginoso del mesodermo con condrocitos rodeados de matriz cartilaginosa y células grasas también procedente de mesodermo. Además, existen conductos formados por un epitelio cilíndrico ciliado, similar al que recubrirá las vías respiratorias y cuyo origen es el endodermo.



***Rosetas neuronales: ectodermo***



***Cartilago y células grasas: mesodermo***

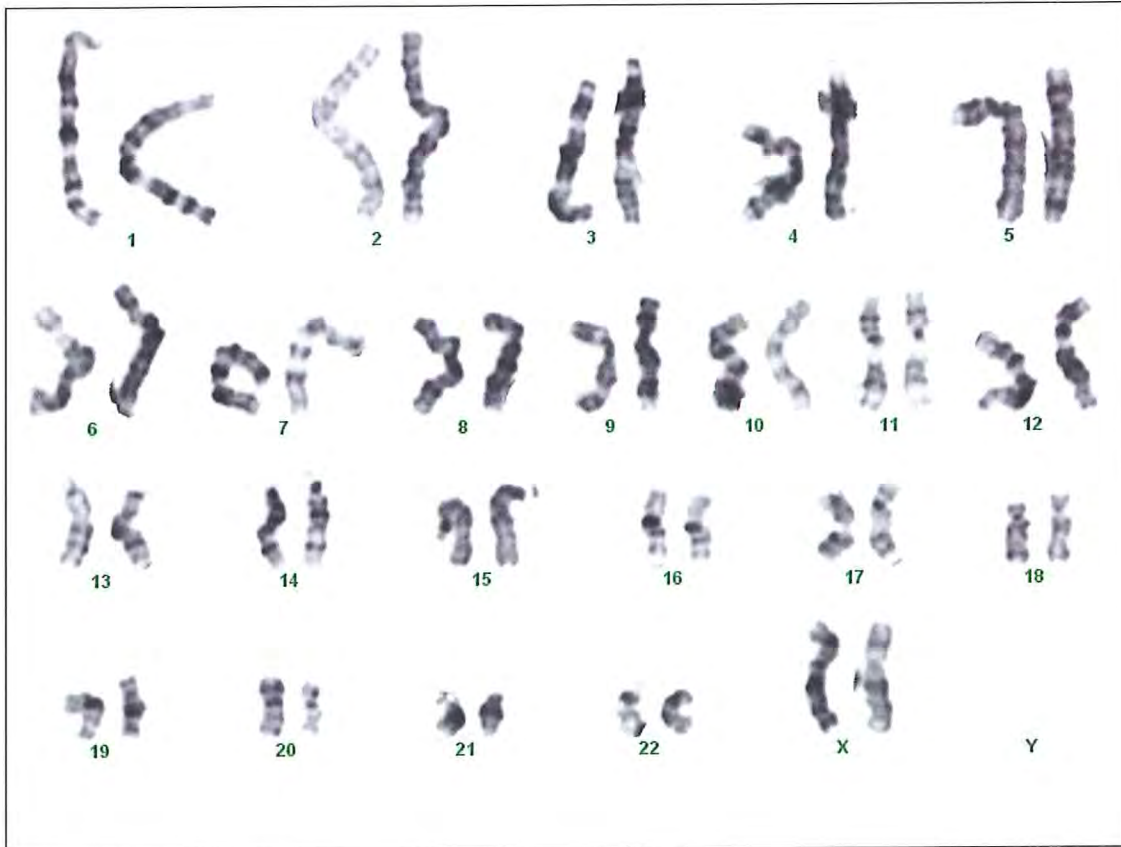


***Epitelio cilíndrico ciliado: endodermo.***

El estudio histológico se realizó en el laboratorio anatomopatológico veterinario anaPATH de Granada por la Dra Ana Nieto (Véase documento adjunto) y ha sido confirmado en la unidad de Apoyo de histología de CABIMER.

### **III.9- Estabilidad genética y Cariotipo:**

La línea presenta un cariotipo de hembra normal, 46XX.



*Cariotipo normal (46,XX).*

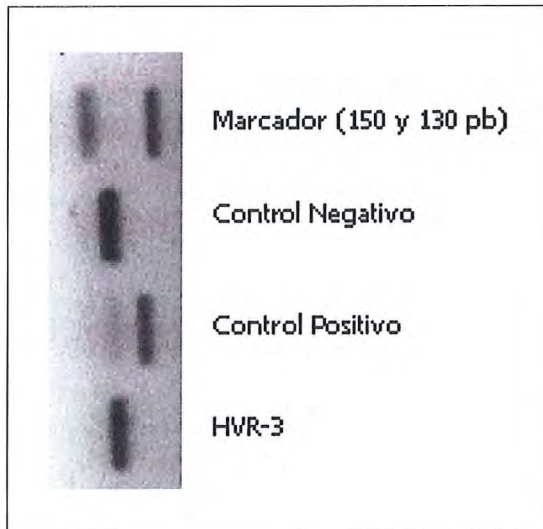
### **III.10- Control microbiológico:**

#### **1. Control de esterilidad:**

El ensayo de esterilidad se realiza en condiciones asépticas, pero las precauciones tomadas para evitar la contaminación no deben afectar a los microorganismos cuya presencia deba ponerse de manifiesto en el ensayo. Los medios de cultivo para el ensayo son medios comerciales a los que previamente se les ha realizado un control de esterilidad por lote recibido. Los medios utilizados en el ensayo de esterilidad son el caldo de tioglicolato, para la detección de bacterias anaerobias, aunque también permite detectar bacterias aerobias, y el caldo de peptona de caseína y de soja para el cultivo de bacterias aerobias, pero también apropiado para hongos. Las muestras son inoculadas e incubadas durante 14 días a las temperaturas apropiadas para cada medio, se observa el cultivo varias veces durante el periodo de incubación.

#### **2. Detección de micoplasma:**

La línea fue testada para Micoplasma y patógenos habituales que aseguró la ausencia de microorganismos en las condiciones de cultivo utilizadas.



**Resumen:**

CARACTERIZACION DE LA LÍNEA HVR-3

Pase nº	55
Feeders	HUMAN FORESKIN FIBROBLASTS
Aislamiento MCI	
Cariotipo	46,XX
Fenotipado	
Inmunofluorescencia	
SSEA-1	-
SSEA-4	+
TRA1-60	+
TRA1-81	+
Oct 4	+
RT-PCR	
Oct 4	
Sox2	+
Nanog	+
Tert	+
q-PCR	
Oct 4	+
Nanog	+
Fosfatasa alcalina	+
Citometría de flujo	
SSEA-4	+
TRA-1-60	+
HLA-ABC	+
Actividad Telomerasa	SI
Viabilidad congelación/descongelación	SI
Pluripotencialidad	
In vivo	SI
In Vitro	
Ectodermo (Isl-1, Ngn3, Tuj1)	+
endodermo ( $\alpha$ -fetoproteína)	+
mesodermo (BMP4, $\alpha$ -actinina, troponina)	+
Análisis microbiológico	
Micoplasma	+
Tipificación HLA	
HLA-A	+
HLA-B	+
HLA-C	+

## **TUMORES TRAS LA IMPLANTACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS HUMANAS**

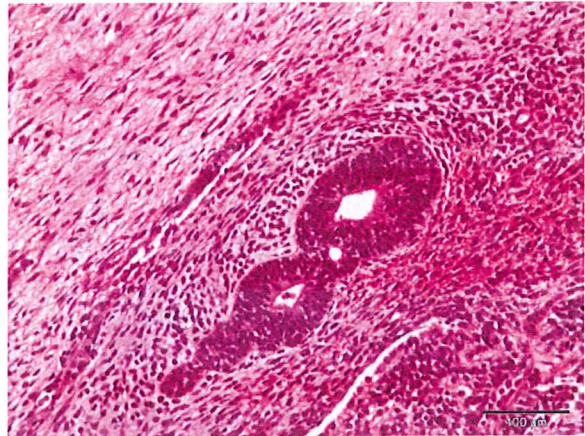
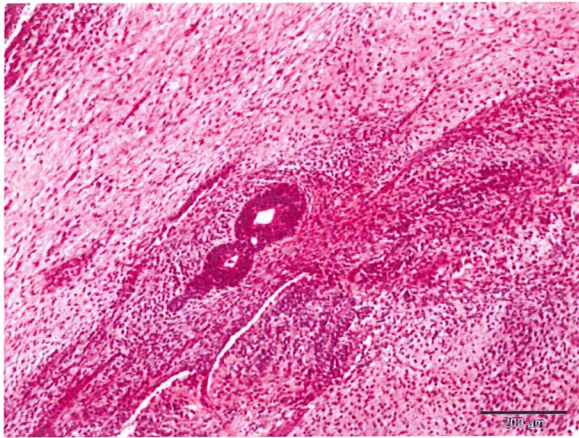
Tanto en la muestra 1 como en la 2 se observa la formación de un tumor constituido por células pertenecientes a las 3 capas germinales embrionarias. El diagnóstico es de un teratoma.

En la muestra 1, tomada a las 6,5 semanas, los tejidos están más evolucionados, observándose la existencia de rosetas neuronales originadas a partir de ectodermo y que darán lugar el tejido nervioso. También aparecen áreas de tejido cartilaginoso del mesodermo con condrocitos rodeados de matriz cartilaginosa y células grasas también procedente de mesodermo. Además, existen conductos formados por un epitelio cilíndrico ciliado, similar al que recubrirá las vías respiratorias y cuyo origen es el endodermo.

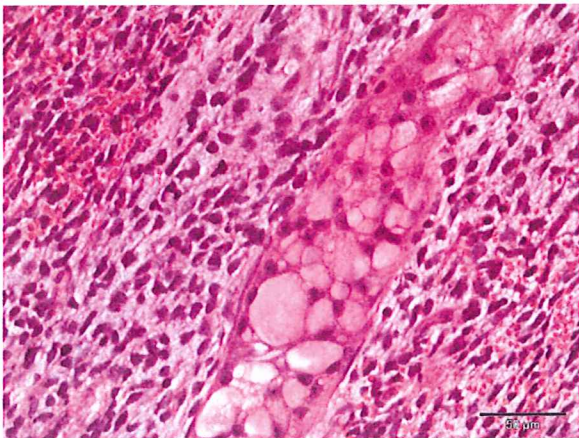
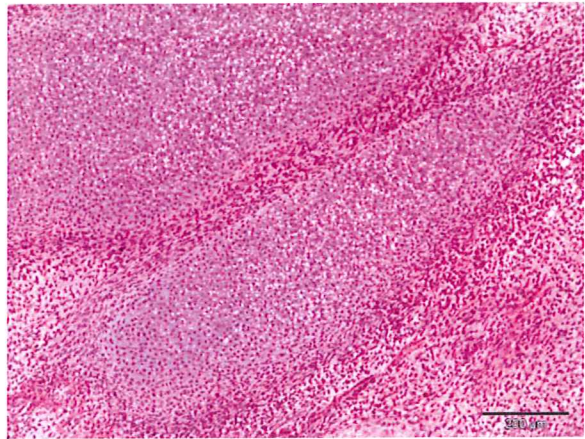
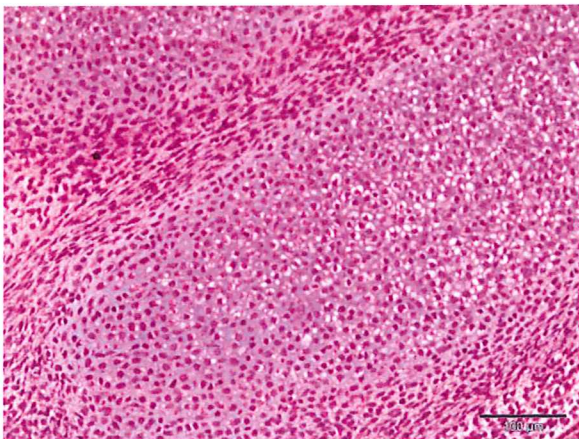
En la muestra 2, los tejidos se encuentran en un estadio menos avanzado de desarrollo. Así, se observan rosetas neuronales ya formadas y epitelio cilíndrico ciliado como en el caso del teratoma de la muestra 1. Sin embargo, el tejido cartilaginoso no está todavía completamente formado aunque se observa ya un tejido mixoide que será el precursor del tejido cartilaginoso y cuyo origen también es el mesodermo.

Granada, 20 de junio de 2010.

MUESTRA 1

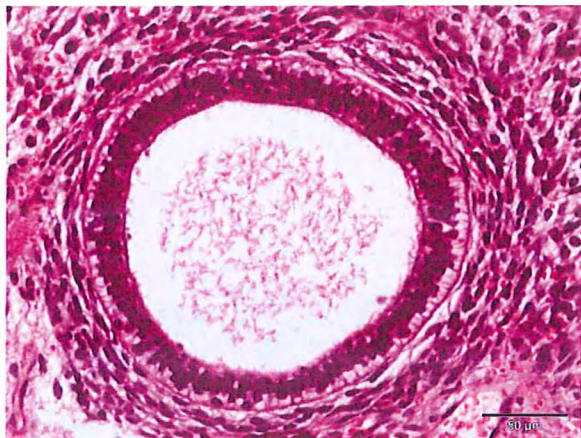


Rosetas neuronales: ectodermo

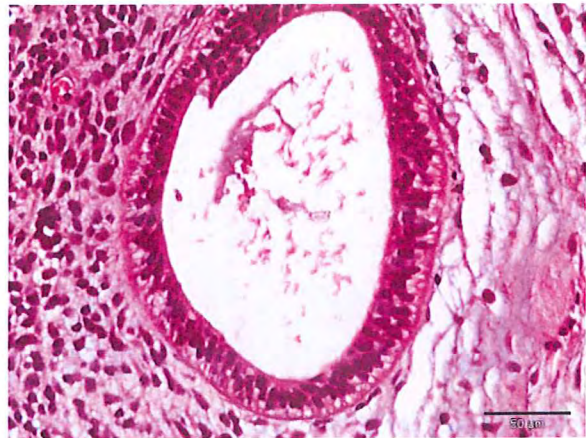


Cartílago y células grasas: mesodermo.

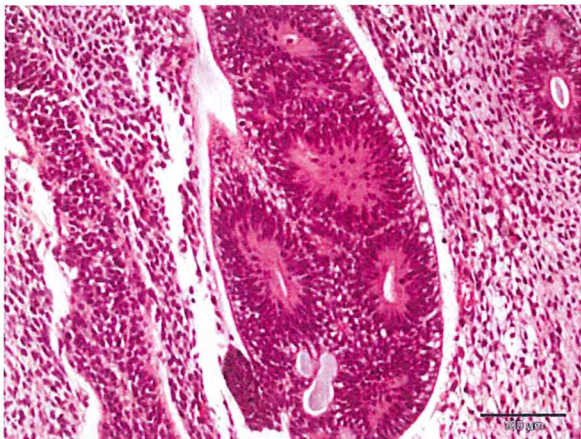




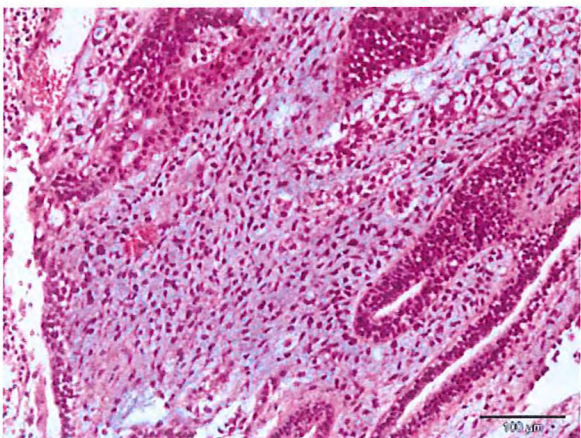
Epitelio cilíndrico ciliado: endodermo.



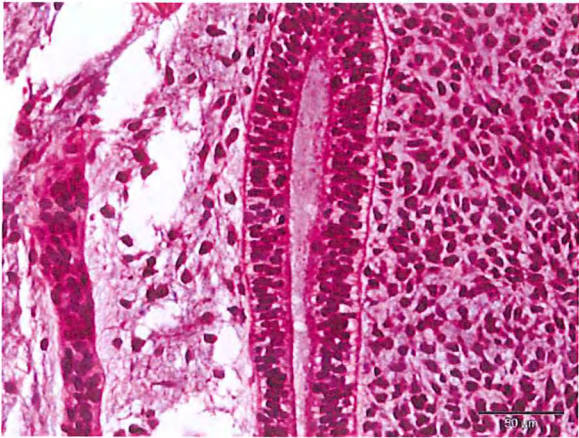
## MUESTRA 2



Rosetas neuronales: ectodermo



Tejido mixoide precursor de cartílago: mesodermo.



Epitelio cilíndrico ciliado: endodermo.