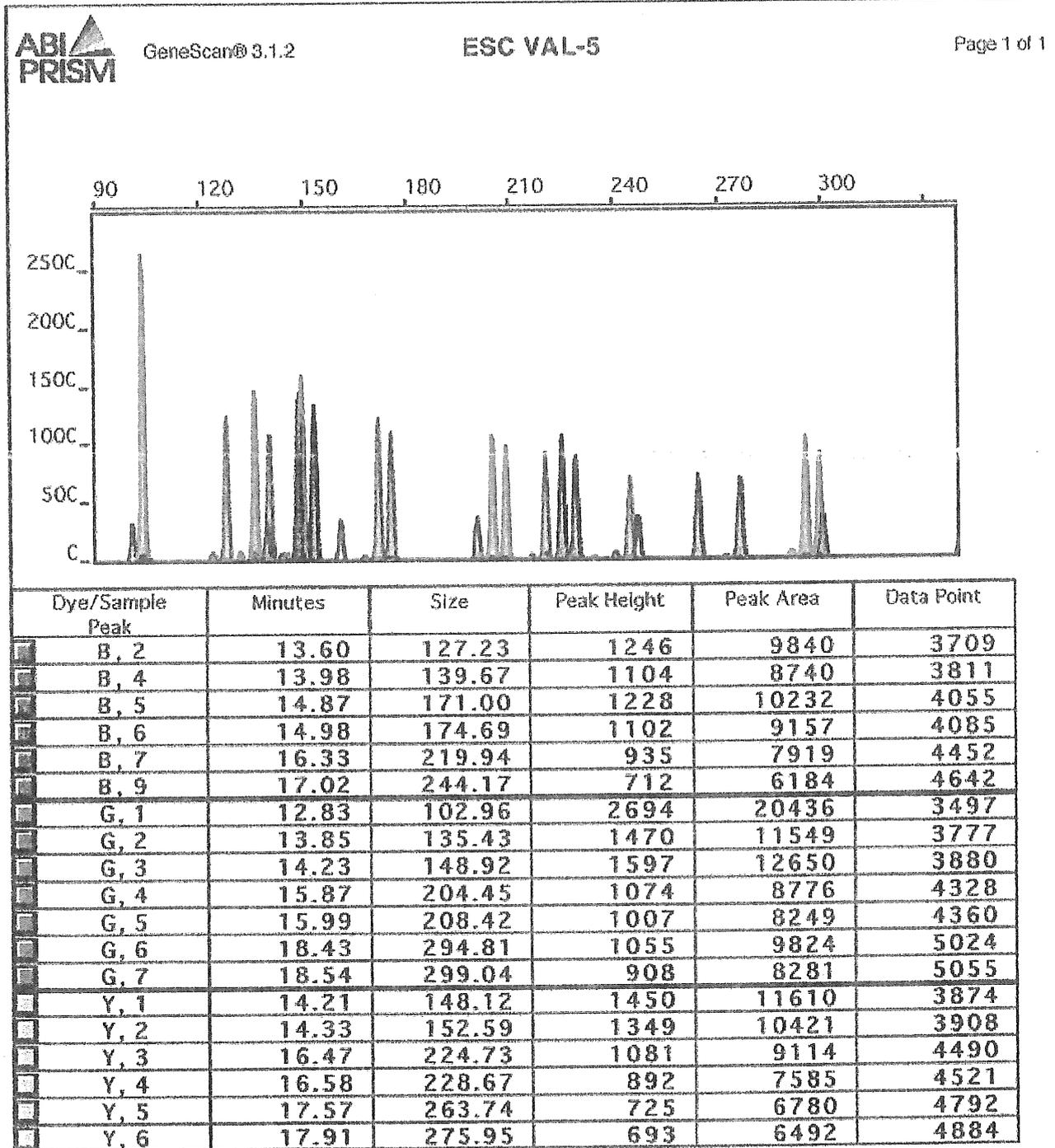


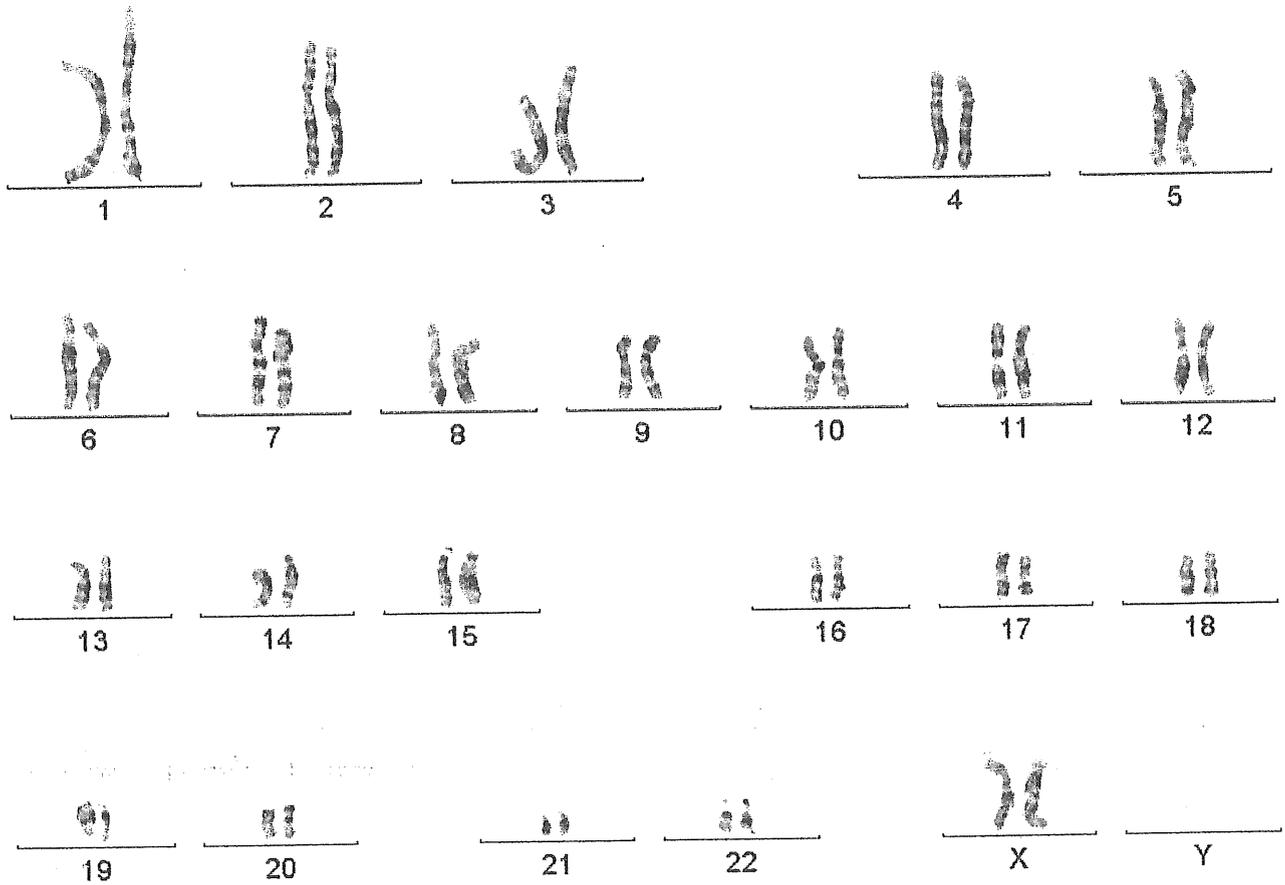
VAL-5

Datos biológicos necesarios para determinar la trazabilidad y el tipaje de VAL-5

-Estudio del fingerprinting de la línea mediante marcadores polimórficos



-Estudio del cariotipo de VAL-5 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 5

Muestra: DNA genómico, 1.88 µg/µl

HLA-A*0101, HLA-A*2402
HLA-B*0801, HLA-B*4403; Bw4, Bw6
HLA-C*0202, HLA-C*0701
HLA-DRB1*0301, HLA-DRB1*0402
HLA-DRB3*0101, HLA-DRB4*0103
HLA-DQA1*0501, HLA-DQA1*030101
HLA-DQB1*0201, HLA-DQB1*0302
HLA-DPB1*0201, HLA-DPB1*0401

Valencia, a 23 de agosto de 2006

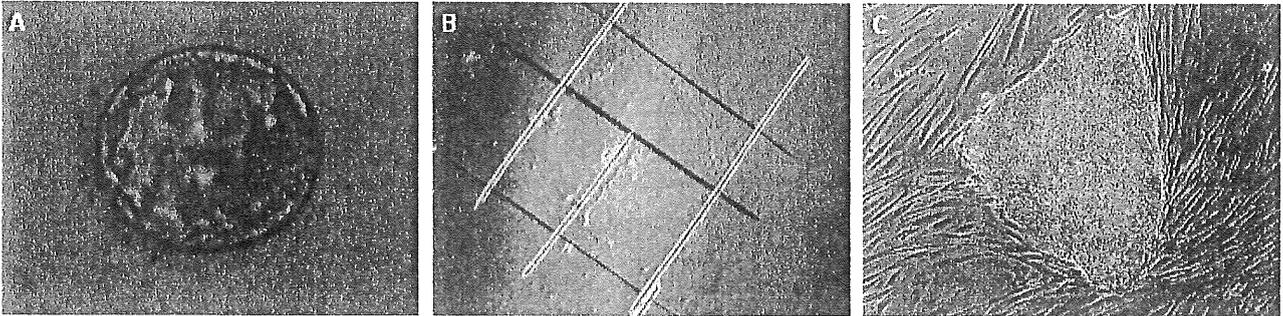
Fdo. Dra. D. Planelles
Laboratorio de Biología Molecular-Histocompatibilidad



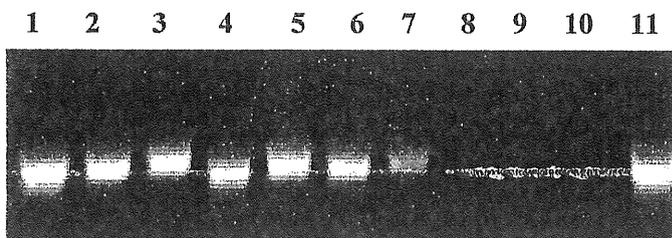
Laboratorio de Histocompatibilidad acreditado por la
"European Federation for Immunogenetics"

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

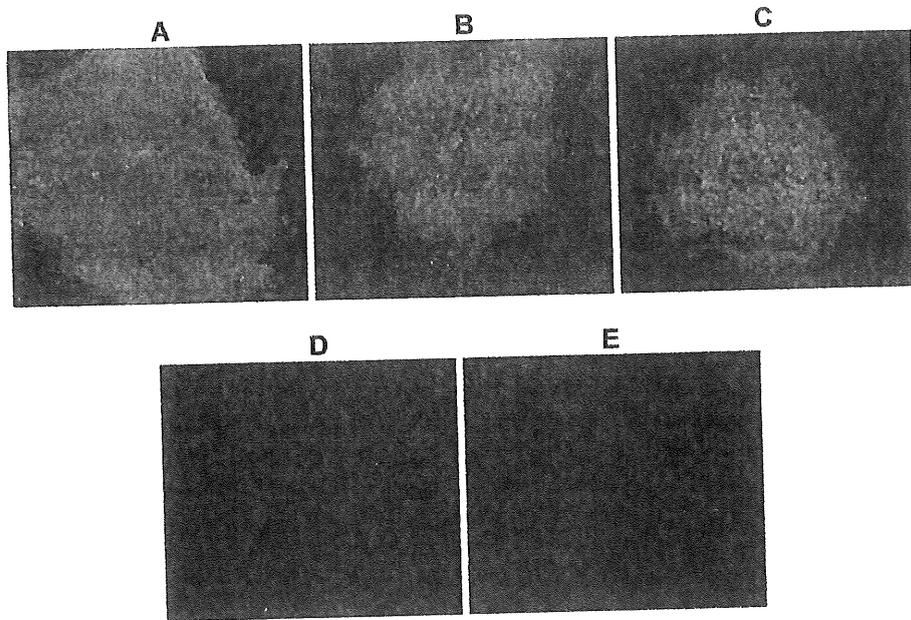
-Morfología compatible. (A) Blastocisto, (B) primer corte, (C) morfología típica de una colonia.



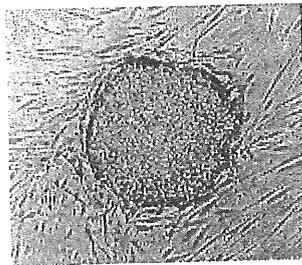
-Expresión de marcadores moleculares de indiferenciación RT-PCR ha sido positiva para Oct-4 (1), Sox-2 (2) Rex-1 (3), Nanog (4), CR1 (5), Thy-1 (6) y Lefty-A (7) así como negativa para Nfh (8), Ren (9) y Amy (10). El control interno de expresión utilizado es Gapdh (11)



-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).

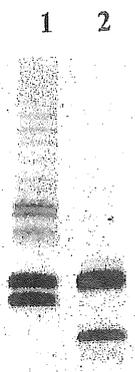


-Ensayos de actividad de fosfatasa alcalina mediante un kit comercial (Chemicon, Temecula, CA) se comprobó la actividad fosfatasa alcalina positiva para más del 90% de las colonias.

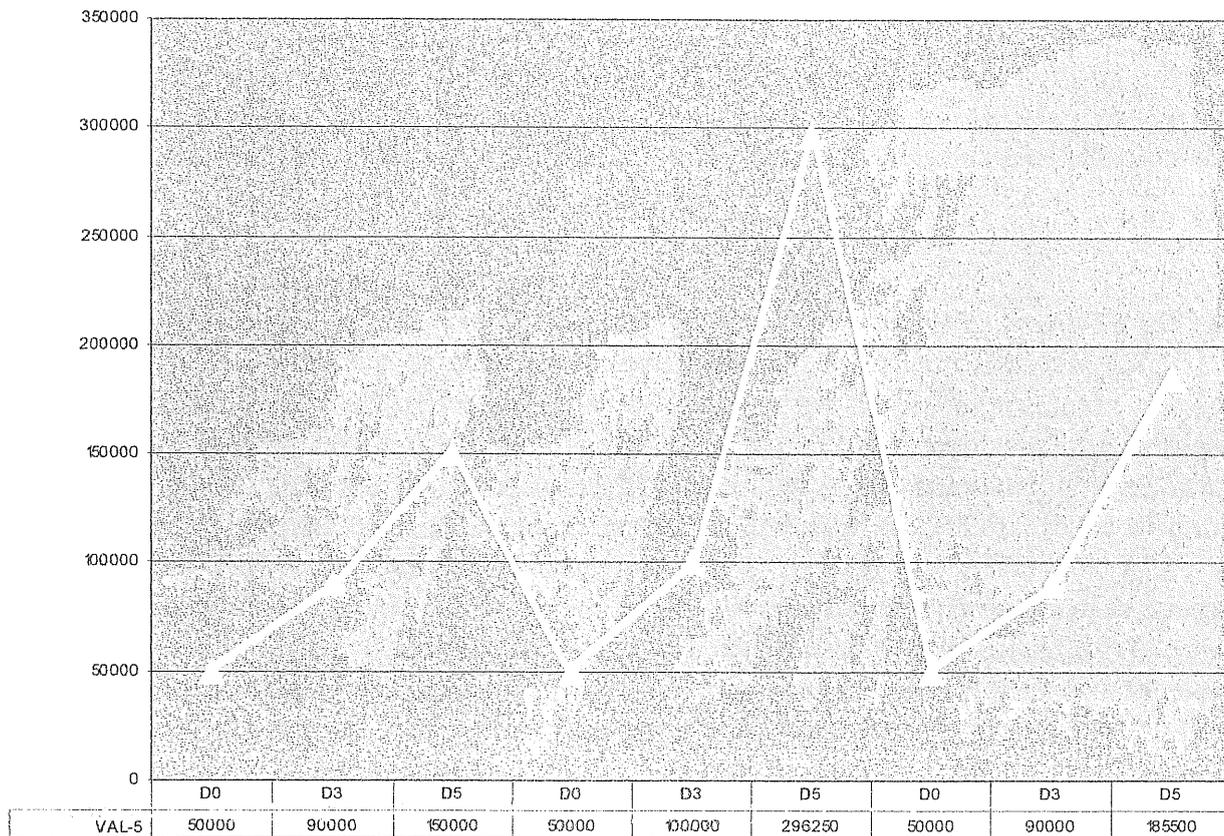


-Determinación de la existencia de actividad telomerasa.

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 10 pases y curva de crecimiento en fresco.



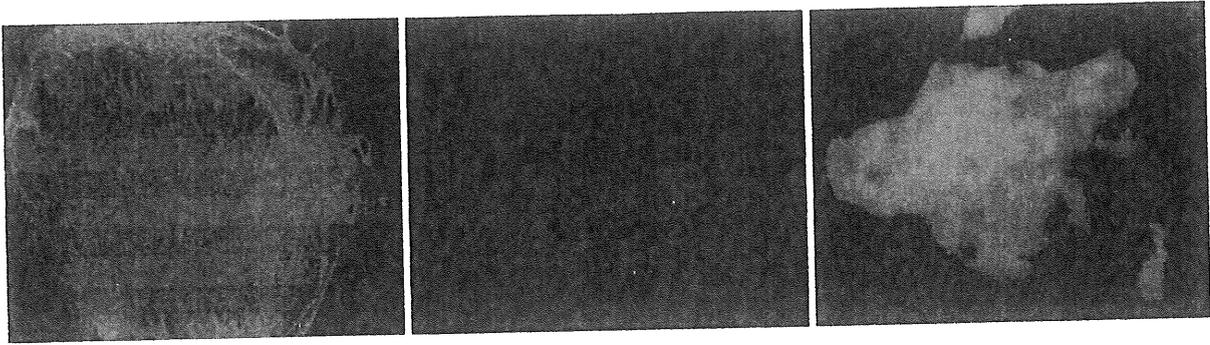
-Diferenciación espontánea en cultivo, a células de las tres hojas embrionarias.

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, β -III), (B)mesodermo (actina muscular) y (C)endodermo (α -fetoproteína).

A

B

C



-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.

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

