



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

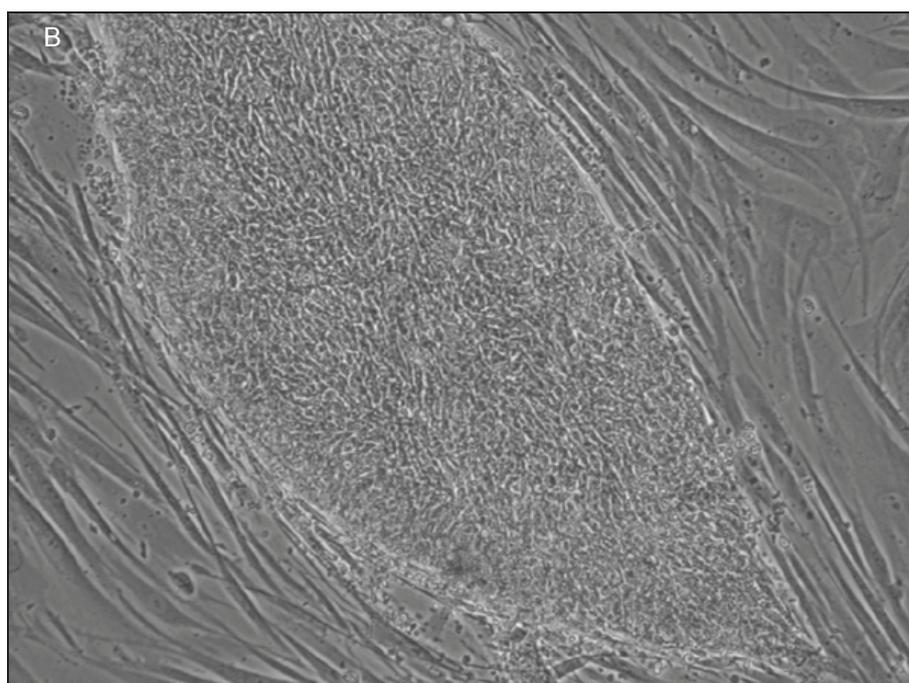
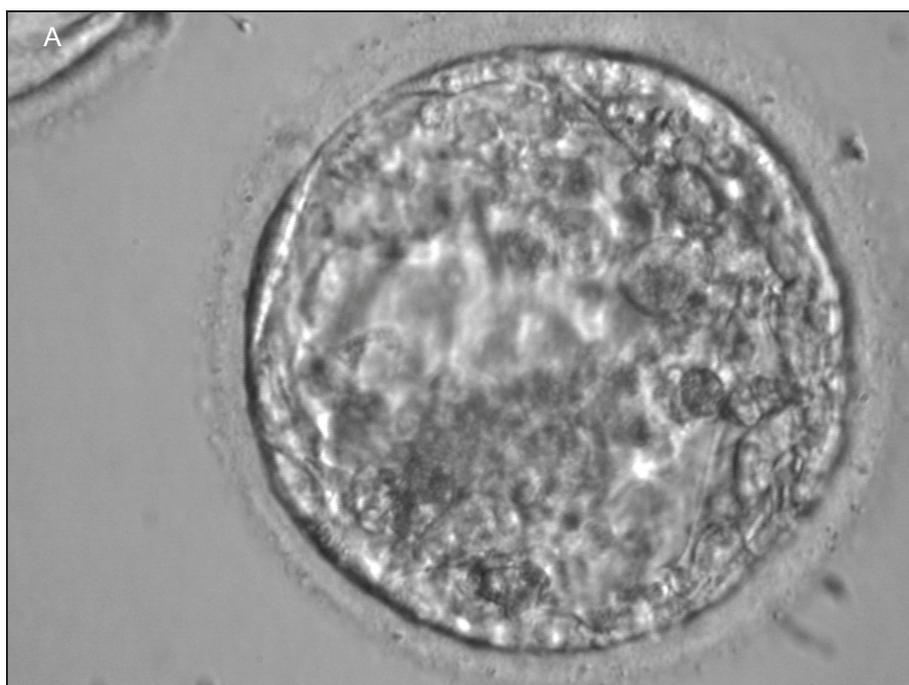
ANEXO



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

MORFOLOGÍA DE VAL-8

(A) Blastocisto (40x), (B) morfología típica de una colonia de VAL-8 (10x).





PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

TIPIFICACIÓN HLA DE VAL-8

Llevado a cabo en el pase 7, 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	<i>EVA GÓMEZ</i> CENTRO DE INVESTIGACION PRINCIPE FELIPE
		Servicio Dirección	
INFORME DE MUESTRAS EXTERNAS			
Paciente	- VAL- 8	Fecha Pet.	08-sep-2008
Nº Pac.	0600273708 (HC:) (SIP:)	Nº Toma	60632576
		s/ref	
HISTOCOMPATIBILIDAD.			
TIPAJE HLA. CLASE-I POR BIOLOGÍA MOLECULAR DE BAJA RESOLUCION (PCR-SSP/SSO)			
	Eqv. Serolo	Alelos Amplificados	
Locus HLA – A :	A2, A31(19)	A*0201	A*31
Locus HLA – B :	B7, B40	B*07	B*40
Locus HLA – Cw :	Cw3, Cw7	Cw*03	Cw*07
TIPAJE HLA. CLASE-II POR BIOLOGÍA MOLECULAR DE BAJA RESOLUCION (PCR-SSP/SSO)			
	Eqv. Serolo	Alelos Amplificados	
Locus HLA – DRB1:	,		
Locus HLA – DRB3:	,		
Locus HLA – DRB4:	,		
Locus HLA – DRB5:	,		
Locus HLA – DQA1:	-, -	DQA1*01	DQA1*03
Locus HLA – DQB1:	,		
Locus HLA – DPB1:	,		
TIPAJE HLA. CLASE-II POR BIOLOGÍA MOLECULAR DE ALTA RESOLUCION (PCR-SSP/SSO)			
	Eqv. Serolo	Alelos Amplificados	
Locus HLA – DRB1:	DR103, DR4	DRB1*0103	DRB1*0404
Locus HLA – DRB3:	,		
Locus HLA – DRB4:	,		
Locus HLA – DRB5:	,		
Locus HLA – DQA1:	,		
Locus HLA – DQB1:	DQ5(1), DQ8(3)	DQB1*0501	DQB1*0302
Locus HLA – DPB1:	,	DPB1*0202	DPB1*0401
OBSERVACIONES			
S e precisa nueva muestra para completar tipaje de alta resolucion de clase-I			
Fdo: Dr. José A. Montoro / Dra. Nieves Puig			
<small>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 09</small>			

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

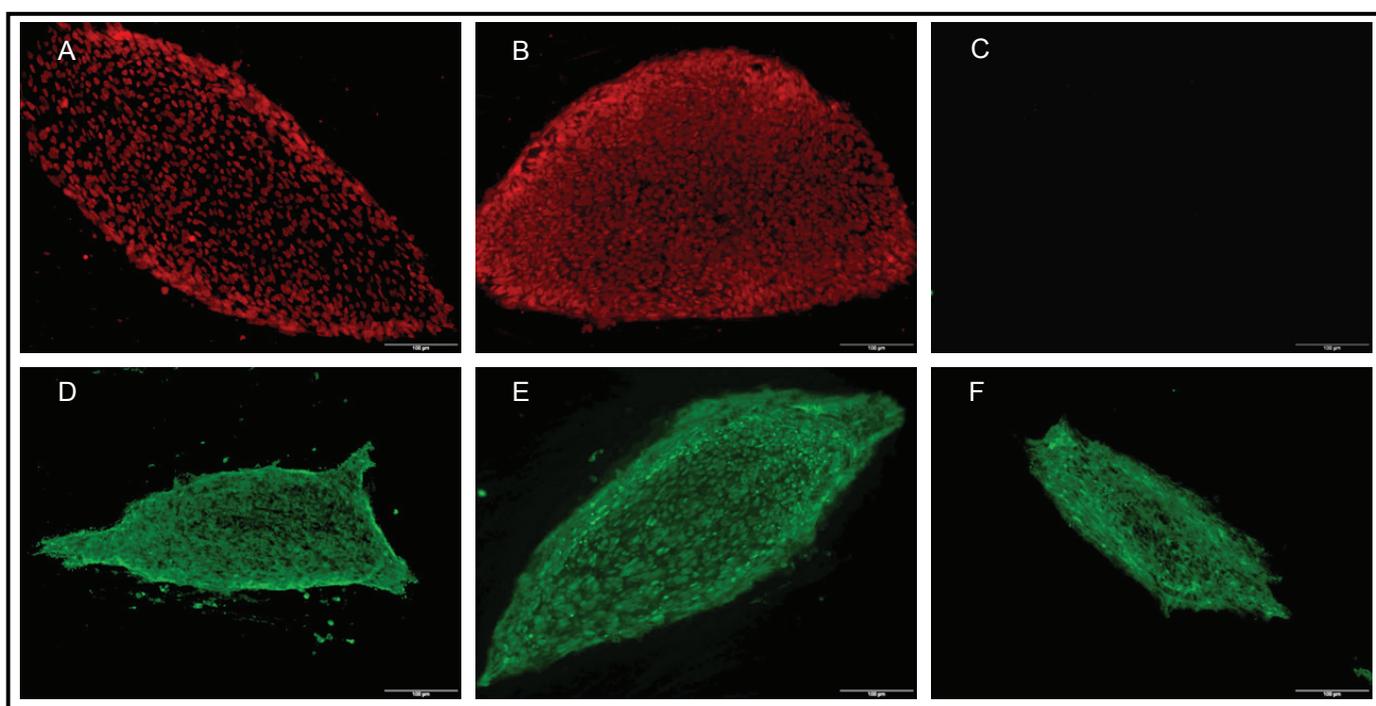




MARCADORES INDIFERENCIACIÓN DE VAL-8

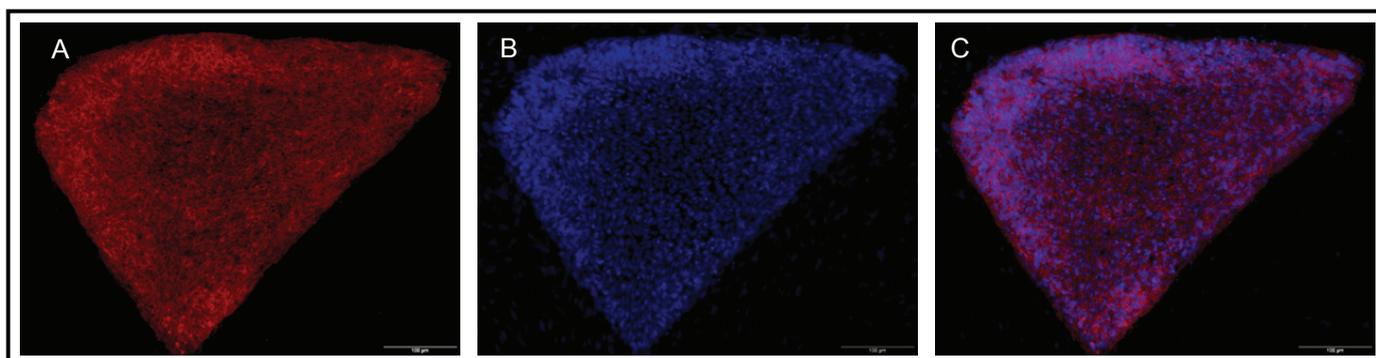
Expresión de antígenos de indiferenciación en VAL-8

Inmunocitoquímica para OCT-4 (A), Nanog (B) (R&D, Minneapolis, MN), SSEA-1 (C), SSEA-4 (D), Tra-1-60 (E) y Tra-1-81 (F) (Chemicon, Temecula, CA). Barra de escala = 100 μ m.



Ensayos de actividad de fosfatasa alcalina en VAL-8

Inmunocitoquímica para isoenzima Fosfatasa Alcalina clon TRA 2-54/2J (Chemicon, Temecula, CA) (A) ; DAPI (B); Fosfatasa Alcalina + DAPI (C). Barra de escala = 100 μ m.

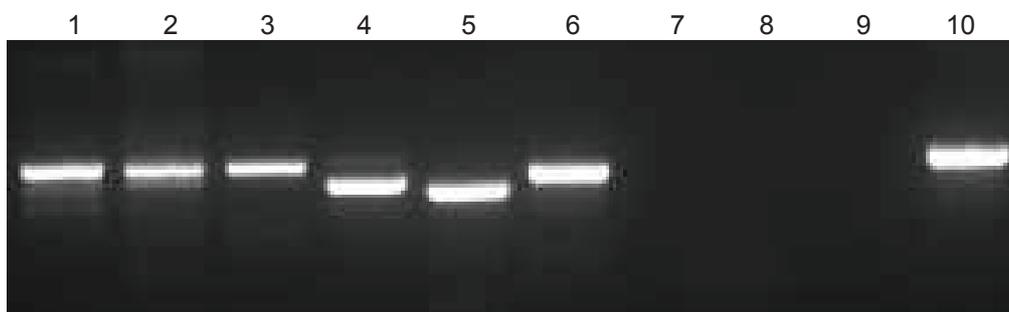




PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

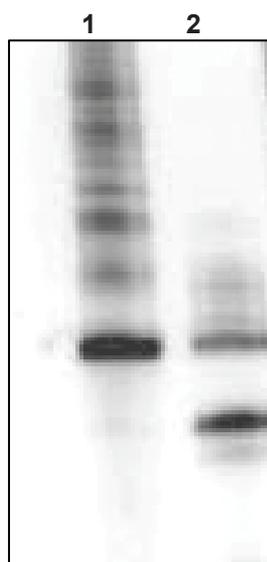
Expresión de marcadores moleculares de indiferenciación de VAL-8

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



Determinación de la existencia de actividad telomerasa en VAL-8

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-8 en fase 8 (1) y sobre células inactivadas por calor (2)





PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

ESTUDIO DEL CARIOTIPO DE VAL-8

Llevado a cabo en el pase 8, por un laboratorio independiente (IVI Murcia, España).

CAROTIPO: VAL-8

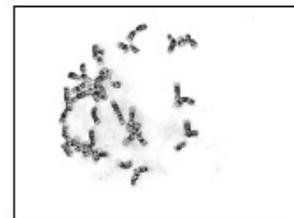


Nombre del caso: VAL-8

Fecha: 06/08/2008

Nombre del Paciente: Pase 8

Tipo de muestra: Línea Celular



Resultado: 46,XX [7]

El análisis cromosómico de 10 metafases mediante bandas GTG revela un CARIOTIPO FEMNINO NORMAL.

Técnico: Dra. MC Martínez



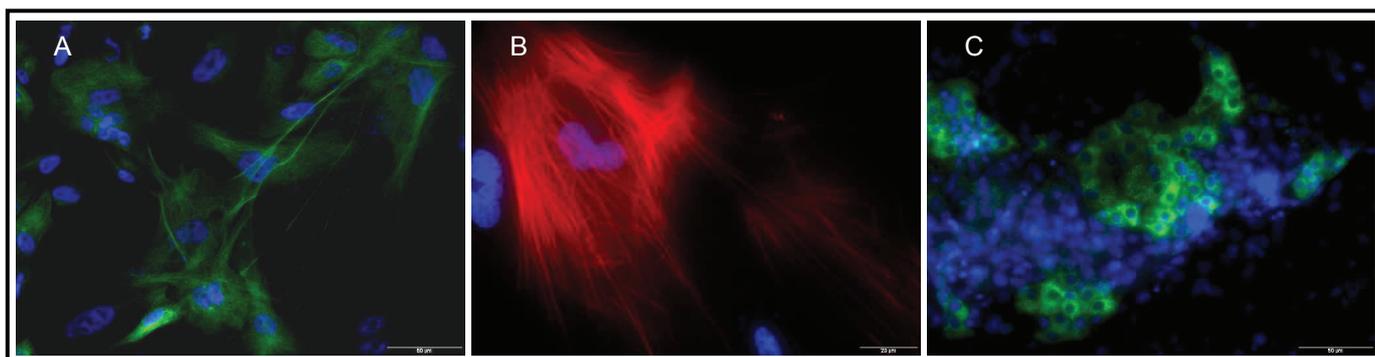
PLURIPOTENCIALIDAD DE VAL-8

Diferenciación espontánea *in vitro* de VAL-8

Por flotación, en placas de no adhesión, se generan cuerpos embriodes y se mantienen en esas condiciones entre 4 y 7 días. Barra de escala = 1000 μm .



Transcurrido ese tiempo, los cuerpos embriodes se transfieren a placas cubiertas con gelatina 1% para facilitar su adhesión. Tras 10-14 días, se fijan y se analizan marcadores de diferenciación característicos de (A) ectodermo (tubulin, β -III), (B) mesodermo (actina muscular) y (C) endodermo (α -fetoproteína). Barra de escala = 50 μm para (A) y (C) y 20 μm para (B).



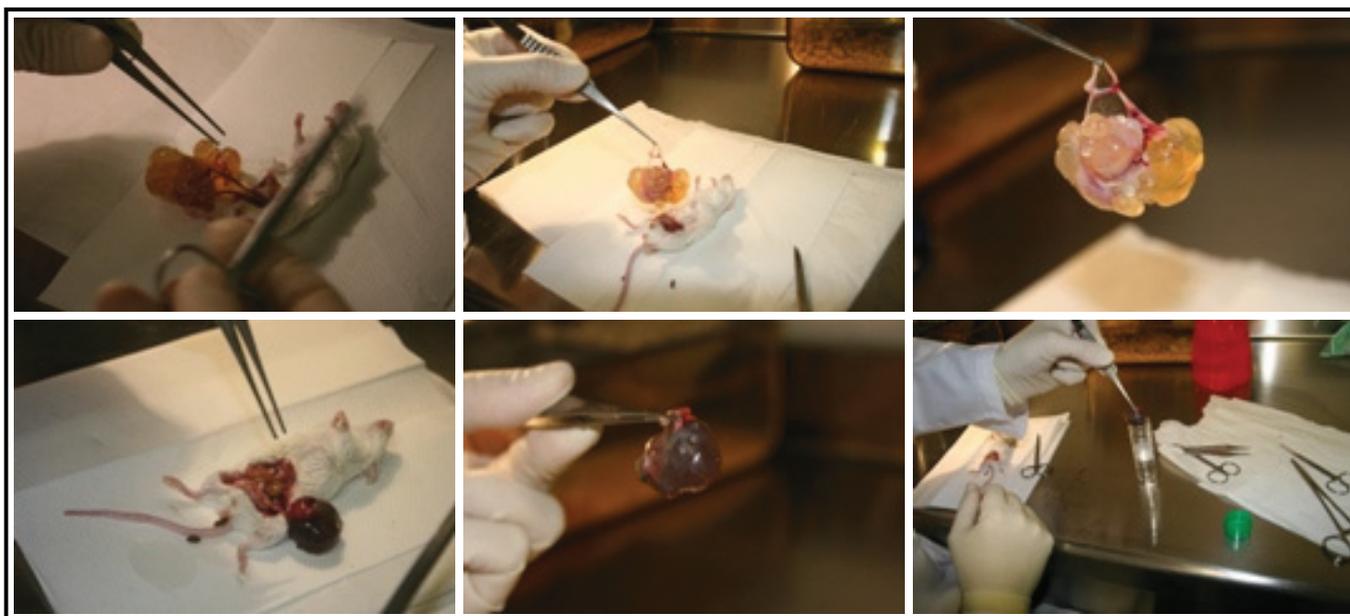


PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

Diferenciación espontánea *in vivo* de VAL-8

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 2-4 semanas más, momento en el que los animales se sacrifican por desnucación cervical.

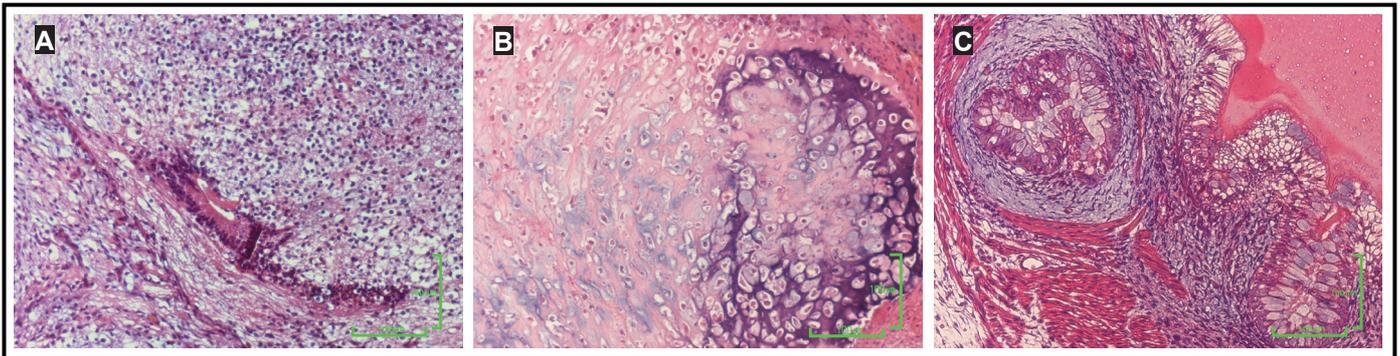




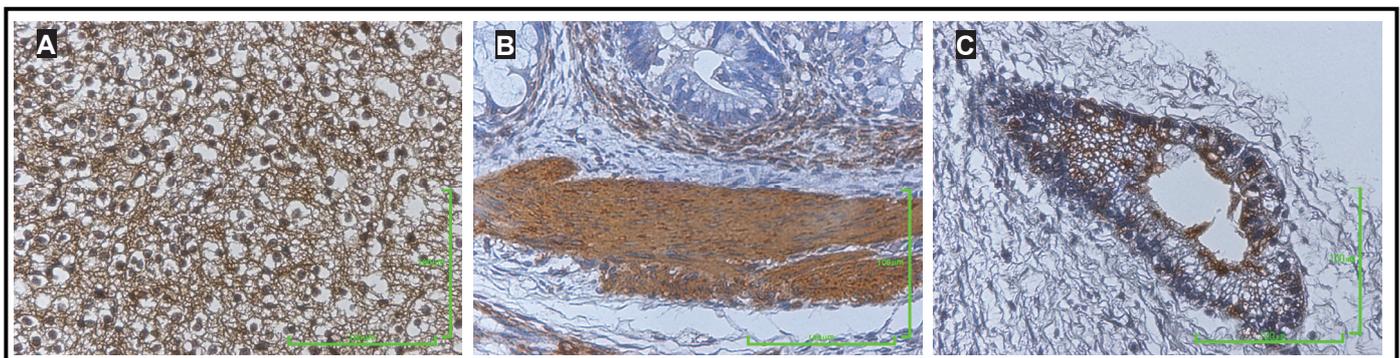
PRINCIPE FELIPE

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) entramado fibrilar, (B) osificación endocondral o (C) glándulas. Barra de escala = 100 μ m.



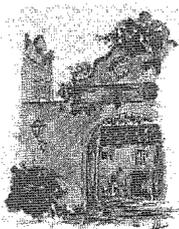
Para confirmar la presencia de derivados de las tres hojas embrionarias, se analizan marcadores de diferenciación característicos de (A) ectodermo (tubulin, β -III), (B) mesodermo (actina muscular) y (C) endodermo (α -fetoproteína). Barra de escala = 100 μ m.





PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LINEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE VAL-8



Instituto Valenciano de Microbiología

Masía 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-8**
Nº muestra : 11000055
Su referencia : **VAL-8**

Nº Historia : No consta
F y H Recepción: 04/08/2008 16:20:45

Doctor/ra : No consta
Centro : CENTRO INVESTIG. PRÍNCIPE FELIPE (I-15)

F. Extracción : 04/08/2008
H. Extracción : No consta

Tipo muestra : **Células y medio de cultivo**
Condiciones : **Congelada**

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

Observaciones:

Pedido: 08-I15-0210

FINAL

Primera Impresión: 08/08/2008 17:32:57

08 de agosto de 2008
Encarna Esteban Bermúdez

Página 1 de 1

Registro mercantil de Valencia, tomo 5003, libro 2311, sección G, folio 68, hoja n.º V37151, inscripción 1.ª - C.I.F. B-96337217



PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA



LABORATORIOS DR. MAIQUES, S.L.
C.I.F. B-96853007
Urb. Miravalles, 16.
Teléfono. 96 131 17 20
46111 - ROCAFORT (Valencia)

CIPF-FVIB
BANCO DE LINEAS CELULARES (I-15)
A/A EVA GOMEZ
C/E.P. Avda. Autopista del Saler nº 16-3
(junto Oceanográfico)
46013 (Valencia)
NIF: G 46923421

Nº PEDIDO: 08-I15-0161

MUESTRAS PARA TESTAR
(CIPF 09/07/08)

<i>MUESTRA</i>	<i>RESULTADO</i>
VAL-8 P4.....	NEGATIVO

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

Valencia

14/7/08



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 las líneas:

ATCC
Product Information Sheet for CRL-2429

Product: CRL-2429
Lot No: 3117003

Designation: CCD-1122Sk Description: Skin fibroblast; Human
Total Cells/mL: 9.0 x 10⁵
Expected Viability: 98% 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: 09/16/03

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 20110-2209

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



Masía El Romeral
Ctra. Beneta - San Antonio de Benagüber, Km. 0,3
46117 Bétera (Valencia)

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

Nombre.....: Foreskine - 1
N° 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.TM 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 Amebocyte Lysate) cromogénica OCL-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 5003, libro 2311, sección G, folio 68, hoja 4. V-37151. Inscripción 1. C.I.F. B-96337217

Instituto Valenciano de Microbiología



Masía El Romeral
Ctra. Beneta - San Antonio de Benagüber, Km. 0,3
46117 Bétera (Valencia)

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

Nombre.....: Foreskine - 1
N° 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 cápsida 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 NS5⁺
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 (VIH-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 5003, libro 2311, sección G, folio 68, hoja 4. V-37151. Inscripción 1. C.I.F. B-96337217

Instituto Valenciano de Microbiología



Masía El Romeral
Ctra. Beneta - San Antonio de Benagüber, Km. 0,3
46117 Bétera (Valencia)

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

Nombre.....: Foreskine - 1
N° 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).
Resultados: Negativo (ausencia de transcriptasa reversa)

Pdo. Técnicos responsables

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

Registro mercantil de Valencia, tomo 5003, libro 2311, sección G, folio 68, hoja 4. V-37151. Inscripción 1. C.I.F. B-96337217