

LÍNEA CELULAR VAL-4

Datos relativos a la muestra biológica:

Tipo: Embrión criopreservado en día 3 de desarrollo (8 células).
Congelación: 15/10/2000
Donación: 30/05/2005
Recepción: 01/10/2005
Descongelación: 06/02/2006

Descripción general del proceso:

Los embriones congelados y donados fueron descongelados mediante un protocolo de descongelación lento con gradientes de PROH y sacarosa, posteriormente fueron mantenidos en medio de cultivo embrionario (CCM, Vitrolife), hasta día 6 de desarrollo. El embrión origen de la línea de célula madre alcanzó el estadio de blastocisto expandido y después de ser retirada su zona pelúcida con ácido tyrodes, se puso en co-cultivo con células de *foreskin* irradiadas y medio de cultivo hES.

Soporte celular y medio de cultivo utilizados para la derivación:

Soporte celular: human foreskin fibroblasts (American Type Culture Collection ATCC), Manassas, VA, USA). N° catálogo.- CRL-2429.

Componentes del medio: 80% Knockout DMEM (Gibco/BRL, Pisley, Scotland, UK), n° catálogo: 10829-018. 20% Knockout Serum Replacement (Gibco/BRL), n° catálogo: 10828-028. 1mM L-glutamina (Sigma, St. Louis, MO, USA), n° catálogo: G-7513. 0,1 mM β -mercaptoetanol (Sigma), n° catálogo M-7522. 1% Non-essential amino acids (Gibco/BRL), n° catálogo: 11140-035. 0,5% Penicilina-streptomycin (Sigma), n° catálogo: P-4333.

Referencia:

Valbuena D, Galán A, Sánchez E, Poo ME, Gómez E, Sánchez-Luengo S, Melguizo D, García A, Ruiz V, Moreno R, Pellicer A and Simón C (2006) Derivation, characterization and differentiation of three new human embryonic stem cell lines (VAL-3, -4 and -5) on human feeder and serum-free conditions in Spain. *Reprod BioMed Online* **13**, 875-886.



CARACTERÍSTICAS:

Código: VAL-4
Origen embrión: Instituto Universitario IVI Valencia, Valencia, España
Pase: 49 (en el momento del registro)
Morfología: colonias aplanadas, translúcidas y con bordes definidos, con células homogéneas dispuestas en multicapa y ratio núcleo/citoplasma elevado. Se agrupan en colonias de 3000-5000 células.

Marcadores:

Marcador	Método (ARN/ICQ)	# pase	Resultados	Comentarios
Oct 4	PCR	7, 9, 20, 40	Positivo	Indiferenciación
Nanog	PCR/ICQ	7, 9, 20, 40 / 29	Positivo	Indiferenciación
Rex1	PCR	7, 9, 20, 40	Positivo	Indiferenciación
Sox2	PCR	7, 9, 20, 40	Positivo	Indiferenciación
SSEA3	-	-		
SSEA4	ICQ	7 y 11	Positivo	Indiferenciación
TRA-1-60	ICQ	7 y 11	Positivo	Indiferenciación
TRA-1-80	ICQ	7 y 11	Positivo	Indiferenciación
Telomerasa	PCR	7	Positivo	Inmortalidad
Fosfatasa alc.	ICQ	16	Positivo	Indiferenciación
Cariotipo	Bandas G	6 y 29	46, XX	
Thy-1	PCR	7, 9, 20, 40	Positivo	Indiferenciación
Nfh (ectodermo)	PCR	7, 9, 20, 40	Negativo	Diferenciación
Ren (mesodermo)	PCR	7, 9, 20, 40	Negativo	Diferenciación
Amy (endodermo)	PCR	7, 9, 20, 40	Negativo	Diferenciación

Capacidad de diferenciación:

	Ectodermo			Mesodermo			Endodermo		
	Marcador	Pase	Result	Marcador	Pase	Result	Marcador	Pase	Result
In Vitro	Tubulina β -III	8 y 16	+	α -fetoproteína	8 y 16	+	Actina muscular	8 y 16	+
Método empleado in Vitro: formación de cuerpos embrioides por flotación e ICQ.									
In vivo	Tubulina β -III		+	α -fetoproteína		+	Actina muscular		+
Método empleado <i>in vivo</i> : Inducción de teratomas y análisis por ICQ.									

Tipaje HLA: 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.

Viabilidad congelación/descongelación: La línea celular se mantiene estable tras 6 pases después de los procedimientos de congelación y descongelación. Marcadores de indiferenciación positivos y formación de teratomas.



Control microbiológico: El soporte celular fue testado para: Mycoplasma, endotoxinas, citomegalovirus, Epstein-Barr, VHB, VHC, herpes humano 6(A) y 6(B), VIH-1, VIH-2, HTLV-I/II, parvovirus y transcriptasa reversa. Los resultados fueron negativos.

La línea fue testada para Mycoplasma y patógenos habituales. De forma rutinaria se realizan controles microbiológicos que aseguran la ausencia de microorganismos en las condiciones de cultivo utilizadas.

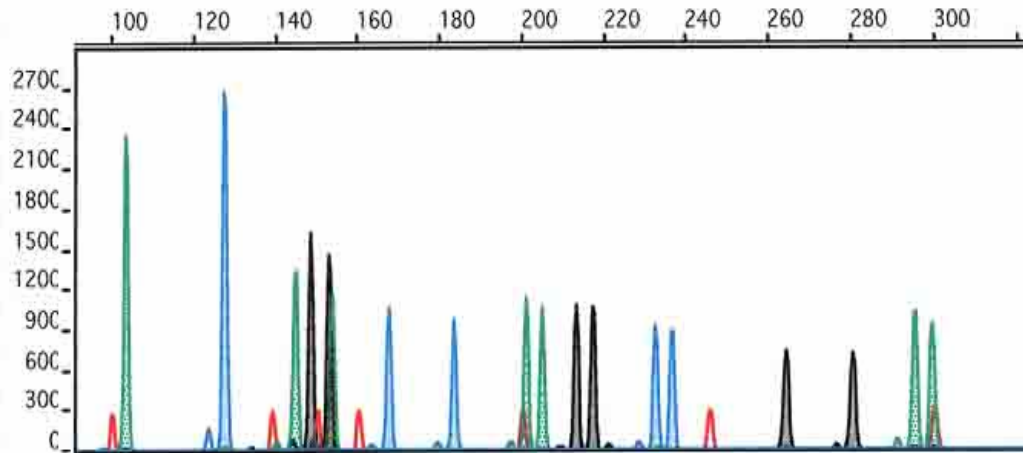
Fingerprinting:



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