



PRINCIPE FELIPE

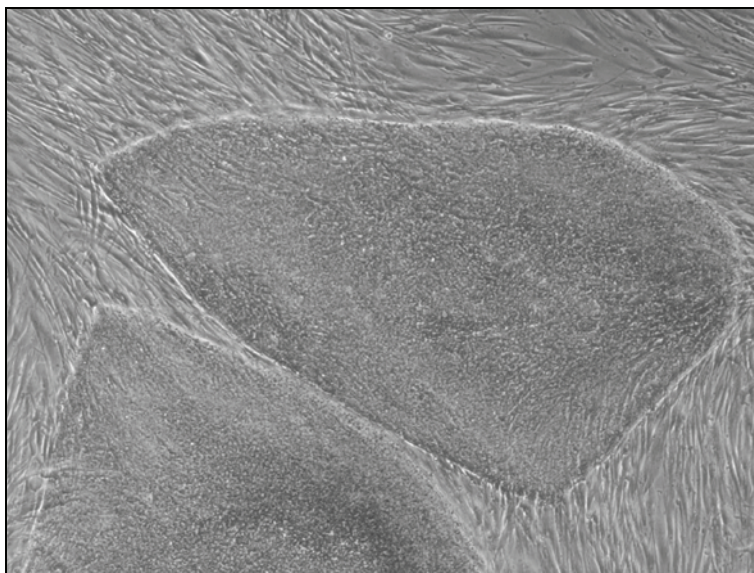
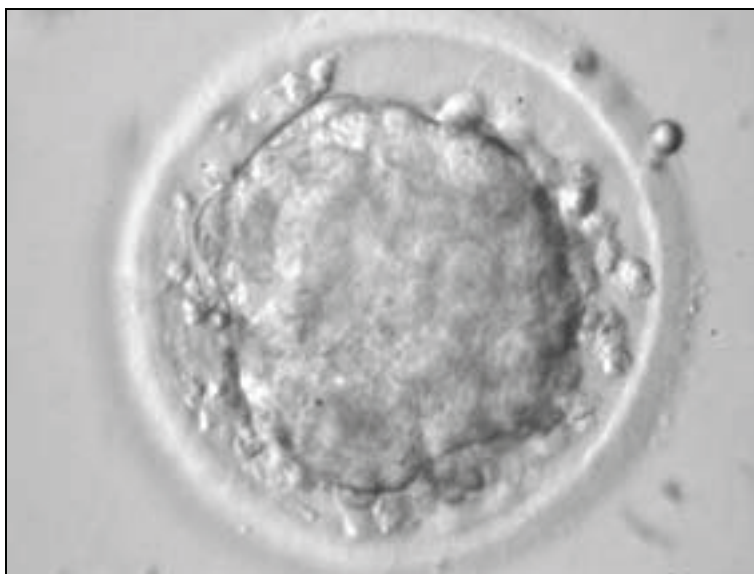
CENTRO DE INVESTIGACION

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

ANEXO

MORFOLOGÍA DE VAL-9

(A) Mórula tardía (40x), (B) morfología típica colonias de VAL-9 (4x).





PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

TIPIFICACIÓN HLA DE VAL-9

Llevado a cabo en el pase 6, 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 CENTRO DE INVESTIGACION
PRINCIPE FELIPE
Servicio LINEAS CELULARES (1-15)
Dirección AVDA. AUTOPISTA DEL SALER, 16-3
46012 VALENCIA

INFORME DE MUESTRAS EXTERNAS

Paciente VAL-9 P6
Nº Pac. 0600302150 (HC) (SIP:)
Fecha Pet. 04-dic-2008
Nº Toma 60635927
s/ref

HISTOCOMPATIBILIDAD.

TIPAJE HLA, CLASE-I POR BIOLOGÍA MOLECULAR DE ALTA RESOLUCION (PCR-SSP/SSO)

	Eqv. Serolo	Alelos Amplificados	
Locus HLA - A :	A2, A11	A*0201	A*1101
Locus HLA - B :	B7, B51(5)	B*0702	B*5101
Locus HLA - Cw :	Cw2, Cw7	Cw*0202	Cw*0702

TIPAJE HLA, CLASE-II POR BIOLOGÍA MOLECULAR DE ALTA RESOLUCION (PCR-SSP/SSO)

	Eqv. Serolo	Alelos Amplificados	
Locus HLA - DRB1:	DR11(5), DR15(2) DR52,	DRB1*1101	DRB1*1501
Locus HLA - DRB3:	DR52,	DRB3*0202	
Locus HLA - DRB4:	DR51,	DRB5*010101	
Locus HLA - DQA1:	DQ7(3), DQ6(1)	DQA1*0505	DQA1*0102
Locus HLA - DQB1:		DQB1*0301	DQB1*0502
Locus HLA - DPB1:		DPB1*0401	DPB1*0501

OBSERVACIONES

Fdo: Dr. José A. Mollero / Dra. Nieves Puig

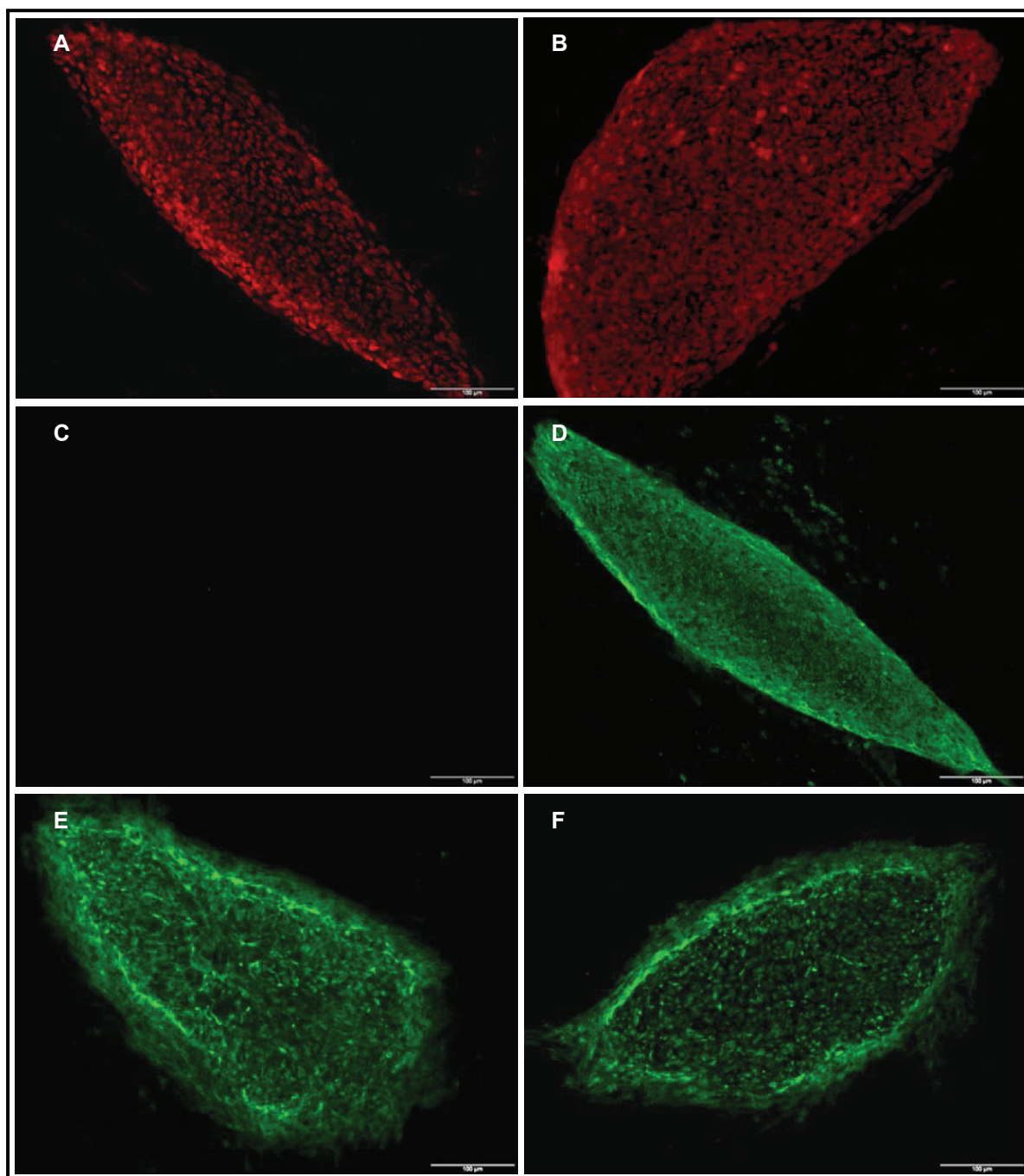
Valencia, 20 de enero de 2009

Centre de Transfusió de la Comunitat Valenciana - AGÈNCIA VALENCIANA DE SALUT
Avda. del Cid, 55 Ate - 46014 VALENCIA - Tel. 96 386 81 00 - Fax 96 386 81 05

MARCADORES INDIFERENCIACIÓN DE VAL-9

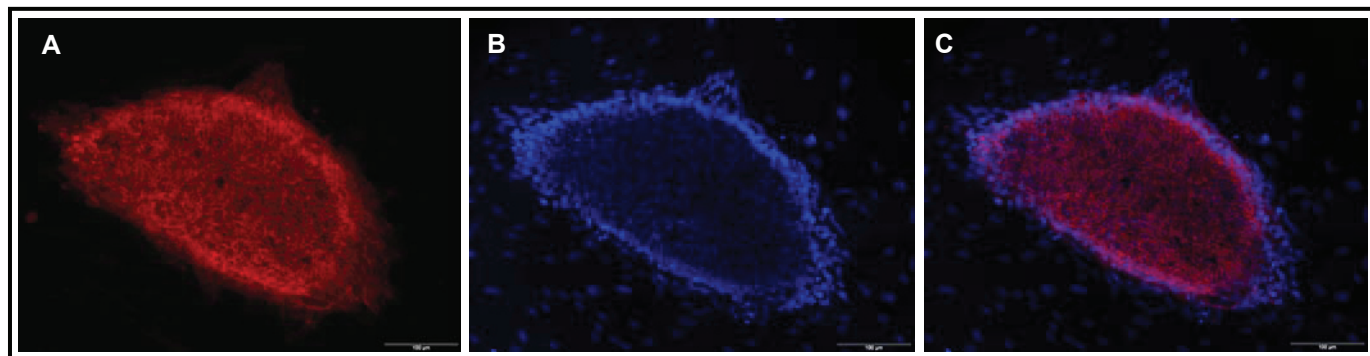
Expresión de antígenos de indiferenciación en VAL-9

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.



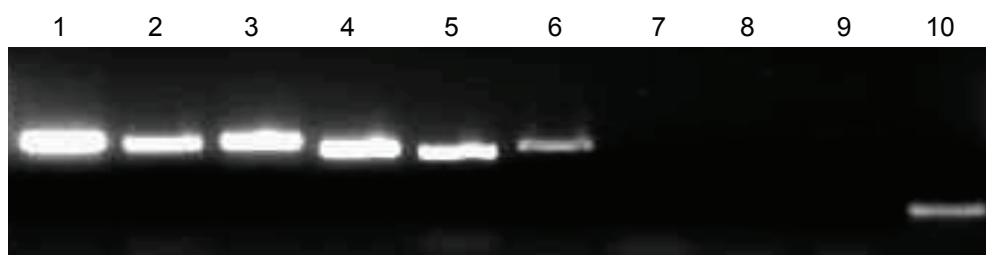
Ensayos de actividad de fosfatasa alcalina en VAL-9

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.



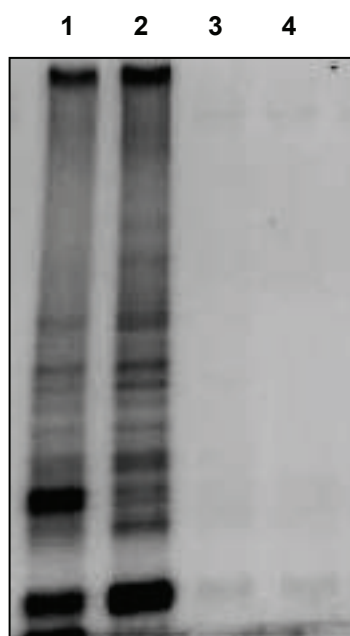
Expresión de marcadores moleculares de indiferenciación de VAL-9

RT-PCR positiva en fase 5 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 RPL19 (10).



Determinación de la existencia de actividad telomerasa en VAL-9

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 en pase 5 (1), utilizando otra línea de células madre embrionarias humanas como control positivo (2). Como controles negativos, se utilizaron células de VAL-9 inactivadas por calor (3), y fibroblastos (4).





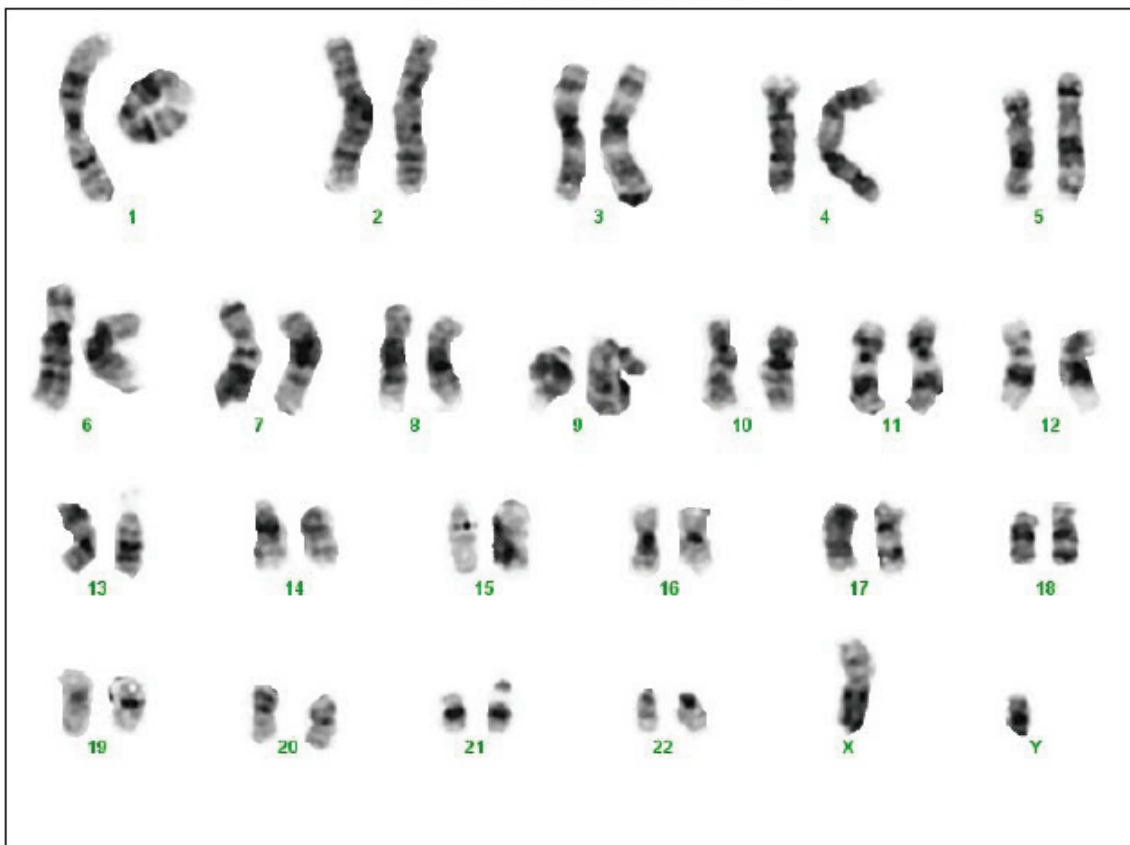
PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

ESTUDIO DEL CARIOTIPO DE VAL-9

Llevado a cabo en el pase 6, por un laboratorio independiente (IVI Murcia, España).

INFORME CITOGÉNÉTICO: VAL-9



Nombre del caso: VAL-9

Fecha: 17/12/2008

Nombre del Paciente: Pase 6

Tipo de muestra: Línea celular

Resultado: 46,XY[20]

El análisis cromosómico revela un cariotipo MASCULINO NORMAL.
Se han estudiado un total de 20 metafases mediante bandas GTG.



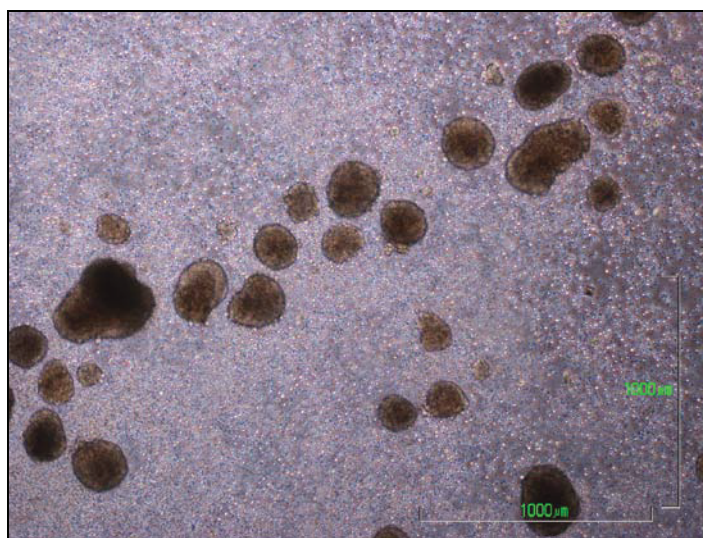
Dra. C Méndez

Dra. MC Martínez

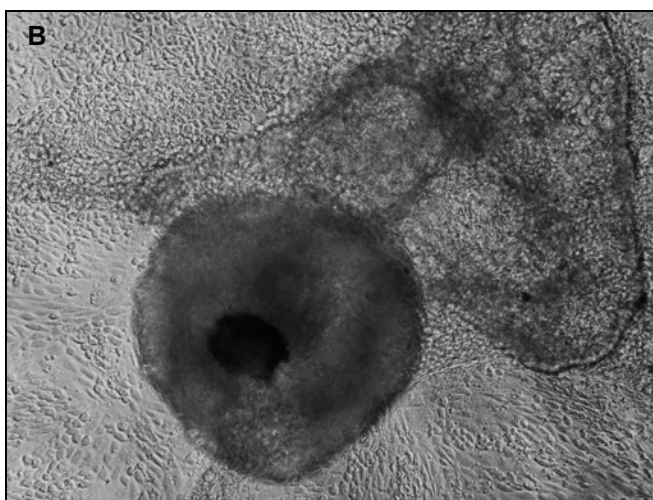
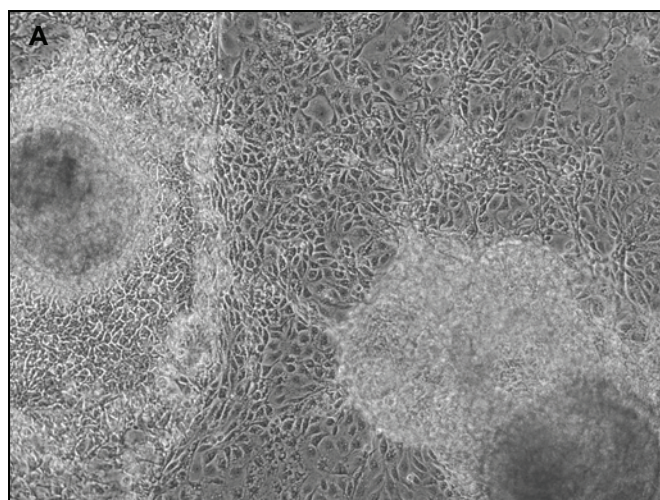
PLURIPOTENCIALIDAD DE VAL-9

Diferenciación espontánea *in vitro* de VAL-9

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 embrioides se transfieren a placas cubiertas con gelatina 1% para facilitar su adhesión. Durante el cultivo en placa, se obtuvieron diferentes tipos celulares (A) y en día 9 de cultivo se observaron focos de latido (B):

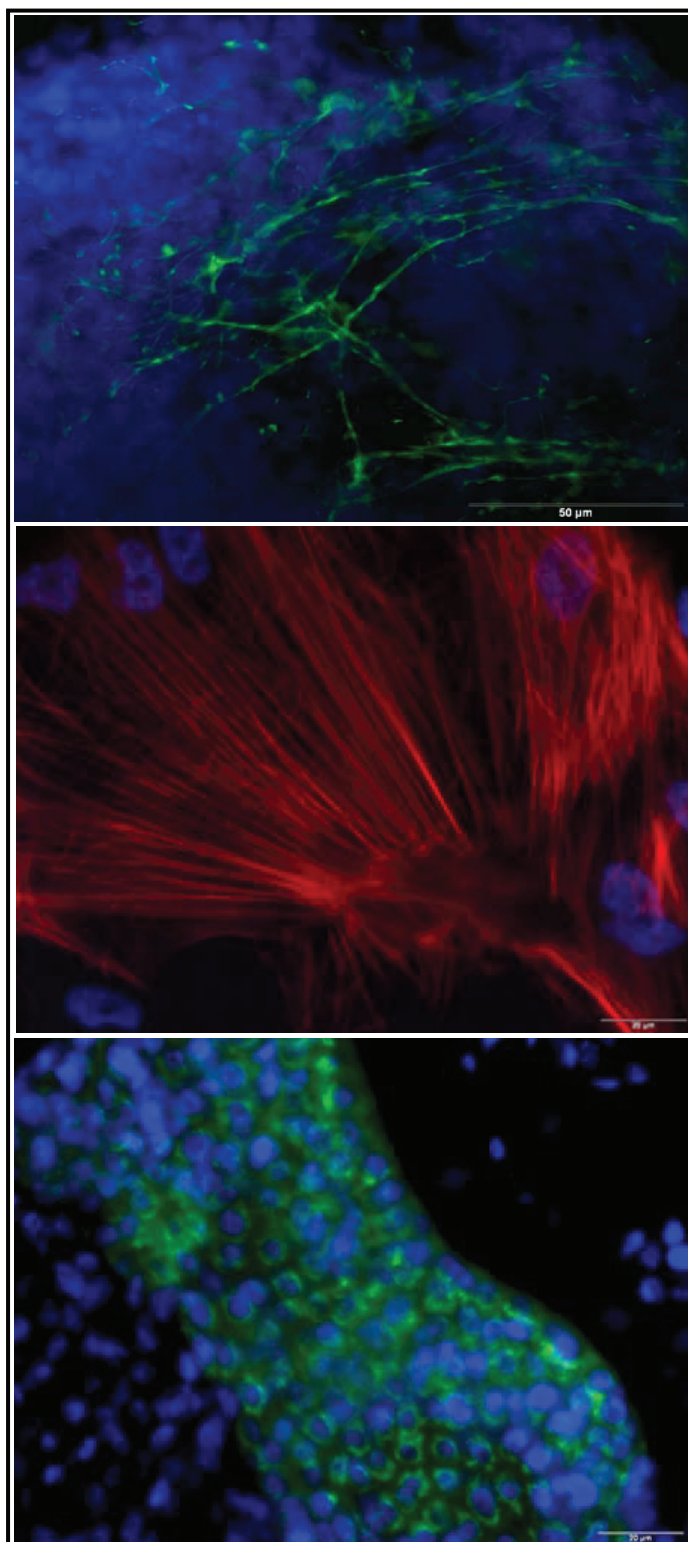




PRINCIPE FELIPE

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 (A) ectodermo (tubulin, β -III), (B) mesodermo (actina muscular) y (C) endodermo (α -fetoproteína). Barra de escala = 50 μ m para (A) y (C) y 20 μ m para (B).





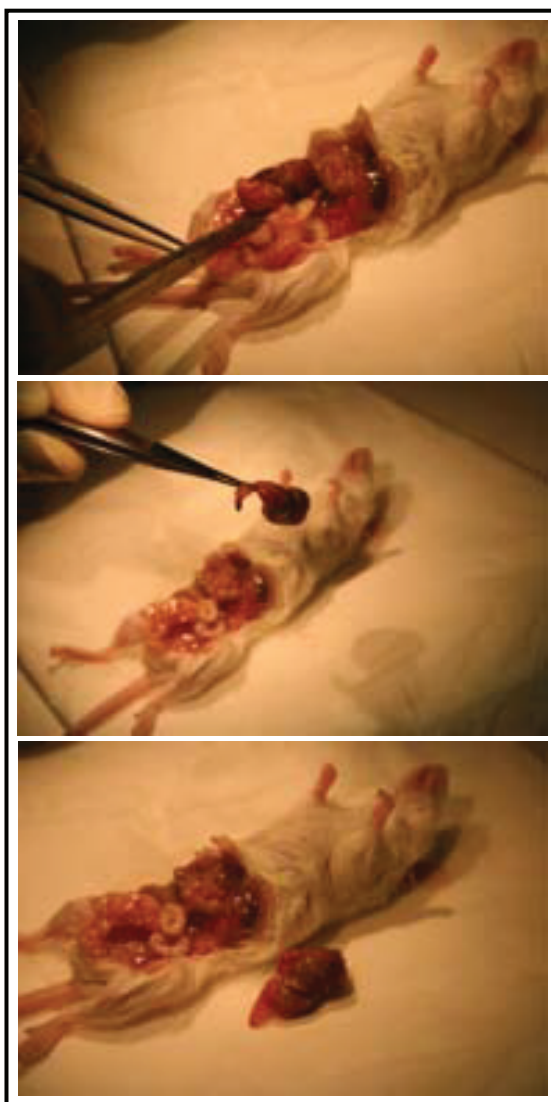
PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

Diferenciación espontánea *in vivo* de VAL-9

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

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, pta.6
46010 Valencia
Tel. 96-369.09.20

INFORME ANATOMOPATOLÓGICO

PACIENTE	F. Nacim	Nº.H.C.	F. Toma	F. Registro
Sr/Sra: PRINCIPE FELIPE _ , TESTES RATON	10/03/2009		10/03/2009	
Dr/Dra:		Clinica: CIPF		

ÓRGANO: TESTICULO

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA

77TI VAL 10B: Testiculo de 1,3 x 1 cm parcialmente quistico y de consistencia gelatinosa.
77TD VAL 10B: Testiculo de 2 x 1,5 x 1,5 cm de consistencia gelatinosa homogenea al corte (dos bloques)
79 VAL 9: Testiculo de 1,5 x 1 cm de aspecto quistico y paredes lisas translucidas con algun area engrosada.
80 VAL 9: Testiculo de 2 x 1,5 x 1 cm de aspecto carnososo y hemorragico

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA

DIAGNÓSTICO

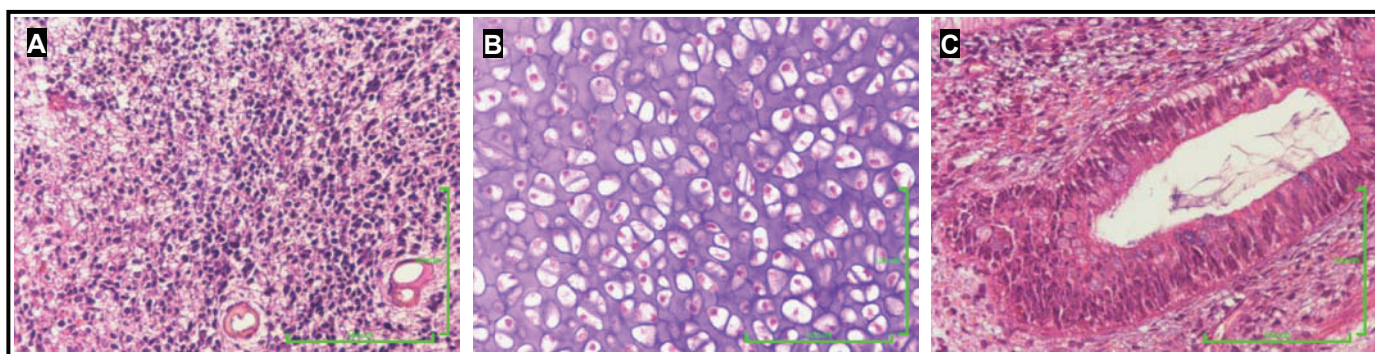
77TI VAL10B: TERATOMA QUISTICO CON PREDOMINIO MESENQUIMAL VIENDOSE DIFERENCIACION CONDRA Y AISLADAS AREAS EPITELIALES ESCAMOSAS Y GLANDULARES.
77TD VAL10B TERATOMA QUISTICO CON DIFERENCIACION DE LAS TRES HOJAS EMBRIONARIAS, PREDOMINIO MESENQUIMAL.
79 VAL 9 TERATOMA QUISTICO CON DIFERENCIACION DE LAS TRES HOJAS EMBRIONARIAS CON AREAS DE EPITELIO DIGESTIVO, ESCAMOSO Y MESENQUIMAL CON ALGUN FOCO GLIAL.
80 VAL9: TERATOMA QUISTICO CON PREDOMINIO EPITELIAL.

13/02/2009

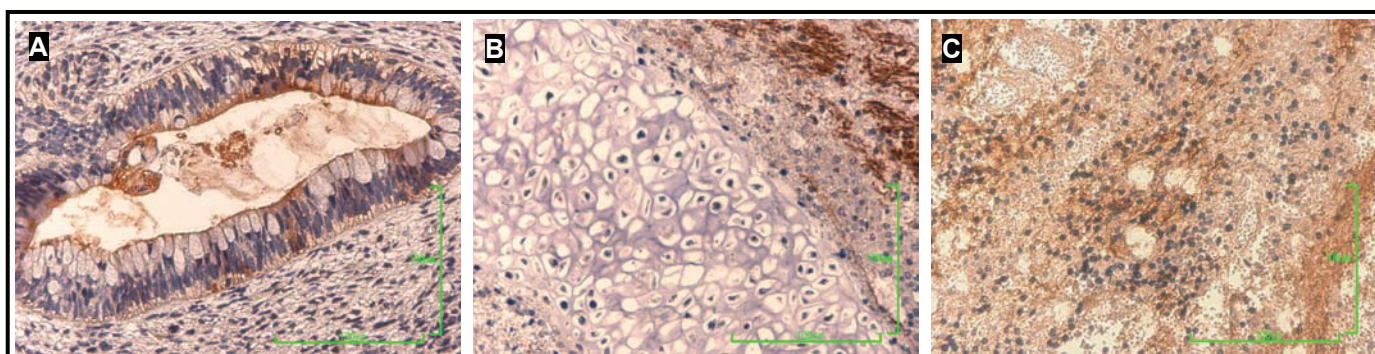
Patólogo: Dra. CALABUIG

Página 1 de 2

Microscópicamente, la búsqueda se orienta hacia la identificación de tejidos fácilmente distinguibles como (A) entramado fibrilar, (B) nidos de condrocitos o (C) glándulas. 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



LABORATORIOS DR. MAIGUES, S.L.
C.I.F. B-04853007
Unid. Microscopios, I.A.
Teléfono: 96 131 17 20
46111 - ROCAFORT (Valencia)

CIPE-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: 09-115-0010

MUESTRAS PARA TESTAR
(CIPF 03/02/09)

MUESTRA

RESULTADO

VAL-9 Pase 22C. bacteriológico: negativo
C. micológico: 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 9 febrero 2009

LABORATORIOS DR. MAIGUES, S.L. - CENTRO DE INVESTIGACION PRINCIPE FELIPE - BANCO NACIONAL DE LINEAS CELULARES - NODO COMUNIDAD VALENCIANA - C.I.F. B-04853007



PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

INSTITUTO VALENCIANO DE MICROBIOLOGÍA



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**
Nº muestra : 11000056
Su referencia : **VAL-9**

Nº Historia : No consta
F y H Recepción : 06/02/2009 10:05:27

Doctor/a : No consta
Centro : CENTRO INVESTIG. PRINCIPE FELIPE (I-15)

F. Extracción : No consta
H. Extracción : No consta

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

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:

Proyecto I15/Pedido Nº 09-I 15-0012
A/A Dra. Noelia Filqueto

FINAL

16 de marzo de 2009
Encarna Esteban Bermúdez

Primera Impresión: 13/02/2009 17:06:20

Página 1 de 1

Registro mercantil de Valencia, tomo 5063, libro 2311, sección 0, folio 68, tola nº V37151, inscripción 1.ª - C.I.F. B-96337217



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	Instituto Valenciano de Microbiología
Product: CRL-2429 Lot No.: 3117003 Designation: CCL-1112Sk. Description: Skin fibroblast; Human Total Cells/ml: 9.0×10^5 Expected Viability: 96% to 97% Amplification Passage No.: 5 Population Doubling (PD): 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 20108-2209 Phone: 800-638-6597 or 703-365-2700 Fax: 703-365-2750 E-mail: sales@atcc.org Web site: www.atcc.org	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 6×10^6 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 5×10^6 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 CCL-1000. Resultado: < 0.1 EU/mL Investigación de Citomegalovirus Muestra: ADN extraído de 2×10^6 células Método utilizado: doble PCR con secuencia del gen Immediate Early-1 (IEA-1) Resultado: Negativo (ausencia de genoma de Citomegalovirus)	
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 2×10^6 células Método utilizado: doble PCR con secuencia del gen de proteína de cápside p23 (gen BLP2). Resultado: Negativo (ausencia de genoma de virus de Epstein-Barr) Investigación de virus de Hepatitis B Muestra: ADN extraído de 2×10^6 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 2×10^6 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 2×10^6 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 2×10^6 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 2×10^6 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)	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 (VIN-2) Muestra: ADN extraído de 2×10^6 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 2×10^6 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 2×10^6 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) Fdo. Técnicos responsables Valencia, 22 de octubre 2004 E. Esteban (Dirección técnica)	