

ANEXO A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE
LA LÍNEA CELULAR “*HVR-2*” EN EL BANCO
NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES.

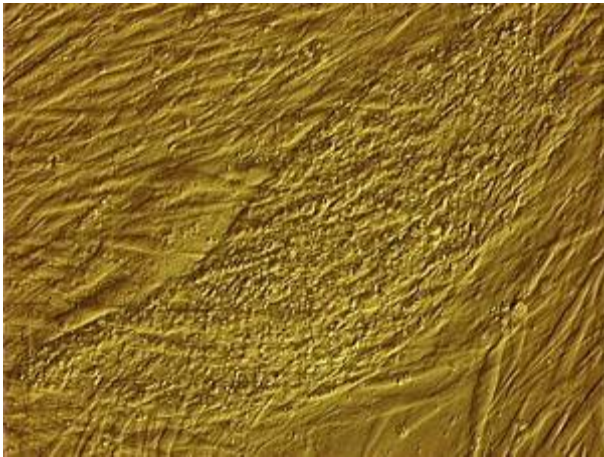
I- Derivación

El preembrión del cual se ha obtenido esta línea celular fue descongelado según el protocolo comercial de descongelación Vitrification Thaw kit de Irvine Scientific®. El preembrión que se encontraba en día 5 de desarrollo (estadio de blastocisto) y se cultivó en medio G2 de la serie GIII de Vitrolife® (Kungsbacka, Suecia).

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 ó 2 viales de la línea.

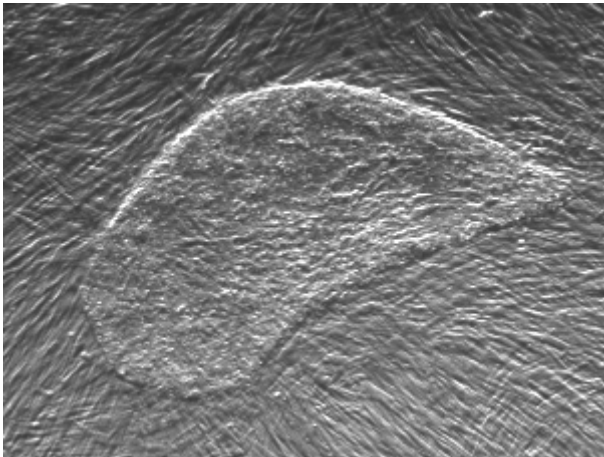


Aspecto de la MCI cultivada sobre fibroblastos humanos inactivados

III- Caracterización de HVR-2

III.1- Fenotipo:

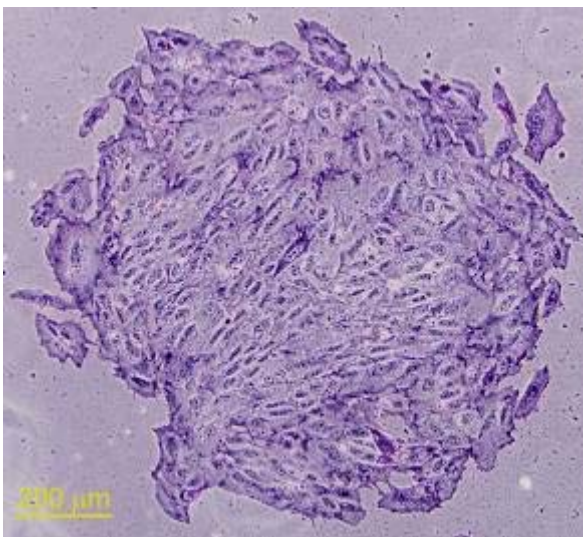
Morfológicamente presenta un buen aspecto con un buen crecimiento de colonias completamente indiferenciadas. Las células de las colonias presentan un núcleo grande característico de la CTE.



Morfología de una colonia de CTE HVR-2 cultivada sobre fibroblastos humanos inactivados

III.2- FA:

La tinción para fosfatasa alcalina (SIGMAFAST BCIP/NBT tablet) nos muestra una colonia teñida de azul violáceo indicador del estado de indiferenciación de las CTEs.



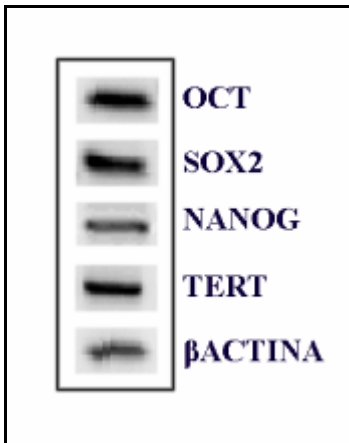
Tinción fosfatasa alcalina positiva de una colonia de hCTEs en cultivo sobre matrigel

III.3- Marcadores de pluripotencialidad:

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

III.3.1- RT-PCR.

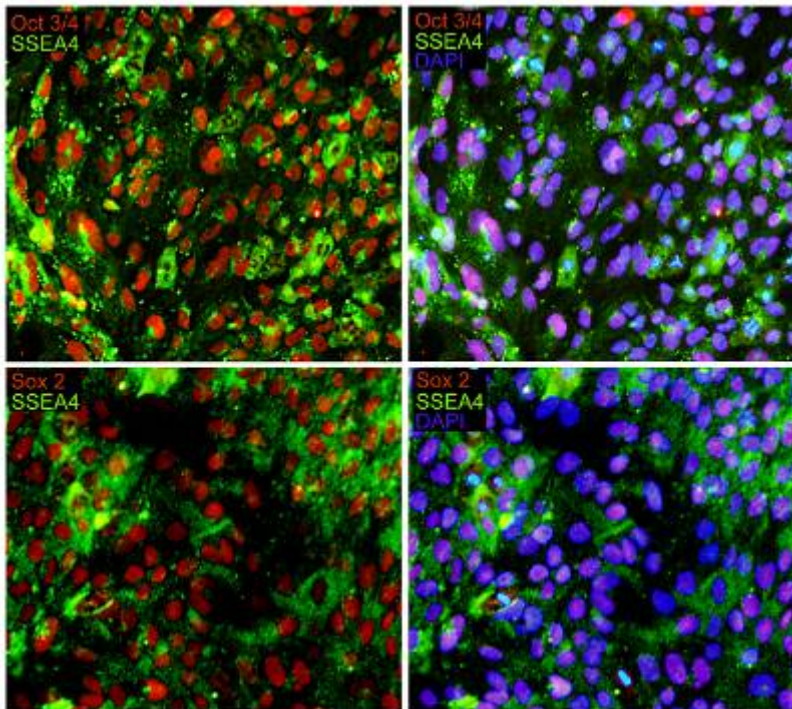
Se realizaron RT-PCR de los marcadores de indiferenciación OCT, NANOG, SOX2 y utilizando como control β -ACTINA



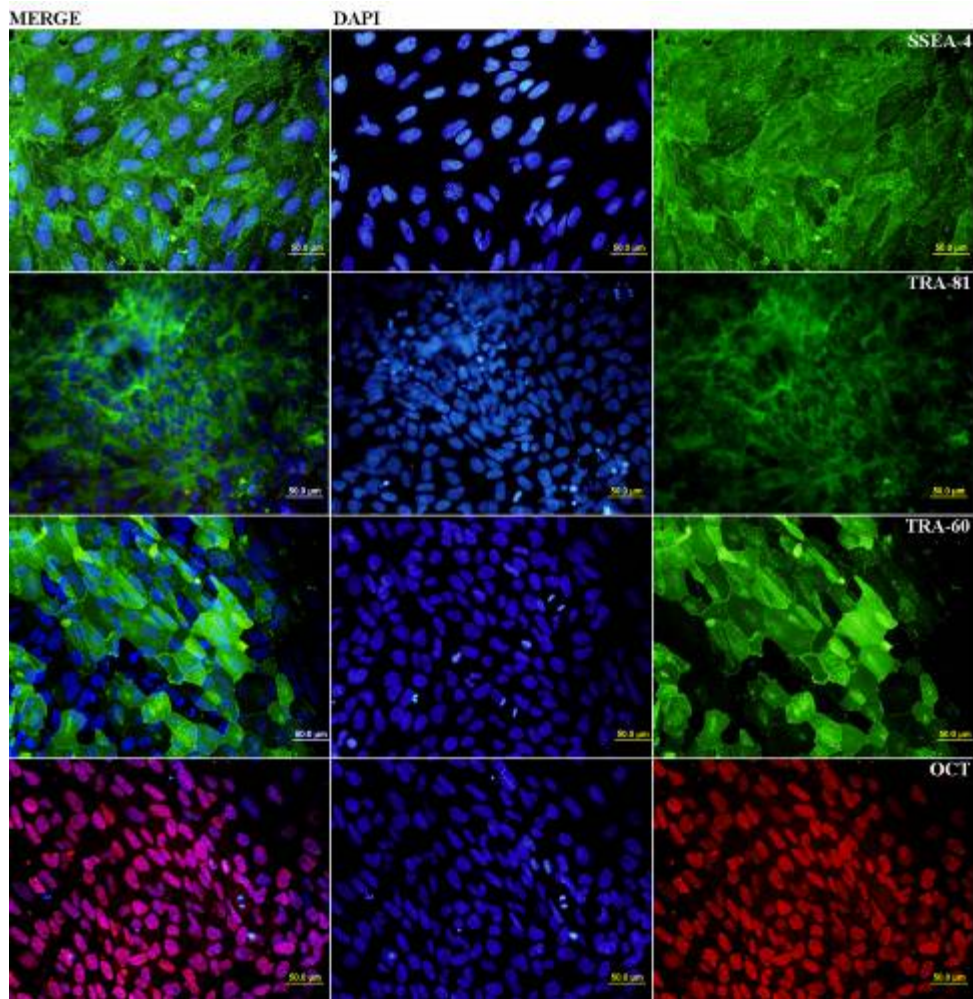
RT-PCR de la línea de hCTEs para los marcadores pluripotencialidad “Oct, Sox2, Nanog, Pert” y para la β-actina como control interno

III.3.2- Inmunofluorescencia.

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 (nuclear) sobre células crecidas en cultivo.

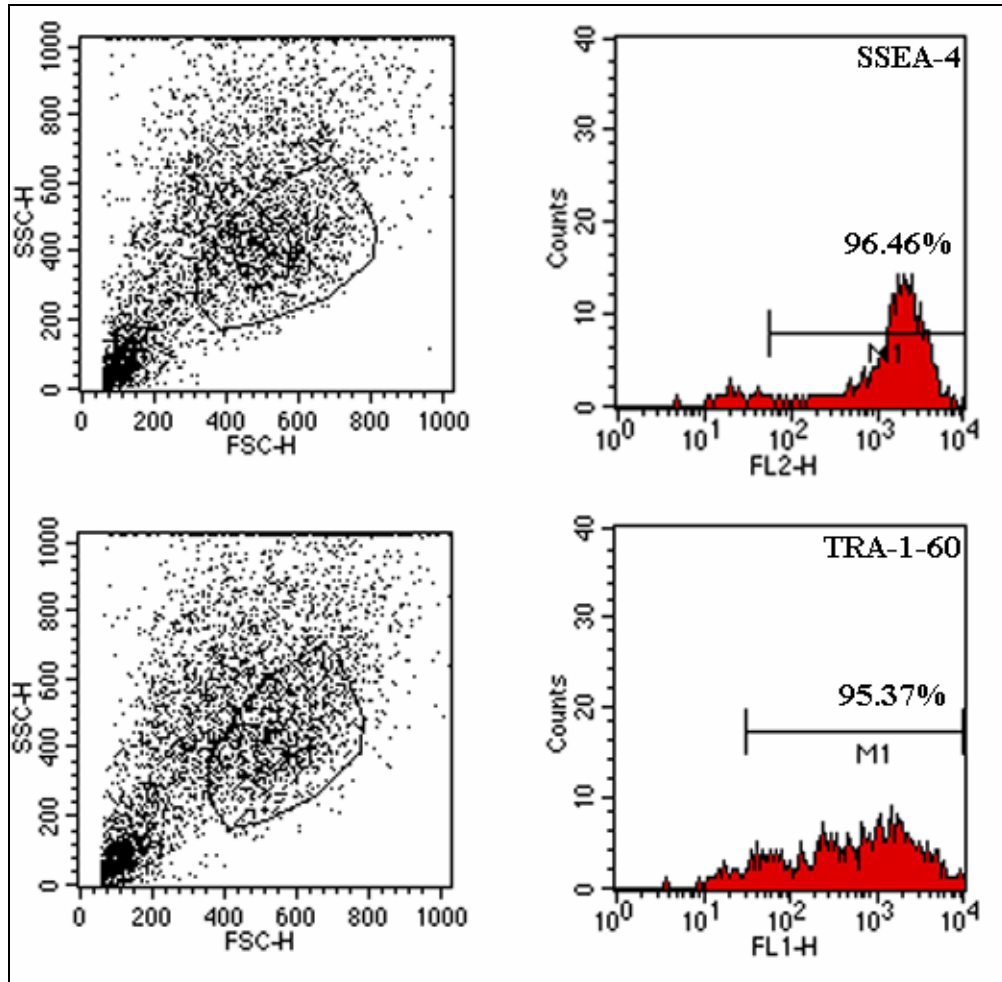


Expresión de Oct-4Sox2 y SSEA-4 por inmunofluorescencia



Expresión de SSEA-4, TRA-1-81, TRA-1-60 y Oct-4 por inmunofluorescencia

III.3.3- Citometría de flujo

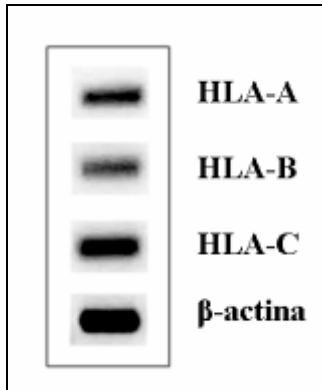


Antígeno	% Población Celular
TRA-1-60	95.34±2.31
SSEA-4	98.49±0.27

Histogramas y Análisis de citometría de flujo de marcadores de pluripotencialidad

III.4- Expresión HLA

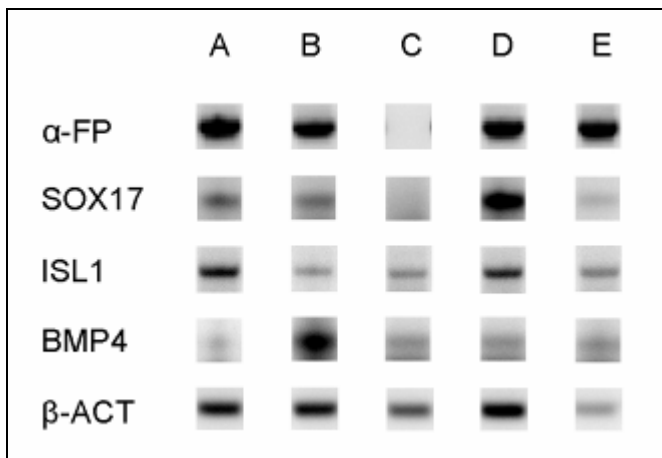
La línea expresa HLA-a HLA-B y HLA-C a nivel de mensajero (RT-PCR)



Expresión de los distintos isotipos HLA mediante RT-PCR

III.5- Diferenciación “in vitro”

Por un lado, se llevó a cabo un protocolo de diferenciación espontánea mediante cultivo masivo sobre matrigel. Se realizó cambio de medio en días alternos durante 13 días con medio KSR sin bFGF. Los resultados se muestran en la columna A de la figura 1. Como puede observarse, la línea celular muestra marcadores para las tres capas embrionarias: endodermo (α -fetoproteína y Sox17), ectodermo (Isl1) y mesodermo (BMP4)



Detección por RT-PCR de distintos marcadores de diferenciación para la línea celular HVR-2

La columna B muestra los resultados de un cultivo celular procedente de la línea de hESC, **HVR-2**, después de la formación de cuerpos embrionarios mediante el cultivo durante 4 días en suspensión con el posterior crecimiento masivo durante 30 días y con un cambio de medio (KSR sin bFGF) cada dos días.

La columna C muestra los resultados de una diferenciación hacia ectodermo de la línea celular **HVR-2**. Para ello tras la formación de EB, siguiendo el protocolo descrito por Li XS y Zhang SC [**In vitro differentiation of neural precursors from human embryonic stem cell**. *Human embryonic stem cell protocols*. Humana Press: 169-177 (2006)], hemos tratado los EBs en cultivo masivo con medio de inducción neural (que contiene N2 supplement) durante 30 días.

Las columnas D muestra los resultados de la diferenciación hacia ectodermo siguiendo el mismo protocolo que en los datos mostrados en la columna C pero con un tratamiento de 13 días con medio de inducción neural. Al microscopio óptico se observó la aparición de rosetas.

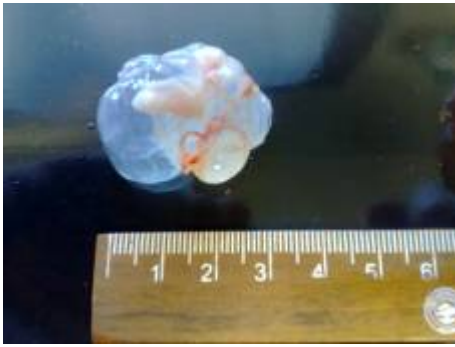
La columna E muestra los resultados de una diferenciación hacia mesodermo mediante el cultivo de la línea **HVR-2**. Para inducir la diferenciación hacia miocardiocitos, las CTEhs fueron disociadas mecánicamente en pequeños trozos. Los cuerpos embrionarios (EBs) fueron formados utilizando medio específico, que consistía en DMEM/F12 con suero bovino fetal (FBS) al 20%, glutamina 1mM, β -mercaptoetanol 0.1mM y aminoácidos no esenciales al 1% y fueron cultivados utilizando el método de la gota pendiente. Entonces, utilizamos un agente desmetilante, 5-azacitidina (AZAD), siguiendo el protocolo descrito por Yoon y colaboradores [**Enhanced differentiation of human embryonic stem cell into cardiomyocytes by combining hanging drop culture and 5-azacytidine treatment**. *Differentiation* 74: 149-159 (2006)]. Tras 11 días de tratamiento con una dosis 1 μ M de AZAD recogimos el material y mediante estudio de PCR observamos el marcaje hacia mesodermo.

III.6- Diferenciación “in vivo”

Los ratones inoculados con **HVR-2** y que mostraron alteraciones macroscópicas, fueron sacrificados a las 10 semanas de tratamiento. En el proceso de disección pudimos apreciar unas masas globosas (Teratomas con fluido quístico) que fueron analizadas histológicamente con el fin de detectar las capas germinales.



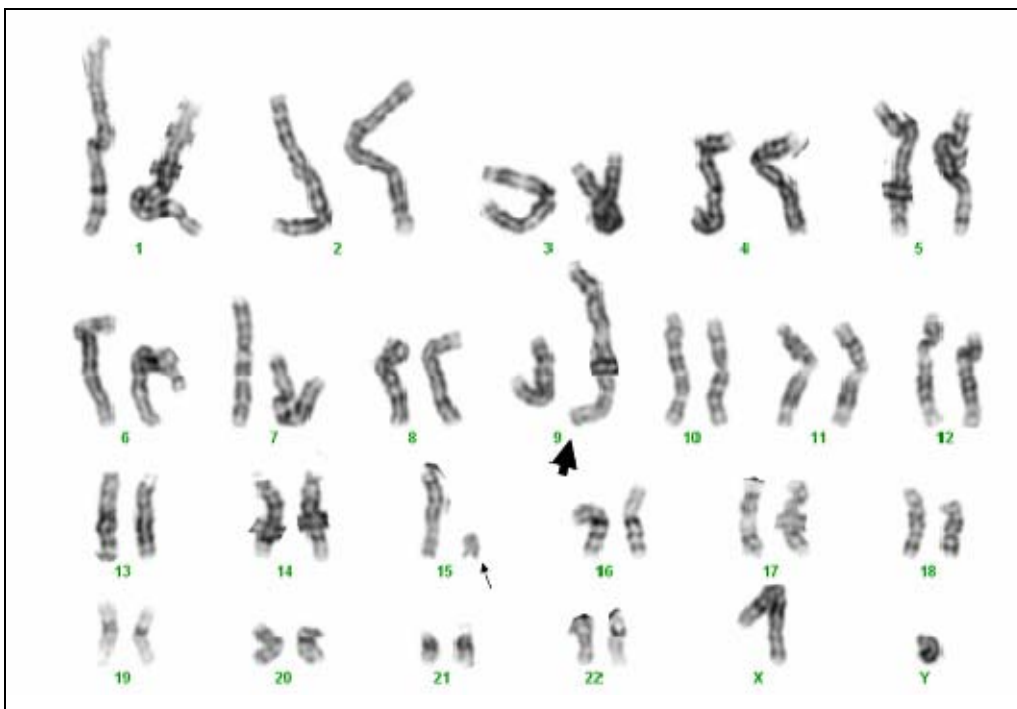
Extirpación del teratoma de un ratón beige NOD-SCID



Aspecto del teratoma extirpado

IV.- Estabilidad genética y Cariotipo:

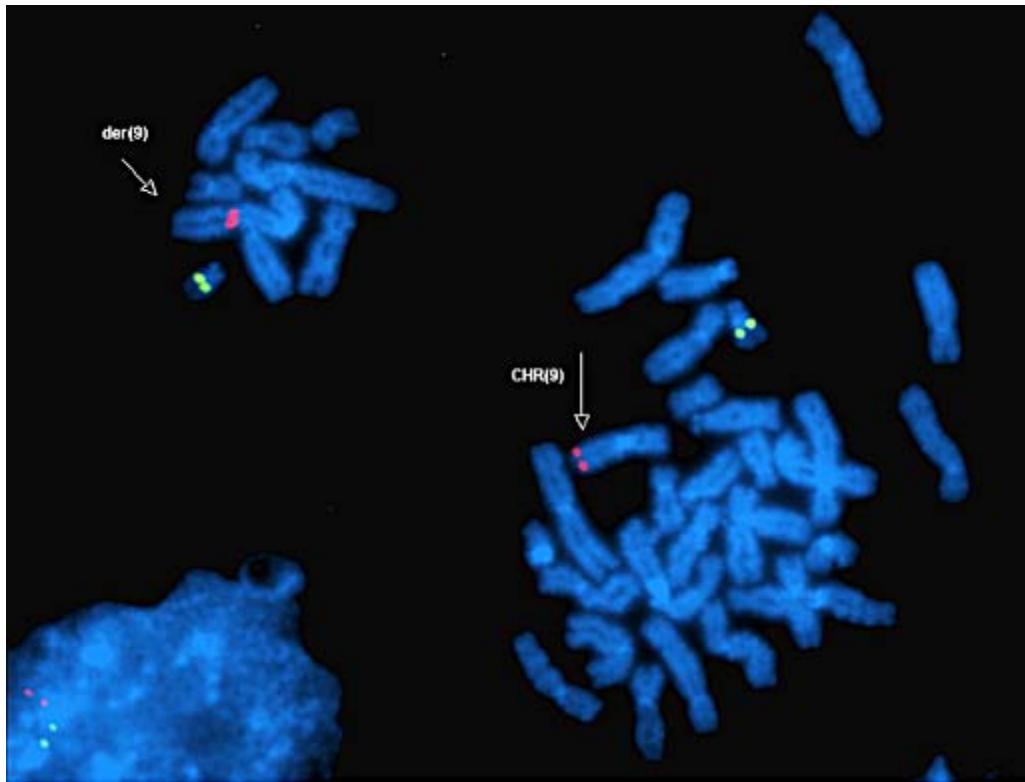
La línea presenta un cariotipo de varón portador de una translocación recíproca entre 9q34.4 y 15q14. Mediante técnicas de hibridación in situ fluorescente con sondas específicas hemos demostrado que el punto de corte se sitúa distal a ABL (9q34) y proximal a la región subtelomérica 9qter. No se han observado anomalías adicionales durante la evolución del cultivo.



Cariotipo con bandedo cromosómico GTL: 46, XY, t(9;15)(q34.3;q14)

Flecha gruesa: der(9)t(9;15)(q34.3;q14)

Flecha delgada: der(15)t(9;15) (q34.3;q14)



*Hibridación con la sonda ABL localizada en 9q34 (rojo)
 La señal verde (control) se localiza en 22q11.2*

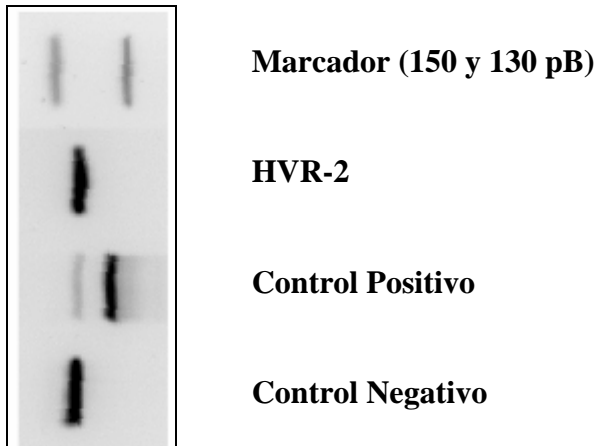
V.- Test de esterilidad

Se ha testado la presencia de micoplasmas en los cultivos siguiendo dos protocolos de diferentes casas comerciales.

Por un lado, se utilizó MycoAlert Micoplasma Detection Kit (LONZA), basado en un método bioquímico que detecta la actividad de ciertos enzimas micoplasmáticos mediante luminometría. Si estos enzimas no están presentes en las muestras, la segunda lectura no muestra incremento respecto a la primera, como puede observarse en la tabla. Se testó la muestra **HVR-2** P43 tras nueve días en cultivo, dando lugar a un resultado negativo para ambas muestras.

	1ª Lectura	2ª Lectura	Resultado
Control negativo	1.119e+04	1265	-
HVR-2	5275	2199	-
Control positivo	5306	4.42e+05	+

Por otro lado, se utilizó Venor®GeM (Minerva biolabs), basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), método de elección por su alta sensibilidad en la detección de contaminación por Micoplasma y Acholeplasma en cultivos celulares, con la muestra **HVR-2** P43 tras cinco días en cultivo. De nuevo, el resultado fue negativo. Véase la siguiente figura.



Resultados del test de detección de micoplasmas con el kit Venor®GeM

Se repitió el test de detección de micoplasmas con el kit Venor®GeM (Minerva biolabs) de la línea **HVR-2** en pase P45 (7 días en cultivo) y P44 (12 días en cultivo). En todas las muestras el resultado fue negativo.

Resumen:

CARACTERIZACION DE LA LÍNEA HVR-2

CARACTERÍSTICAS	
Pase nº	83
Feeders	HUMAN FORESKIN FIBROBLASTS
Aislamiento MCI	
Cariotipo	46,XY, t(9;15)(q34.3;q14)
Fenotipado	
Inmunofluorescencia	
SSEA-1	
SSEA-4	+
TRA1-60	+
TRA1-81	+
Oct 4	+
Sox 2	+
RT-PCR	
Oct 4	+
Sox2	+
Nanog	+
Tert	+
Fosfatasa alcalina	+
Citometría de flujo	
SSEA-4	+
TRA-1-60	+
Viabilidad congelación/descongelación	SI
Pluripotencialidad	
In vivo	SI
In Vitro	
Ectodermo (Isl-1)	+
endodermo (α -fetoproteína)	+
mesodermo (BMP4)	+
Análisis microbiológico	
Micoplasma	-
Tipificación HLA	
HLA-A	+
HLA-B	+
HLA-C	+