

# VAL-4

## Datos biológicos necesarios para determinar la trazabilidad y el tipaje de VAL-4

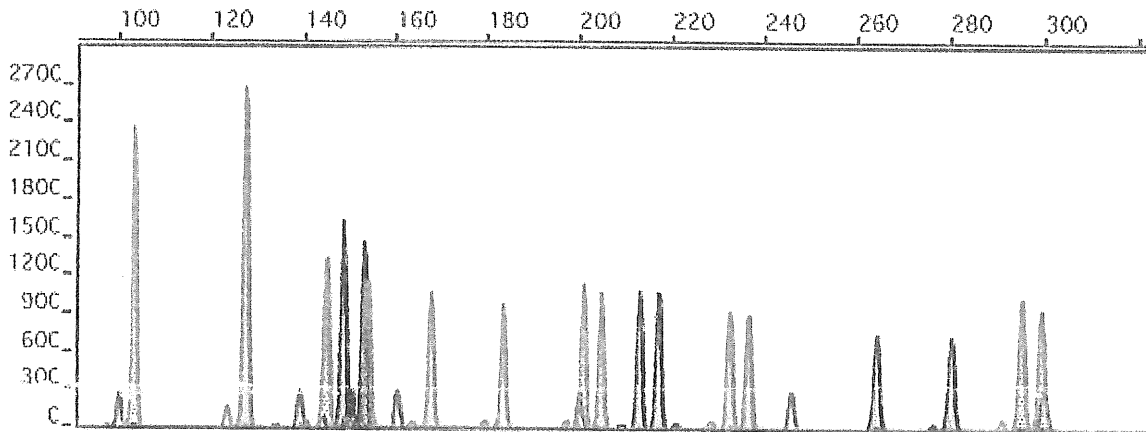
-Estudio del fingerprinting de la línea mediante marcadores polimórficos



GeneScan® 3.1.2

ESC VAL-4

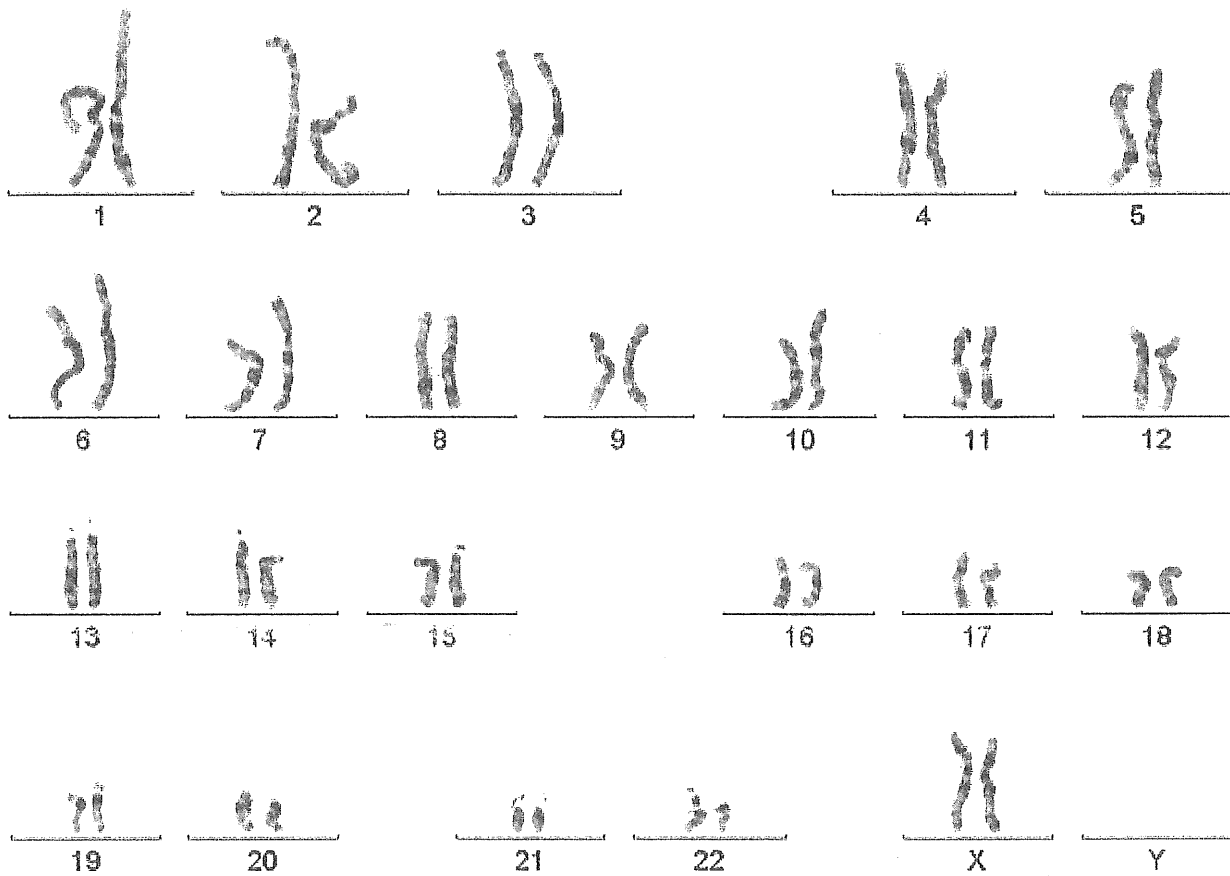
Page 1 of 1



Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
B, 2	14.33	127.40	2692	22748	3907
B, 3	15.57	167.35	1080	9102	4246
B, 5	16.09	183.17	989	8555	4386
B, 7	17.68	232.37	937	8285	4821
B, 8	17.81	236.33	900	7968	4855
G, 1	13.50	103.36	2400	19643	3680
G, 2	14.88	144.65	1334	11570	4057
G, 3	15.15	153.68	1158	10316	4130
G, 4	16.67	200.79	1147	9640	4545
G, 5	16.80	204.74	1071	8896	4580
G, 6	19.60	295.28	1046	9958	5345
G, 7	19.72	299.38	945	8939	5378
Y, 1	14.99	148.38	1651	13377	4087
Y, 2	15.12	152.83	1487	12413	4123
Y, 3	17.06	213.02	1107	9464	4653
Y, 4	17.20	217.14	1080	9375	4689
Y, 5	18.66	264.04	743	7268	5089
Y, 6	19.15	280.27	737	7252	5223

-Estudio del cariotipo en el pase 6, 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 400 bjh, fue 46,XX.





## TIPAJE HLA POR BIOLOGÍA MOLECULAR DE ALTA RESOLUCIÓN

(Técnicas: PCR-SSP y PCR-SSO, alta resolución)

Línea Celular: VAL 4

Muestra: DNA genómico, 1.01  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

HLA-A\*0201, HLA-A\*2402  
HLA-B\*1801, HLA-B\*4403; Bw4, Bw6  
HLA-C\*0401, HLA-C\*0701  
HLA-DRB1\*1101, HLA-DRB1\*1104  
HLA-DRB3\*0202, --  
HLA-DQA1\*0505, --  
HLA-DQB1\*0301, --  
HLA-DPB1\*0201, HLA-DPB1\*0401

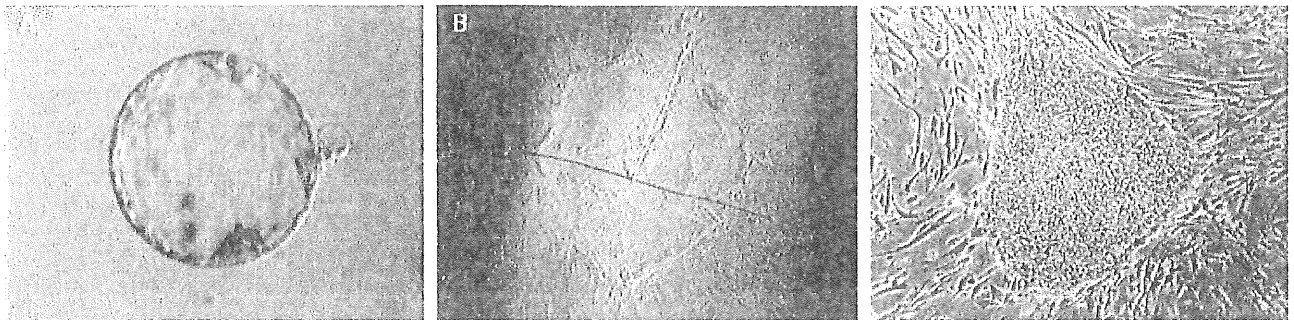
*Valencia, a 23 de agosto de 2006*

Fdo. Dra. D. Planelles  
Laboratorio de Biología Molecular-Histocompatibilidad

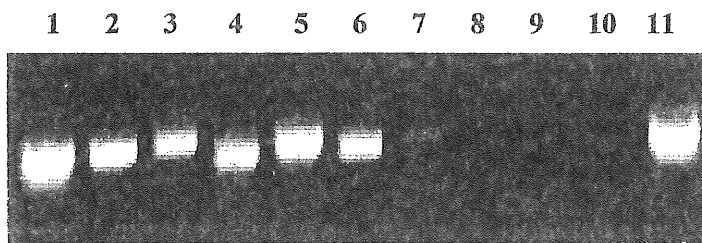


Información detallada sobre viabilidad, potencialidad y seguridad de la línea.

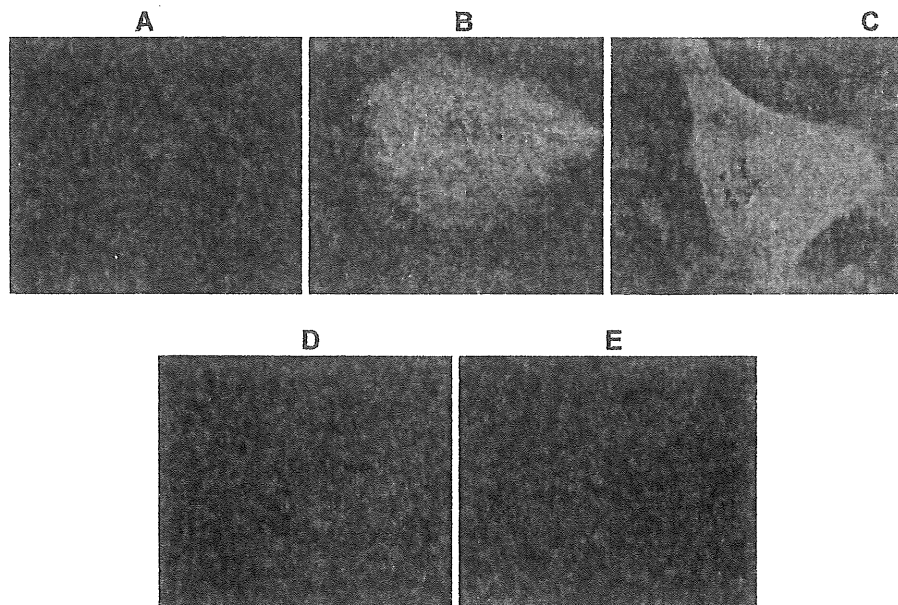
-Morfología compatible. (A) Blastocisto, (B) primer corte, (C) morfología típica de una colonia.



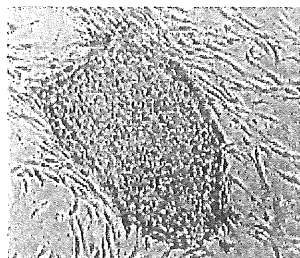
-Expresión de marcadores moleculares de indiferenciación RT-PCR ha sido positiva para Oct-4 (1), Sox-2 (2) Rex-1 (3), Nanog (4), CR1 (5), Thy-1 (6) y Lefty-A (7) así como negativa para Nfh (8), Ren (9) y Amy (10). El control interno de expresión utilizado es Gapdh (11)



-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 ara SSEA-1 (E) (Chemicon, Temecula, CA).

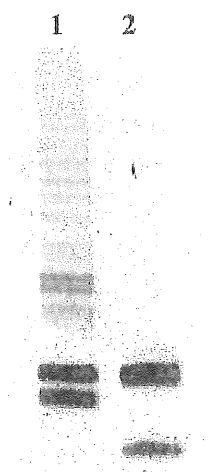


-Ensayos de actividad de fosfatasa alcalina mediante un kit comercial (Chemicon, Temecula, CA) se comprobó la actividad fosfatasa alcalina positiva para más del 90% de las colonias.

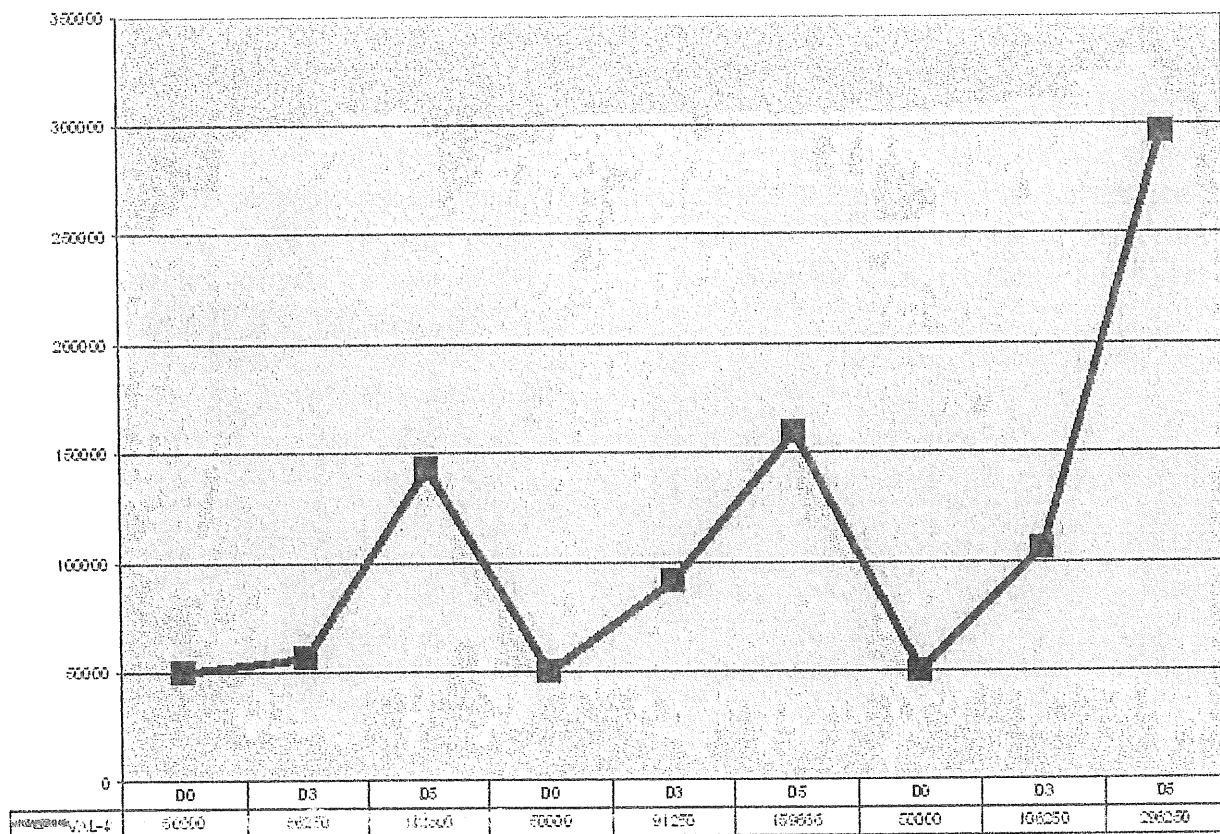


-Determinación de la existencia de actividad telomerasa.

La detección de la actividad telomerasa característica de células inmortales se ha realizado mediante una reacción de PCR utilizando un kit específico (TRAPEZE<sup>®</sup> Telomerase Detection Kit; Chemicon, Australia) y tinción con SYBR<sup>®</sup> (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)

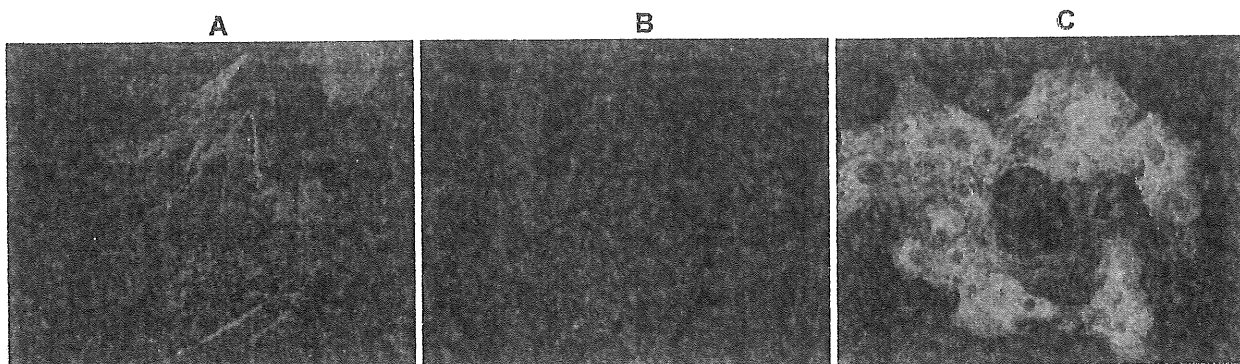


-Congelación y descongelación consistente hasta 7 pases y curva de crecimiento en fresco.



-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 transfieren a placas para facilitar su adhesión y favorecer su crecimiento en cultivo con medio con SBF. Tras 10-12 días, se procede a la fijación y análisis de marcadores de diferenciación característicos de (A)ectodermo (tubulin,  $\beta$ -III), (B)mesodermo (actina muscular) y (C)endodermo ( $\alpha$ -fetoproteína).



**-Inducción de la formación de teratomas en ratones SCID.**

Para desarrollar los experimentos de diferenciación in vivo de las líneas, se utilizarán 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 será 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 mantendrá durante 2-4 semanas más, momento en el que los animales se sacrificarán por desnucación cervical.

En progreso