



PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

ANEXO



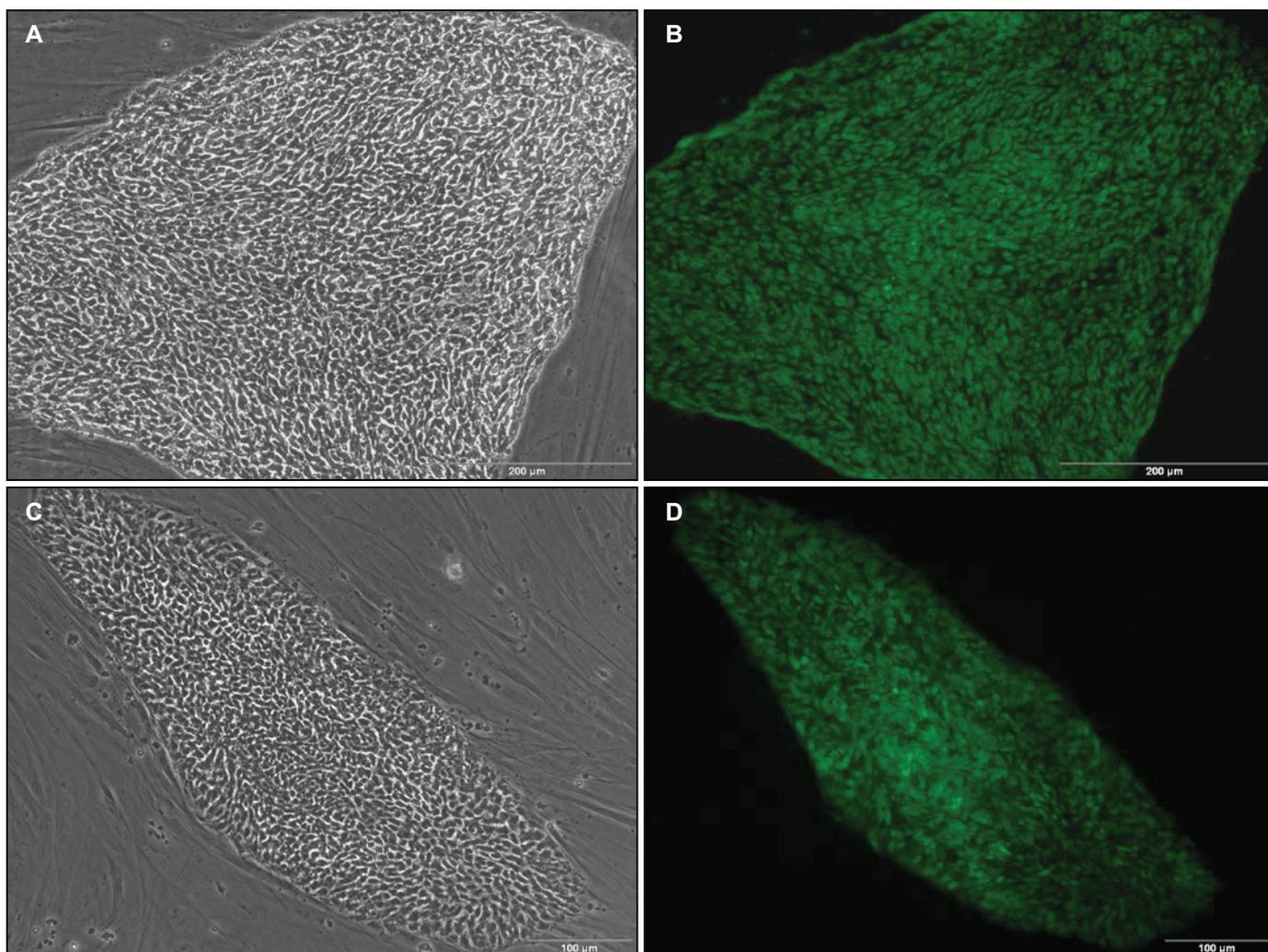
PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

MORFOLOGÍA DE VAL-9-GFP

Morfología típica colonias de VAL-9-GFP. Barra de escala = 200 μm (A) y (B) ; 100 μm (C) y (D).





PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

TIPIFICACIÓN HLA DE VAL-9-GFP

Llevado a cabo en el pase 27, por el Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana.

GENERALITAT VALENCIANA CONSELLERIA DE SANITAT	
AGÈNCIA VALENCIANA DE SALUT Centre de Transfusió de la Comunitat Valenciana	
Doctor Centro Servicio Dirección	<i>A/A</i> <i>VERÓNICA RUIZ</i> CENTRO DE INVESTIGACION PRINCIPE FELIPE BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (I-AS) AVDA. AUTOPISTA DEL SALER, 16-3 46012 VALENCIA
INFORME DE MUESTRAS EXTERNAS	
Paciente - VAL- 9 GFP P27 Nº Pac. 060045009- (HC.) (SIP:) 	Fecha Pet. 27-ene-2010 Nº Toma 60655347 S/Ref.
HISTOCOMPATIBILIDAD.	
TIPAJE HLA. CLASE-I POR BIOLOGIA MOLECULAR DE ALTA RESOLUCION (PCR-SSP/SSO)	
Locus HLA – A :	A*0201 A*1101
Locus HLA – B :	B*0702 B*5101
Locus HLA – Cw :	Cw*0202 Cw*0702
TIPAJE HLA. CLASE-II POR BIOLOGÍA MOLECULAR DE ALTA RESOLUCION (PCR-SSP/SSO)	
Locus HLA – DRB1:	DRB1*1101 DRB1*1501
Locus HLA – DRB3:	DRB3*0202 -
Locus HLA – DRB4:	
Locus HLA – DRB5:	DRB5*0101 -
Locus HLA – DQA1:	DQA1*0505 DQA1*0102
Locus HLA – DQB1:	DQB1*0301 DQB1*0602
Locus HLA – DPB1:	DPB1*0401 DPB1*0501
OBSERVACIONES	
Validado por Facultativo	
Valencia, 04 de marzo de 2010	

Laboratori de Histocompatibilitat acreditat per la
Fundació Espanyola per la Histocompatibilitat



Centre de Transfusió de la Comunitat Valenciana · AGÈNCIA VALENCIANA DE SALUT
Avda. del Cid, 65 Acc - 46014 VALÈNCIA - Tel. 96 386 81 00 - Fax 96 386 81 69



PRINCIPE FELIPE

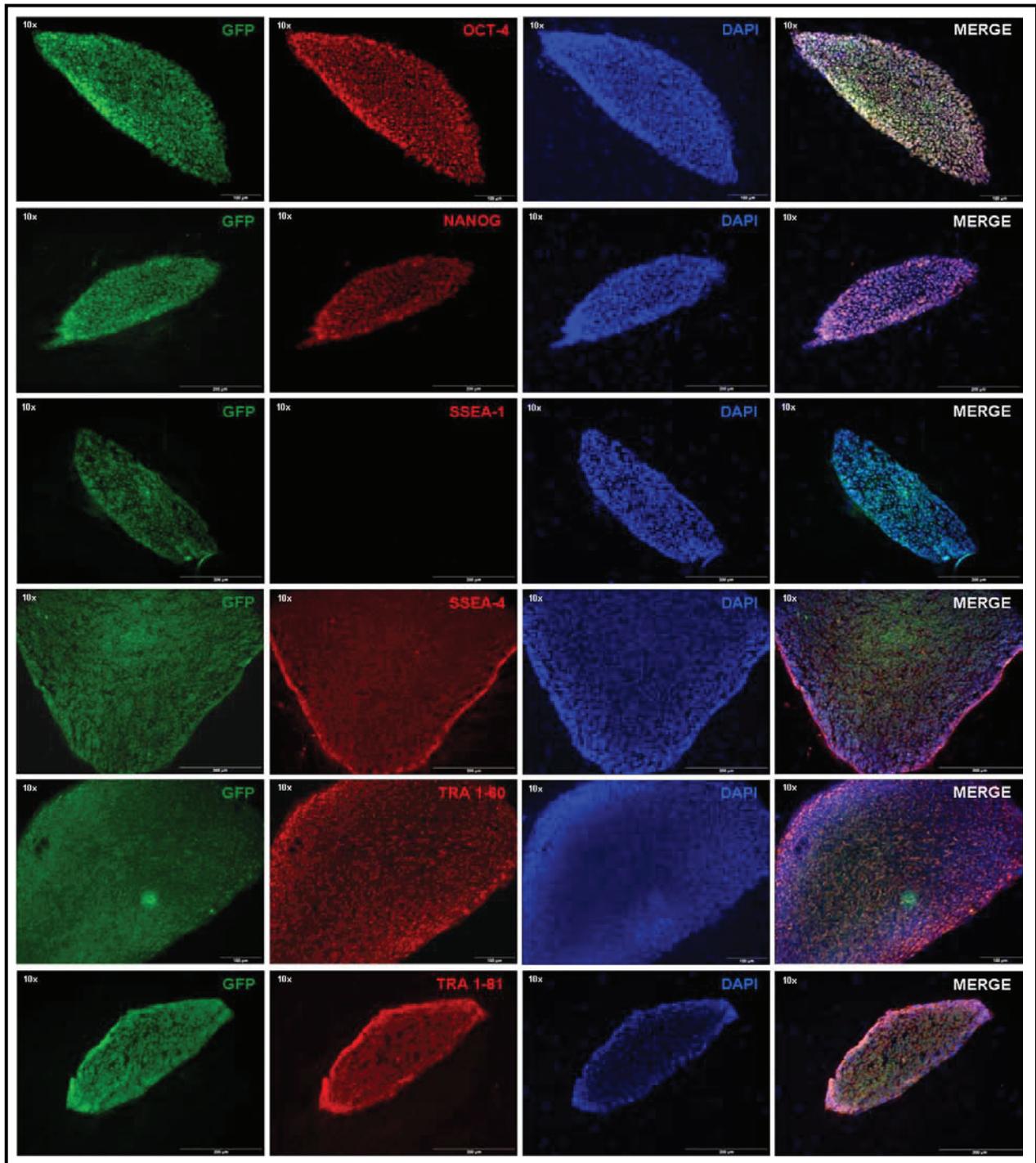
CENTRO DE INVESTIGACION

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

MARCADORES INDIFERENCIACIÓN DE VAL-9-GFP

Expresión de antígenos de indiferenciación en VAL-9-GFP

Inmunocitoquímica para OCT-4 (Chemicon, Temecula, CA), Nanog (R&D, Minneapolis, MN), SSEA-1 (C), SSEA-4 (D), Tra-1-60 (E) y Tra-1-81 (F) (Chemicon, Temecula, CA).



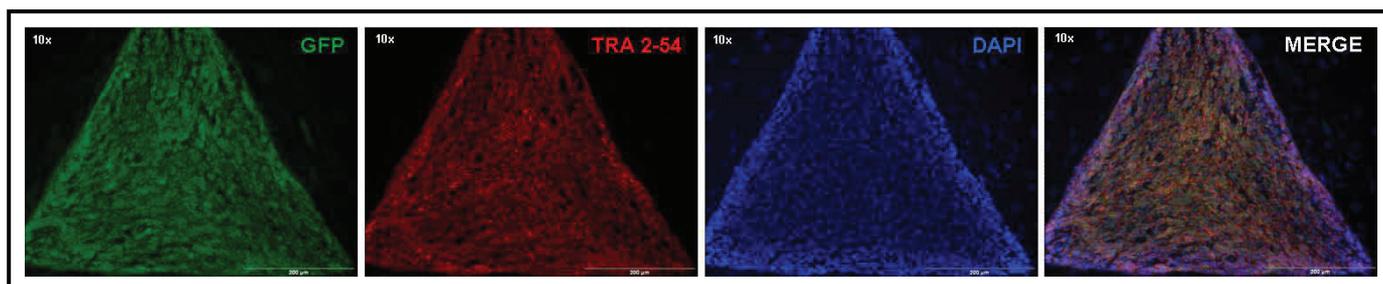


PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

Ensayos de actividad de fosfatasa alcalina en VAL-9-GFP

Inmunocitoquímica para isoenzima Fosfatasa Alcalina clon TRA 2-54/2J (Chemicon, Temecula, CA) (A). Barra de escala = 200 μ m.



Expresión de marcadores moleculares de indiferenciación de VAL-9-GFP

RT-PCR positiva en fase 26 para Oct-3/4 (1), Nanog (2) Cripto (3), Dnmt3 (4), Gabr (5), y Gdf3 (6) y negativa para Nfh (7), Ren (8) y Amy (9). El control interno de expresión utilizado es RPL19 (10).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10





PRINCIPE FELIPE

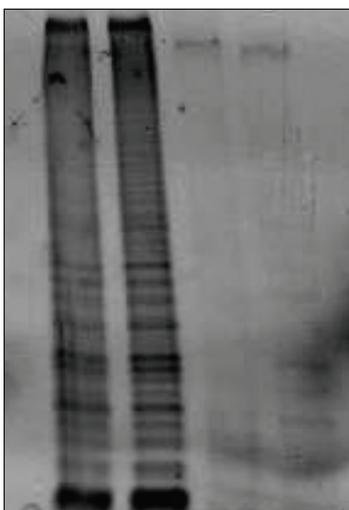
CENTRO DE INVESTIGACION

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

Determinación de la existencia de actividad telomerasa en VAL-9-GFP

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). El análisis de la actividad telomerasa se realizó sobre células intactas de VAL-9-GFP en pase 26 (2), utilizando otra línea de células madre embrionarias humanas como control positivo (1). Como controles negativos, se utilizaron fibroblastos (3) y células de VAL-9-GFP inactivadas por calor (4).

1 2 3 4





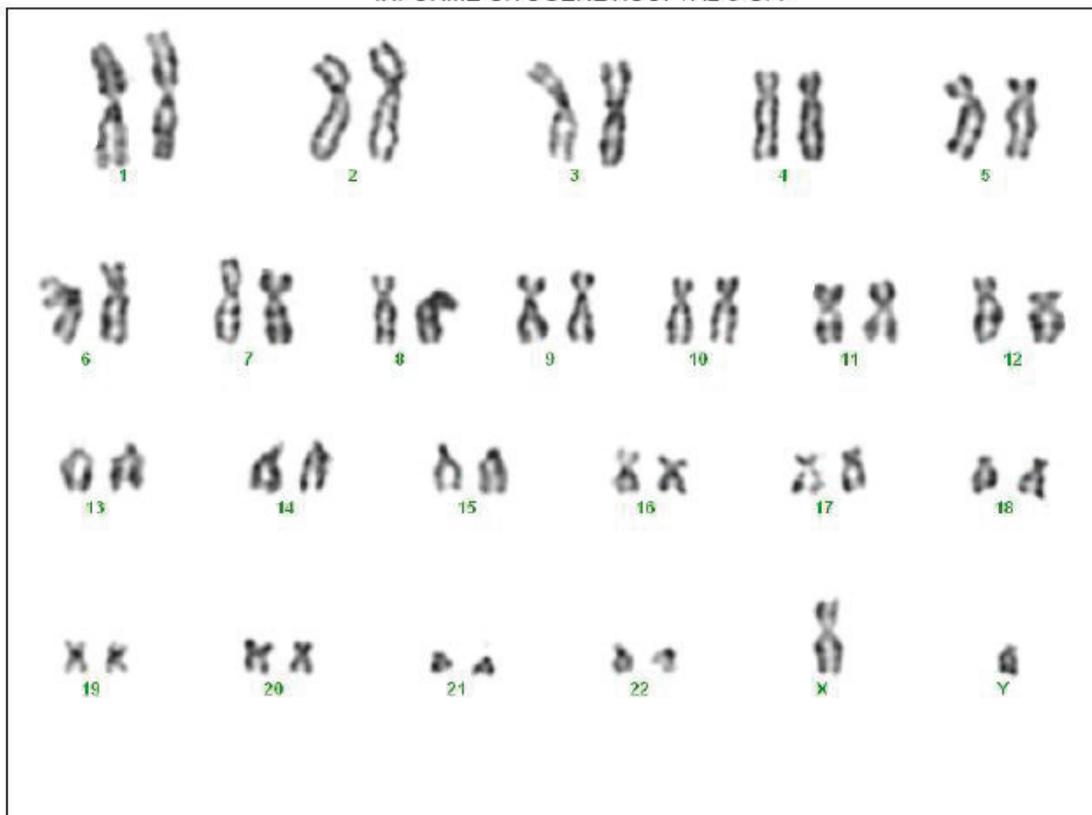
PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

ESTUDIO DEL CARIOTIPO DE VAL-9-GFP

Llevado a cabo en el pase 26, por un laboratorio independiente (IVI Murcia, España).

INFORME CITOGÉNÉTICO: VAL-9 GFP



Nombre del caso: VAL-9 GFP

Fecha: 20/11/2009

Nombre del Paciente: Pase 26

Tipo de muestra: Línea celular

Resultado: 46,XY [15]



El análisis cromosómico de 15 metafases mediante bandas GTG revela un CARIOTIPO MASCULINO NORMAL.

Dra. C Méndez

Dra. MC Martínez



PRINCIPE FELIPE

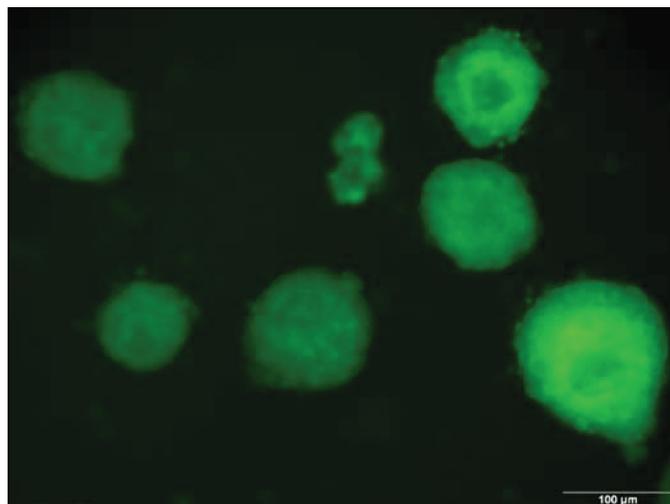
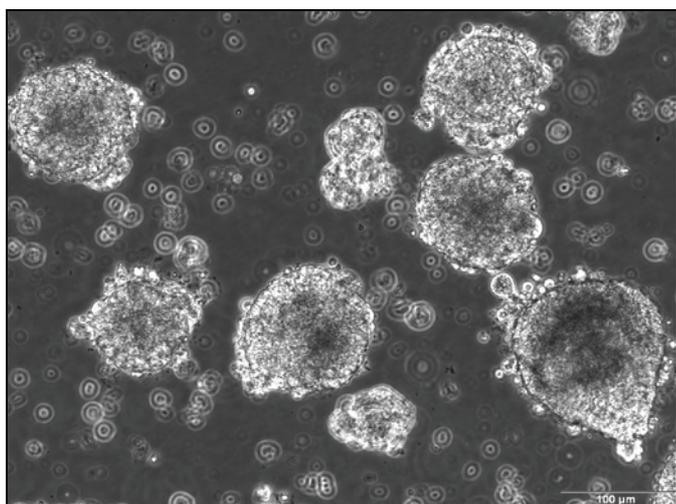
CENTRO DE INVESTIGACION

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

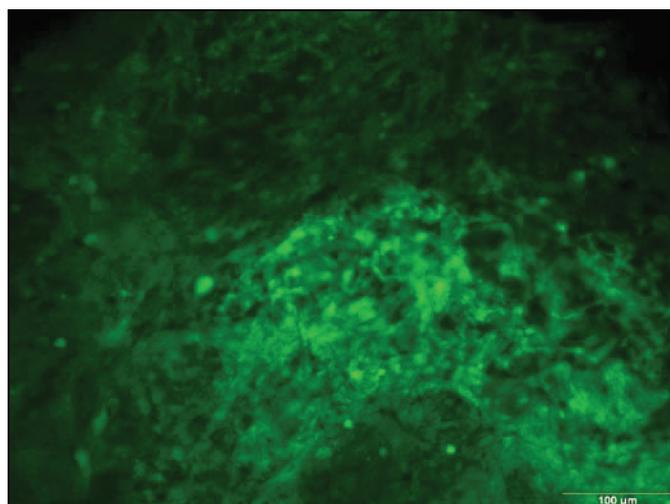
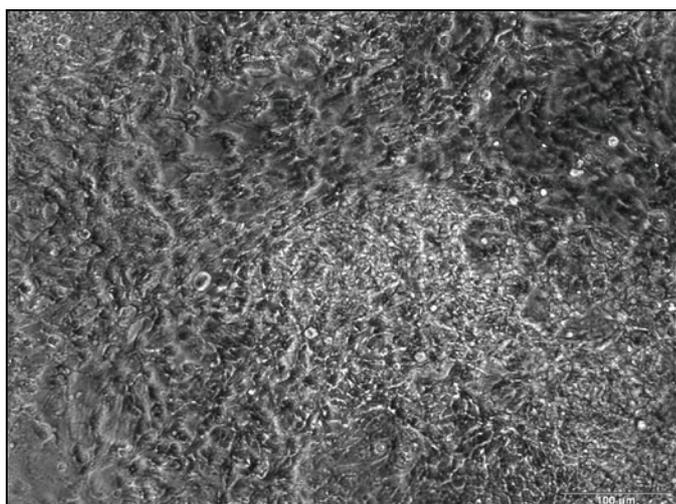
PLURIPOTENCIALIDAD DE VAL-9-GFP

Diferenciación espontánea *in vitro* de VAL-9-GFP

Por flotación, en placas de no adhesión, se generan cuerpos embrioides y se mantienen en esas condiciones entre 4 y 7 días. Barra de escala = 100 μ m.



Transcurrido ese tiempo, los cuerpos embrioides se transfieren a placas cubiertas con gelatina 1% para facilitar su adhesión. Durante el cultivo en placa, se obtuvieron diferentes tipos celulares y se mantuvo la expresión de proteína verde fluorescente (GFP). Barra de escala = 100 μ m.

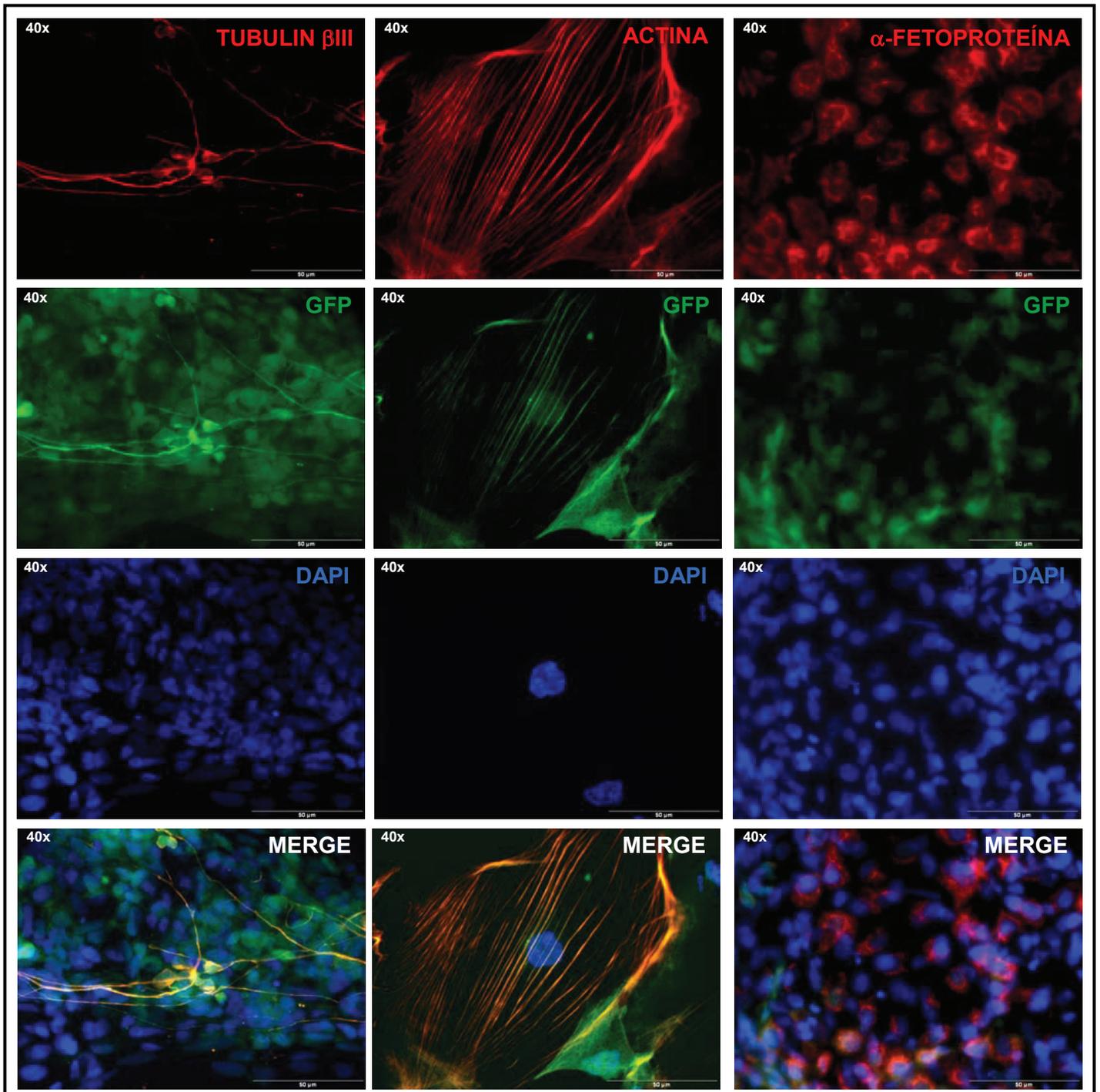




PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

Tras 10-14 días, se fijan y se analizan marcadores de diferenciación característicos de ectodermo (tubulin β -III), mesodermo (actina muscular) y endodermo (α -fetoproteína). Barra de escala = 50 μ m.





PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

Diferenciación espontánea *in vivo* de VAL-9-GFP

Para desarrollar los experimentos de diferenciación *in vivo* de las líneas, se utilizan ratones macho de 8 semanas de edad, con inmunodeficiencia severa combinada (SCID). Las colonias de células madre utilizadas se aíslan mecánicamente de la monocapa de feeder. Se inyectan 30 colonias 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 4 semanas más, momento en el que los animales se sacrifican por asfixia con dióxido de carbono.





PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

Las muestras son fijadas y enviadas para estudio anatomopatológico por parte de un laboratorio independiente (CITOPAT, S.L.).

CITOPAT S.L.

C/Micer Mascó 7-8ª
46010 Valencia

ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

Paciente: CIPF
Médico remitente:
Fecha de recepción: 24/03/2010

Edad:
Sexo: Masculino

MUESTRAS RECIBIDAS:

TESTICULOS CONTROL, 2 MUESTRAS DE SERIE VAL-9-GFP (N85 y N88) Y 1 MUESTRA DE SERIE H9-GFP (N91)

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA:

CONTROL: Teste de 0,7 cm de diámetro máximo.

VAL-9-GFP (N85) Masa nodular de 3 x 2,5 cm de diámetro con predominio de áreas sólidas y presencia de algún área quística.

VAL-9-GFP (N88) Nódulo de 1,5 cm de diámetro de predominio quístico con área de aspecto parenquimatoso de 1 cm.

H9-GFP (N91) Nódulo de 2,5 cm de diámetro de predominio sólido con áreas quísticas y coloración parduzca.

DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO:

CONTROL: Testículo dentro de los límites de la normalidad con espermio y espermatogénesis conservadas.

VAL-9-GFP (N85): Teratoma sólido quístico con predominio de tejidos blandos, vasos, cartilago, hueso, epitelio de tipo digestivo, epitelio de tipo respiratorio, y tejido glandular tubuloacinar, así como tejido neural.

VAL-9-GFP (N88): Teratoma sólido quístico con componente ecto y endomesenquimal viéndose cartilago, hueso, neuroectodérmico, tejido glial, tejido muscular y menor componente epitelial.

H9-GFP (N91): Teratoma sólido quístico con predominio de tejido cartilaginoso y óseo, tejidos blandos con músculo, conectivo laxo, tejido adiposo unilocular, tejido hematopoyetico y células melánicas abundantes sueltas o en acúmulos con fuerte pigmentación citoplasmica.

Salida: 06/04/2010

Firmado:

Dra. Calabuig

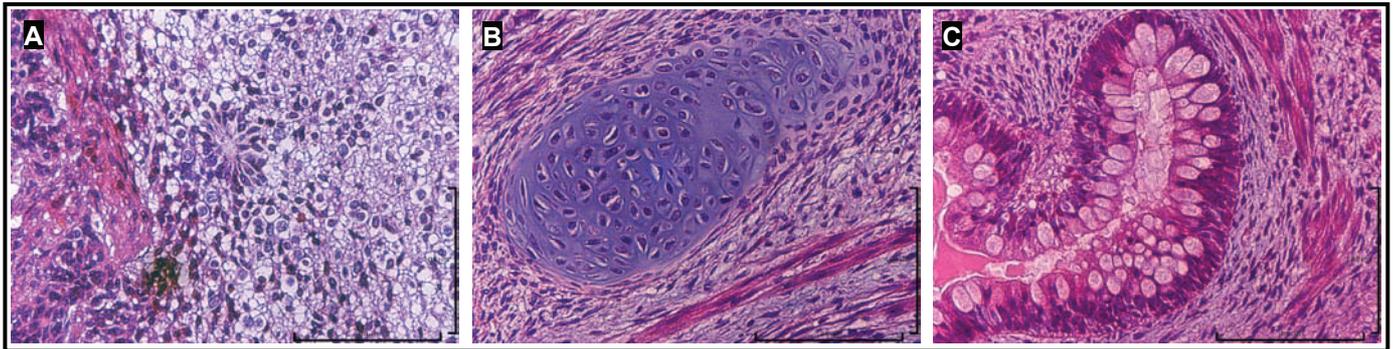
Página 1 de 1



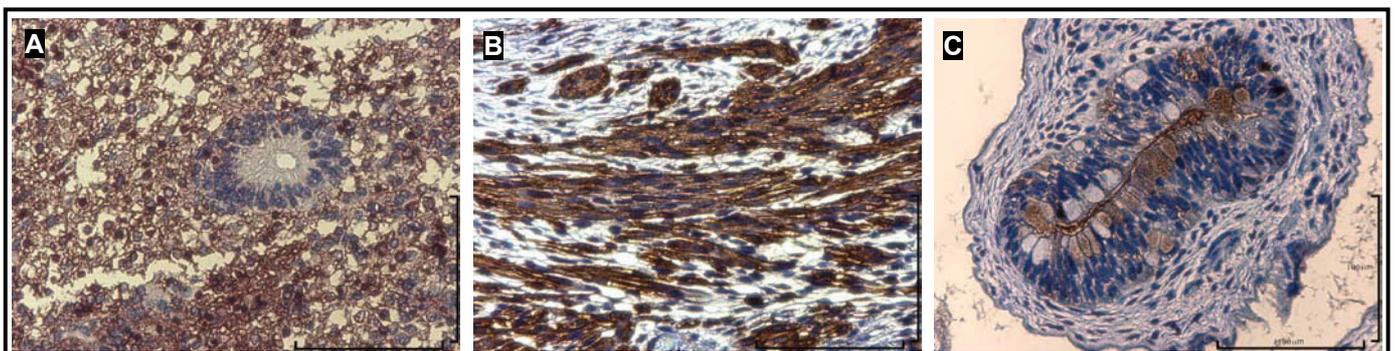
PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

Microscópicamente, la búsqueda se orienta hacia la identificación de tejidos fácilmente distinguibles como (A) roseta neural rodeada de entramado fibrilar, (B) nido de condrocitos o (C) glándula. Barra de escala = 100 μm .



Para confirmar la presencia de derivados de las tres hojas embrionarias, se analizan marcadores de diferenciación característicos de (A) ectodermo (tubulin, β -III), (B) mesodermo (actina muscular) y (C) endodermo (α -fetoproteína). Barra de escala = 100 μm .





PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE VAL-9-GFP

	Instituto Valenciano de Microbiología Masia El Romeral Ctra. Bétera - San Antonio de Benagéber, Km. 0,3 46117 Bétera (Valencia) Tel. 96 169 17 02 - Fax 96 169 16 37 e-mail: ivami@ivami.com -http://www.ivami.com
Nombre : VAL-9 P26 GFP	Nº Historia : No consta
Nº muestra : 11000071	F y H Recepción : 11/11/2009 9:26:50
Su referencia : VAL-9 P26 GFP	
Doctor/ra : No consta	F. Extracción : No consta
Centro : CENTRO INVESTIG. PRÍNCIPE FELIPE (I-15)	H. Extracción : No consta
Tipo muestra : Células y medio de cultivo	
Condiciones : Congelada	
Observaciones: A/A Verónica Ruiz, Mª Eugenia Poo	
Banco de Lineas Celulares	
Detección de ADN de Mycoplasma spp. contaminantes mediante PCR PCR "nested-PCR"	
La detección de ADN de Mycoplasma spp. contaminantes (M. arginini, M. fermentans, M. hyorhinis, Acholeplasma laidlawii, etc...) en cultivos celulares, mediante doble amplificación enzimática de la región genómica 16S y 23S del ARNr (ARN ribosómico), con dos series de cebadores, ha resultado:	
Negativo	
	
FINAL	18 de noviembre de 2009 Encarna Esteban Bermúdez
<small>Procesa Impresión: 10/11/2009 10:31:28</small>	<small>Página 1 de 1</small>
<small>Registro mercantil de Valencia, tomo 5093, libro 2311, sección 6, folio 68, hoja n.º 227131, inscripción 1.º-C.I.F. B-96337317</small>	



PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LINEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

L A B O R A T O R I O
A N Á L I S I S
C L Í N I C O S



DR. JAVIER BAGUENA
DR. MIGUEL GOBERNADO
DR. JOAQUIN MAIGUEZ

Fecha Ext. Hora Referencia
08/04/2010 12:52 328385-166
Fecha Recepción: 30/03/2010
Lab. nº Registro 5888

Paciente: VAL-9 -GFP PASE 30,
Cód. Paciente: 119644
Solicitante: BANCO DE LINEAS CELULARES (I-15)
Destino: CIPF-FVIB

MICROBIOLOGIA

INVESTIGACION MICOLOGICA

MUESTRA: VAL-9-GFP PASE 30

CULTIVO HONGOS

RESULTADO: NEGATIVO

CULTIVO BACTERIOLOGICO

MUESTRA: VAL-9-GFP PASE 30

RESULTADO: NEGATIVO

Observaciones:

Los medios de cultivo utilizados para la realización de los cultivos bacteriológicos de estas muestras han sido: Agar Sangre, Agar Chocolate, Agar MacConkey, Agar Saboreaud dextrosa en Aerobiosis y 10% CO2 y en medio de Schadler Agar Sangre en anaerobiosis

Observaciones:

nº pedido: 23090

Impreso en el Registro Municipal de Valencia, libro 7042, tomo 42145, folio 250, matriz nº 1693 V81317 - inscripción 1º

*Este informe solo afecta a las muestras analizadas Fecha Primera Impresión: 08/04/2010 12:59:07
Este documento no puede reproducirse total/parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.*

jueves, 08 de abril de 2010
El Responsable de Análisis
Dra. Patricia Albert

Página 1 de 1

NIVIUK, S.L. C.I.F. B. 97/154199
C/Callosa de Ensarriá, 6_bajo (46007) Valencia
tel. 963107491 fax. 963107492

CENTRO PERIFÉRICO DE EXTRACCIÓN
C/Guadassuar, 1_bajo (46015) Valencia
tel. 963049494 fax. 963455514



PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

SOPORTE CELULAR

Ficha técnica y análisis microbiológicos del Feeder utilizado en la derivación y mantenimiento de la línea:

ATCC Product Information Sheet for CRL-2429

Product: CRL-2429
Lot No.: 3117903

Description: CCD-1122Sk Description: Skin fibroblast; Human
Total Cells/mL: 9.0 x 10⁶
Expected Viability: 96% to 97%
Amplify Passage No.: 5
Population Doubling (PDL): 15
Dilute Ampule Content: 1:15 in a T-75 flask
Volume/Ampule: 1 mL
Date Frozen: 0916/03

A T-75 setup at a dilution of 1:15, using IMDM with 10% FBS, reaches confluence in 7 days.

American Type Culture Collection
10801 University Blvd.
Manassas, VA 20108-2200

Phone: 800-638-6597 or 703-365-2700
Fax: 703-365-2750 E-mail: sales@atcc.org
Web site: www.atcc.org

Instituto Valenciano de Microbiología

Masia El Roseral
Cm. Bétera - San Antonio de Benagüel, Km. 0,3
46117 Bétera (Valencia)

Tel. 96 169 17 02
Fax 96 169 16 37
e-mail: ivami@ivemil.es
www.ivami.com

Nombre.....: Foreskine - 1
Nº muestra.....: 10700001
Referencia.....:
Doctor.....:
Centro.....: Fundación IVI
Dirección.....: C/ Guadassuar nº 1 bajo

Fecha.: 27/09/04
Fax...: 963455512

Pruebas de esterilidad de cultivo celular

Tipo de cultivo celular: células FSP13 y medio de cultivo

Muestras preparadas y suministradas por:
Fundación del Instituto Valenciano de Infertilidad

Fecha de recepción: 27 de septiembre de 2004

Prueba de esterilidad para crecimiento de bacterias habituales según norma FDA 21 CFR 610.12.
Muestra: suspensión de 6 x 10⁶ células.
Tiempo de cultivo: 15 días.
Medios de cultivo utilizados: medio líquido de tioglicolato y medio Soybean Casein Digest.
Resultado: Negativo (ausencia de crecimiento bacteriano)

Investigación de Mycoplasma spp.
Muestra: suspensión de 5 x 10⁶ células
Método utilizado: Mycotec™ con células indicadoras 3T6
Resultado: Negativo (ausencia de Mycoplasma spp.)

Investigación de endotoxinas
Muestra: medio de cultivo libre de células
Método utilizado: Prueba LAL (Limulus Amoebocyte Lysate) cromogénica QCL-1000.
Resultado: < 0.1 EU/mL

Investigación de Citomegalovirus
Muestra: ADN extraído de 2 x 10⁶ células
Método utilizado: doble PCR con secuencia del gen Immediate Early-1 (IEA-1)
Resultado: Negativo (ausencia de genoma de Citomegalovirus)

Registro mercantil de Valencia, tomo 3083, libro 2111, sección 6, folio 66, hoja nº 9/3121, inscripción 1ª - C.I.F. B-66337117

Instituto Valenciano de Microbiología

Masia El Roseral
Cm. Bétera - San Antonio de Benagüel, Km. 0,3
46117 Bétera (Valencia)

Tel. 96 169 17 02
Fax 96 169 16 37
e-mail: ivami@ivemil.es
www.ivami.com

Nombre.....: Foreskine - 1
Nº muestra.....: 10700001
Referencia.....:
Doctor.....:
Centro.....: Fundación IVI
Dirección.....: C/ Guadassuar nº 1 bajo

Fecha.: 27/09/04
Fax...: 963455512

Investigación de virus de Epstein-Barr
Muestra: ADN extraído de 2 x 10⁶ células
Método utilizado: doble PCR con secuencia del gen de proteína de cápside p23 (gen BLRF2).
Resultado: Negativo (ausencia de genoma de virus de Epstein-Barr)

Investigación de virus de Hepatitis B
Muestra: ADN extraído de 2 x 10⁶ células
Método utilizado: doble PCR con secuencia del gen HBV precore y gen HBV surface antigen.
Resultado: Negativo (ausencia de genoma de virus de hepatitis B)

Investigación de virus de Hepatitis C
Muestra: ADN extraído de 2 x 10⁶ células
Método utilizado: doble PCR con secuencia del gen de la región NS5A.
Resultado: Negativo (ausencia de genoma de virus de hepatitis C)

Investigación de virus de Herpes humano tipo 6 (variante A)
Muestra: ADN extraído de 2 x 10⁶ células
Método utilizado: doble PCR con secuencia de los genes MCP (Major Capsid Protein) y LTP (Large Tegument Protein) y posterior secuenciación.
Resultado: Negativo (ausencia de genoma de virus Herpes humano tipo 6 variante A)

Investigación de virus de Herpes humano tipo 6 (variante B)
Muestra: ADN extraído de 2 x 10⁶ células
Método utilizado: doble PCR con secuencia de los genes MCP (Major Capsid Protein) y LTP (Large Tegument Protein) y posterior secuenciación.
Resultado: Negativo (ausencia de genoma de virus Herpes humano tipo 6 variante B)

Investigación de virus de Inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIN-1)
Muestra: ADN extraído de 2 x 10⁶ células.
Método utilizado: doble PCR con secuencia de los genes gag y pol.
Resultado: Negativo (ausencia de genoma de virus de Inmunodeficiencia humana tipo 1)

Registro mercantil de Valencia, tomo 3083, libro 2111, sección 6, folio 66, hoja nº 9/3121, inscripción 1ª - C.I.F. B-66337117

Instituto Valenciano de Microbiología

Masia El Roseral
Cm. Bétera - San Antonio de Benagüel, Km. 0,3
46117 Bétera (Valencia)

Tel. 96 169 17 02
Fax 96 169 16 37
e-mail: ivami@ivemil.es
www.ivami.com

Nombre.....: Foreskine - 1
Nº muestra.....: 10700001
Referencia.....:
Doctor.....:
Centro.....: Fundación IVI
Dirección.....: C/ Guadassuar nº 1 bajo

Fecha.: 27/09/04
Fax...: 963455512

Investigación de virus de Inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2)
Muestra: ADN extraído de 2 x 10⁶ células.
Método utilizado: doble PCR con secuencia de los genes pol y env.
Resultado: Negativo (ausencia de genoma de virus de Inmunodeficiencia humana tipo 2)

Investigación de virus HTLV-1/II
Muestra: ADN extraído de 2 x 10⁶ células
Método utilizado: doble PCR con secuencia del gen tax/rev y posterior secuenciación.
Resultado: Negativo (ausencia de genoma de virus HTLV-1/II)

Investigación de Parvovirus
Muestra: ADN extraído de 2 x 10⁶ células.
Método utilizado: doble PCR con secuencia del gen VP1-VP2
Resultado: Negativo (ausencia de genoma de Parvovirus)

Investigación de Transcriptasa reversa.
Muestra: Medio libre de células de cultivo en fase exponencial.
Método utilizado: Transcripción reversa con molde de virus Brome Mosaic Virus (BMV).
Resultado: Negativo (ausencia de transcriptasa reversa)

Pdo. Técnicos responsables

Valencia, 22 de octubre 2004
E. Esteban (Dirección técnica)

Registro mercantil de Valencia, tomo 3083, libro 2111, sección 6, folio 66, hoja nº 9/3121, inscripción 1ª - C.I.F. B-66337117