

VAL-3

Datos biológicos necesarios para determinar la trazabilidad y el tipaje de VAL-3

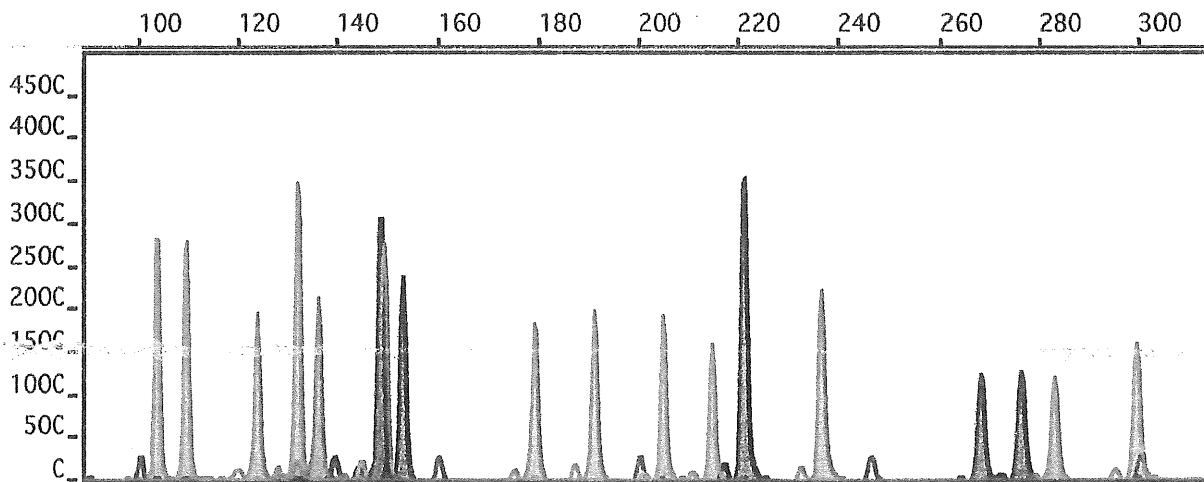
-Estudio del fingerprinting de la línea mediante marcadores polimórficos



GeneScan® 3.1.2

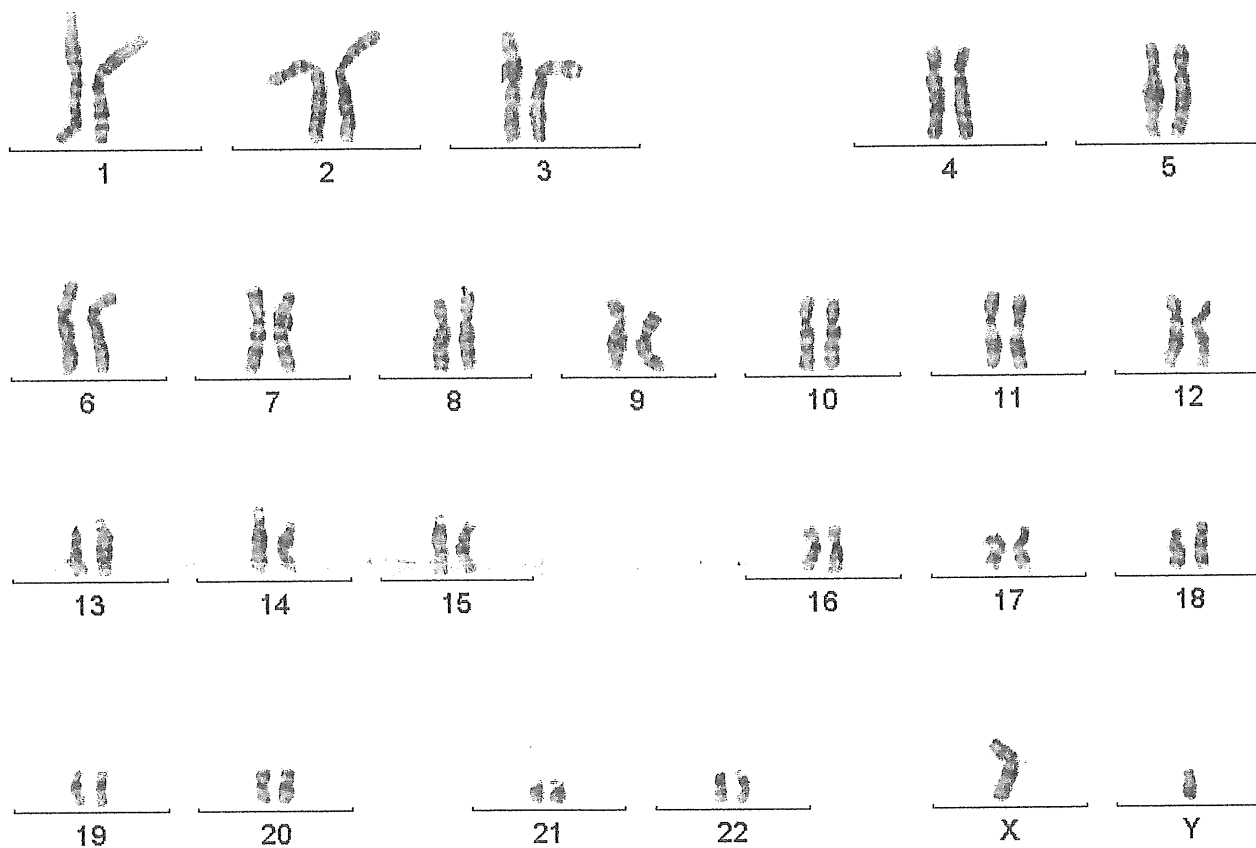
ESC VAL-3

Page 1 of 1



Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
B, 4	14.00	123.34	1960	21574	3818
B, 7	14.41	135.77	2162	23822	3928
B, 10	15.73	178.94	1837	18871	4289
B, 12	16.11	190.88	1995	21047	4393
B, 14	17.53	236.30	2247	24419	4781
G, 1	13.32	103.35	2896	26363	3633
G, 2	13.52	109.08	2806	26218	3687
G, 4	14.27	131.65	3487	34579	3892
G, 6	14.80	148.99	2792	27290	4036
G, 7	16.55	204.64	1941	19178	4513
G, 8	16.86	214.45	1630	16163	4597
G, 9	18.91	282.57	1219	13827	5157
G, 10	19.39	299.23	1597	19212	5288
Y, 2	14.78	148.36	3127	29859	4031
Y, 3	14.92	152.83	2386	22134	4067
Y, 5	17.06	220.93	3563	37419	4652
Y, 6	18.48	267.93	1250	14442	5040
Y, 7	18.72	276.04	1268	15111	5105

-Estudio del cariotipo en los pases 5 y 20, llevado a cabo por un laboratorio independiente al CIPF (Prenatal Genetics, Barcelona, Spain). El resultado obtenido del estudio citogenético realizado mediante la técnica de bandas G con 150 bjh, fue 46,XY.



TIPAJE HLA POR BIOLOGÍA MOLECULAR DE ALTA RESOLUCIÓN

Realizado en el Centro de transfusiones de la Comunidad Valenciana

Línea Celular: VAL 3

Muestra: DNA genómico, 1.01 µg/µl

HLA-A*02

HLA-B*07, HLA-B*38

HLA-C*07, HLA-C*12

HLA-DRB1*13

HLA-DQB1*6

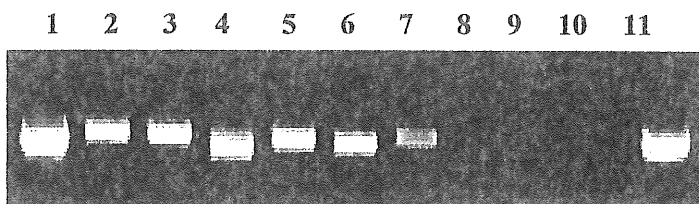
HLA-DQA1*0103

Información detallada sobre viabilidad, potencialidad y seguridad de la línea.

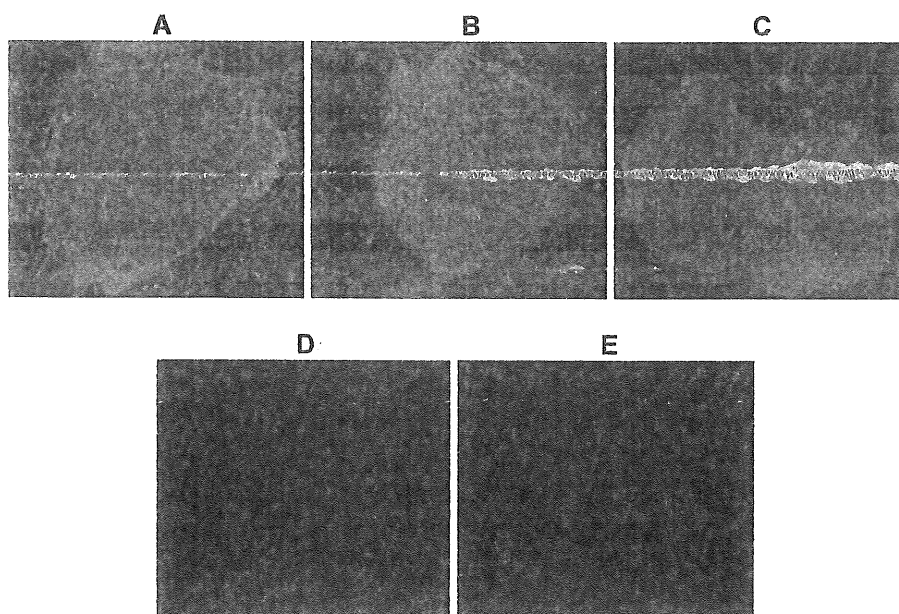
-Morfología compatible. (A) Blastocisto, (B) primer corte, (C) morfología típica de una colonia.



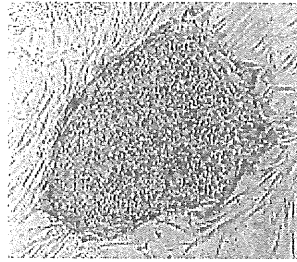
-Expresión de marcadores moleculares de indiferenciación RT-PCR ha sido positiva para Oct-4 (1), Sox-2 (2) Rex-1 (3), Nanog (4), CR1 (5), Thy-1 (6) y Lefty-A (7) así como negativa para Nfh (8), Ren (9) y Amy (10). El control interno de expresión utilizado es Gapdh (11)



-Expresión de antígenos de indiferenciación: inmunocitoquímica positiva para SSEA-4 (A), Tra-1-60 (B), Tra-1-81 (C) (Chemicon, Temecula, CA) y Nanog (D) (R&D, Minneapolis, MN) y negativa para SSEA-1 (E) (Chemicon, Temecula, CA).

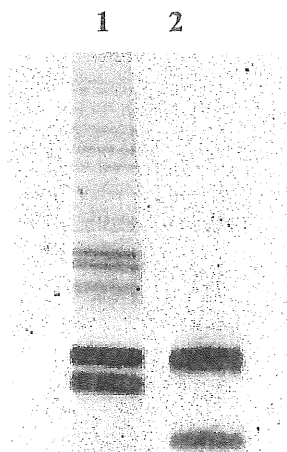


-Ensayos de actividad de fosfatasa alcalina mediante un kit comercial (Chemicon, Temecula, CA). Se comprobó la actividad fosfatasa alcalina positiva para más del 90% de las colonias.

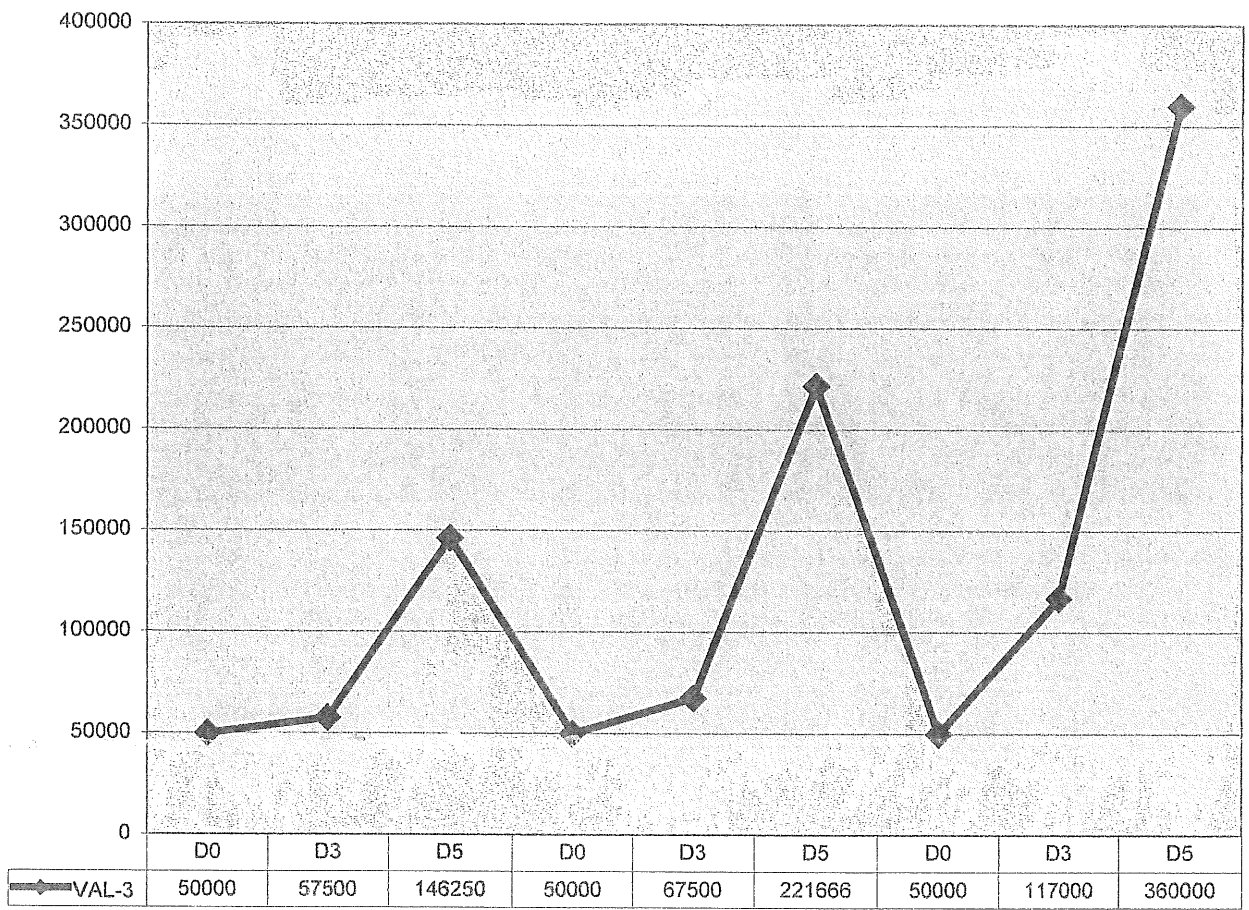


-Determinación de la existencia de actividad telomerasa.

La detección de la actividad telomerasa característica de células inmortales se ha realizado mediante una reacción de PCR utilizando un kit específico (TRAPEZE[®] Telomerase Detection Kit; Chemicon, Australia) y tinción con SYBR[®] (Molecular probes, USA) y repetido por un laboratorio independiente (M Blasco CNIO). El análisis de la actividad telomerasa se realizó sobre células intactas (1) y sobre células inactivadas por calor (2)

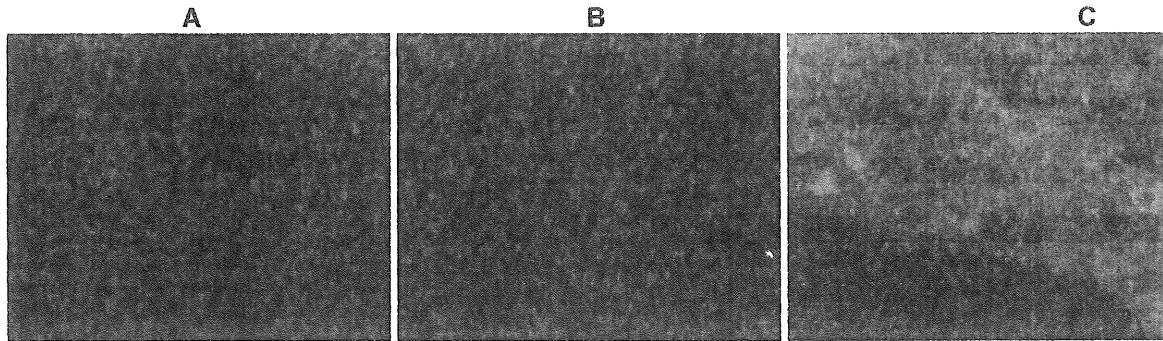


-Congelación y descongelación consistente hasta 6 pases y curva de crecimiento en fresco.



-Diferenciación espontánea en cultivo, a células de las tres hojas embrionarias.

Consiste en disociar las colonias de células madre con colagenasa tipo IV, y mantenerlas en cultivo en suspensión con medio con SBF, para favorecer la formación de cuerpos embrioides. Transcurridos 4-7 días, los cuerpos embrioides se transfirieron a placas para facilitar su adhesión y favorecer su crecimiento en cultivo con medio con SBF. Tras 10-14 días, se procede a la fijación y análisis de marcadores de diferenciación característicos de (A)ectodermo (tubulin, β -III), (B) mesodermo (actina muscular) y (C) endodermo (α -fetoproteína).



-Inducción de la formación de teratomas en ratones SCID.

Para desarrollar los experimentos de diferenciación in vivo de las líneas, se utilizaron ratones macho de 8 semanas de edad, con inmunodeficiencia severa combinada (SCID). Las colonias de células madre utilizadas, se aíslan de la monocapa de feeder mediante el método de flushing. El número de células inyectadas es de 50.000 por testículo. La aparición de tumores se puede detectar por palpación transcurridas 8 semanas de la inyección. El desarrollo de los mismos se mantiene durante 2-4 semanas más, momento en el que los animales se sacrifican por desnucación cervical.

Para confirmar la presencia de derivados de las tres hojas embrionarias, la búsqueda se orienta hacia la identificación de tejidos fácilmente distinguibles como (A) rosetas neuronales, (B) cartílago o (C) glándulas. Para cerciorarnos de los resultados se emplean también anticuerpos frente a derivados de las tres hojas embrionarias (D) tubulin, β -III, (E) actina muscular y (F) α -fetoproteína.

