



PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION  
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES  
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

## ANEXO

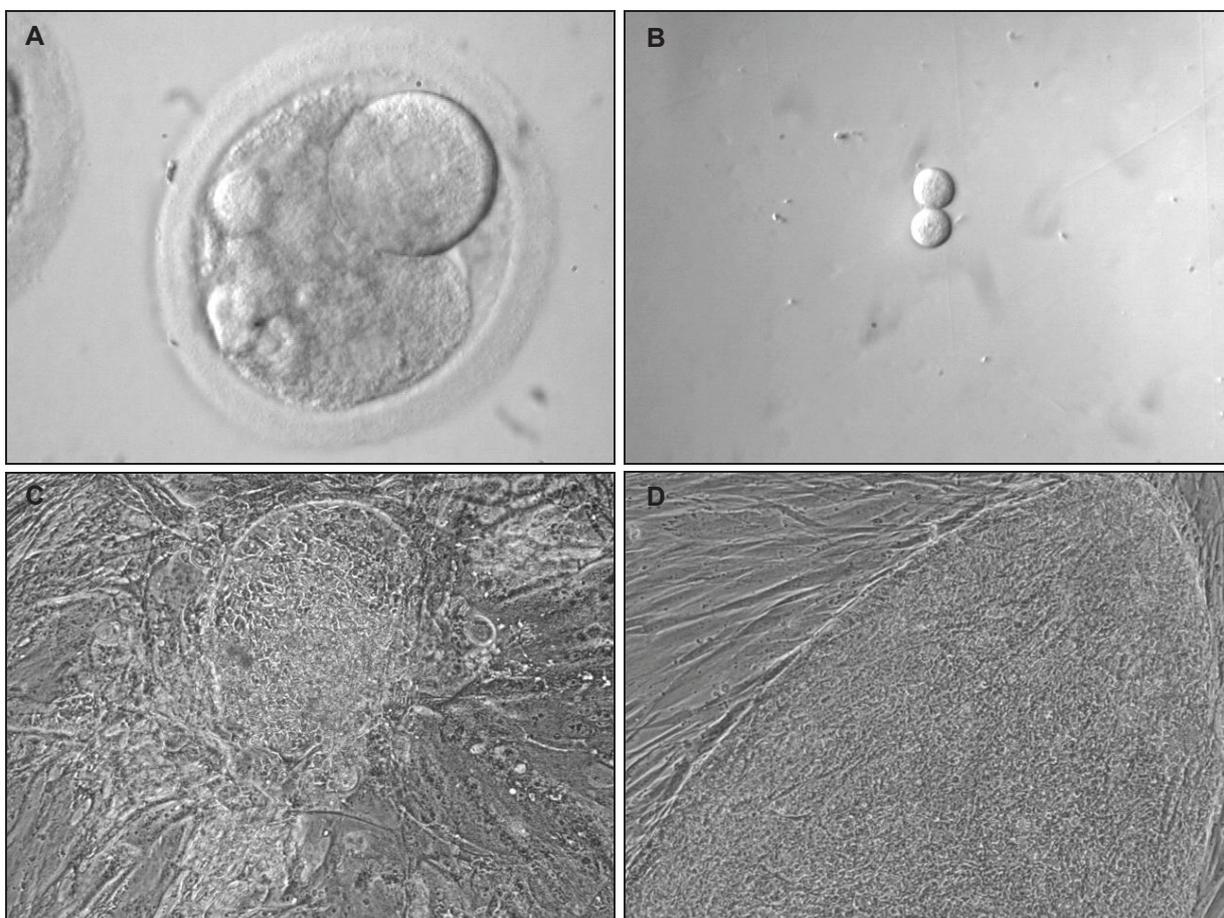


## PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION  
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES  
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

# MORFOLOGÍA DE VAL-11B

- (A) Embrión en estadio de 6 células en día 2 de desarrollo (40x)
- (B) Blastómera dividida (20x)
- (C) Outgrowth en día 10 *after plating* (10x)
- (D) Morfología típica colonias de VAL-11B (10x)





## PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION  
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES  
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

# TIPIFICACIÓN HLA DE VAL-11B

Llevado a cabo en el pase 5, por el Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana.

GENERALITAT VALENCIANA CONSELLERIA DE SANITAT	
 <b>AGÈNCIA VALENCIANA DE SALUT</b> Centre de Transfusió de la Comunitat Valenciana	
<b>Doctor</b> <b>Centro</b> <b>Servicio</b> <b>Dirección</b>	CIPF-FVIB INVESTIGACION BANCO LINEAS CELULARES I-15 AVDA DEL CID DE SAUER, 16-3 46013 VALÈNCIA
<b>INFORME DE MUESTRAS EXTERNAS</b>	
<b>Paciente</b> - VAL-11B P5 <b>Nº Pac.</b> 0600367093 (HC:) (SIP: ) 	<b>Fecha Pet.</b> 09-jun-2009 <b>Nº Toma</b> 60644286 <b>S/Ref.</b>
<b>HISTOCOMPATIBILIDAD.</b>	
<b>TIPAJE HLA. CLASE-I POR BIOLOGÍA MOLECULAR DE ALTA RESOLUCION (PCR-SSP/SSO)</b>	
Locus HLA - A : A*0101 A*0201 Locus HLA - B : B*1501 B*3701 Locus HLA - Cw : Cw*0303 Cw*0602	Comentario
<b>TIPAJE HLA. CLASE-II POR BIOLOGÍA MOLECULAR DE ALTA RESOLUCION (PCR-SSP/SSO)</b>	
Locus HLA - DRB1: DRB1*0401 DRB1*1104 Locus HLA - DRB3: Locus HLA - DRB4: Locus HLA - DRB5: Locus HLA - DQA1: DQA1*0301 DQA1*0505 Locus HLA - DQB1: DQB1*0302 DQB1*0301 Locus HLA - DPB1: DPB1*0401 DPB1*0502	Comentario
<b>OBSERVACIONES</b>	
Fdo: Dr. José A. Montoro / Dra. Nieves Puig  Valencia, 19 de junio de 2009	
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	

Laboratori de Histocompatibilitat acreditat per la  
"European Federation for Immunogenetics"





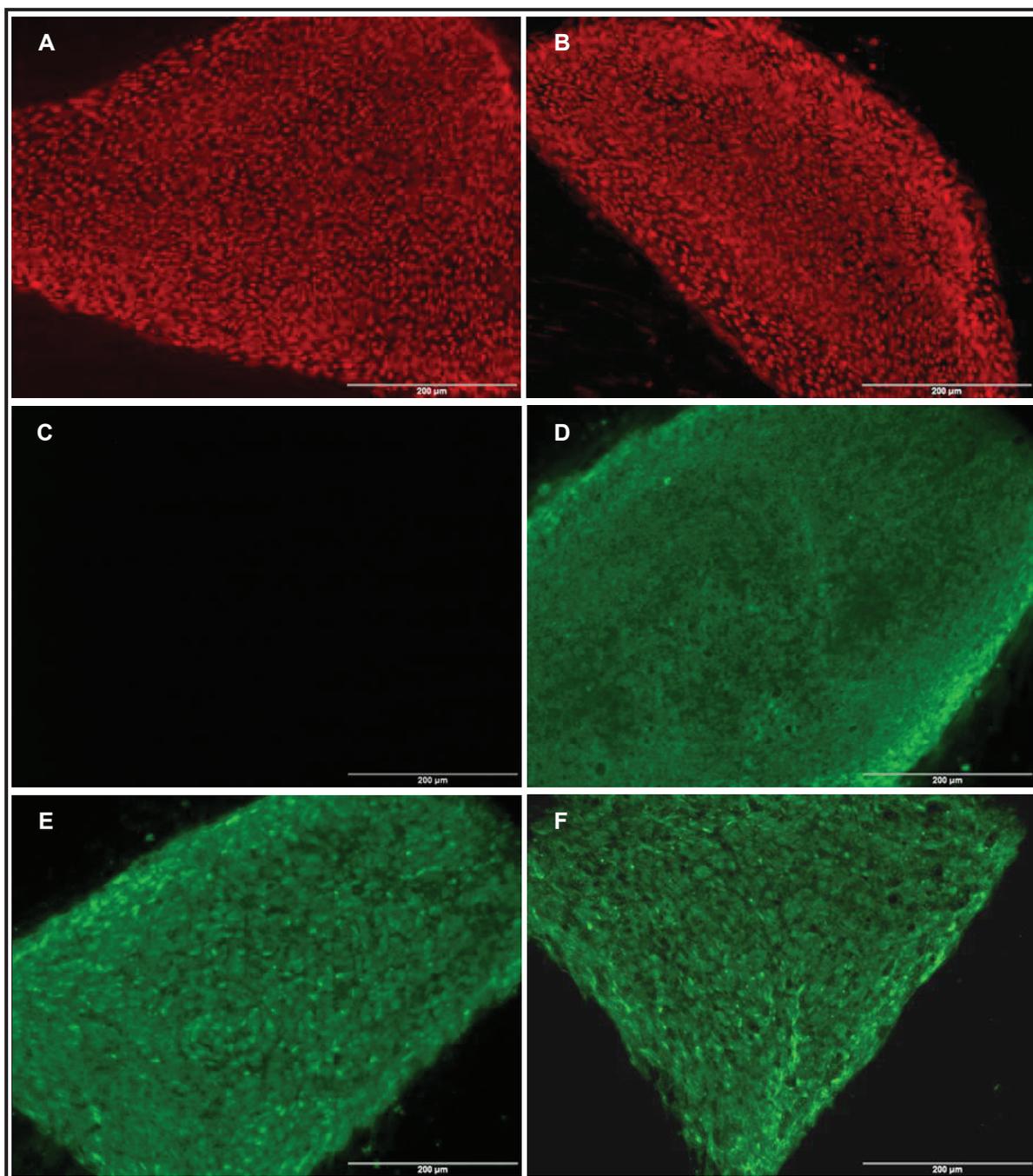
PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION  
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES  
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

## MARCADORES INDIFERENCIACIÓN DE VAL-11B

### Expresión de antígenos de indiferenciación en VAL-11B

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 = 200  $\mu$ m.



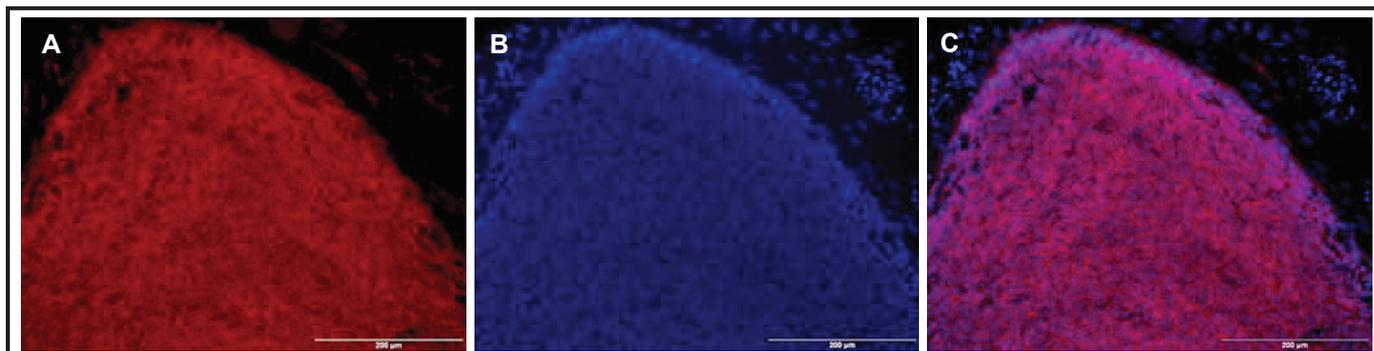


## PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION  
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES  
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

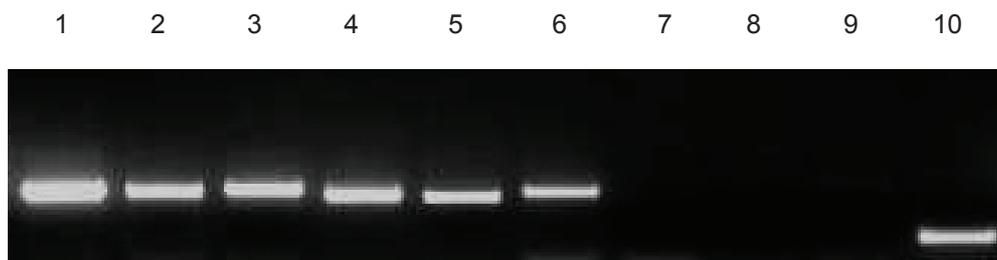
### Ensayos de actividad de fosfatasa alcalina en VAL-11B

Inmunocitoquímica para isoenzima Fosfatasa Alcalina clon TRA 2-54/2J (Chemicon, Temecula, CA) (A) ; DAPI (B); Fosfatasa Alcalina + DAPI (C). Barra de escala = 200  $\mu\text{m}$ .



### Expresión de marcadores moleculares de indiferenciación de VAL-11B

RT-PCR positiva en fase 5 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).



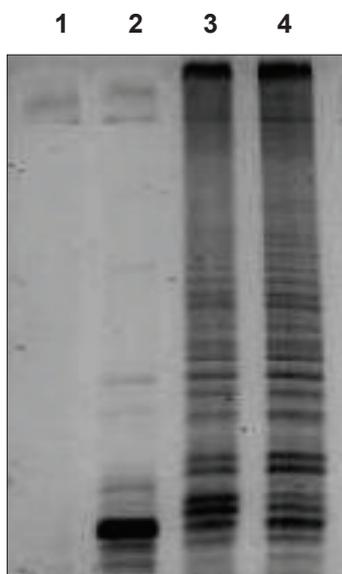


## PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION  
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES  
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

### Determinación de la existencia de actividad telomerasa en VAL-11B

La detección de la actividad telomerasa característica de células inmortales se ha realizado mediante una reacción de PCR utilizando un kit específico (TRAPEZE<sup>®</sup> Telomerase Detection Kit; Chemicon, Australia) y tinción con SYBR<sup>®</sup> (Molecular probes, USA). Como controles negativos, se utilizaron células de la línea VAL-11B inactivadas por calor (1), y fibroblastos (2). Se utilizó otra línea de células madre embrionarias humanas como control positivo (3) mientras que el análisis se realizó sobre células intactas de VAL-11B en pase 5 (4).





PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION  
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES  
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

## ESTUDIO DEL CARIOTIPO DE VAL-11B

Llevado a cabo en el pase 5, por un laboratorio independiente (IVI Murcia, España).

### INFORME CITOGÉNÉTICO: VAL 11B



Nombre del caso: VAL-11

Fecha: 04/06/2009

Nombre del Paciente: Pase 5

Tipo de muestra: Células madres



Resultado: 48,XX [20]

El análisis cromosómico de 20 metafases mediante bandas GTG revela un CARIOTIPO FEMENINO NORMAL.

Dra. C Méndez

Dra. MC Martínez



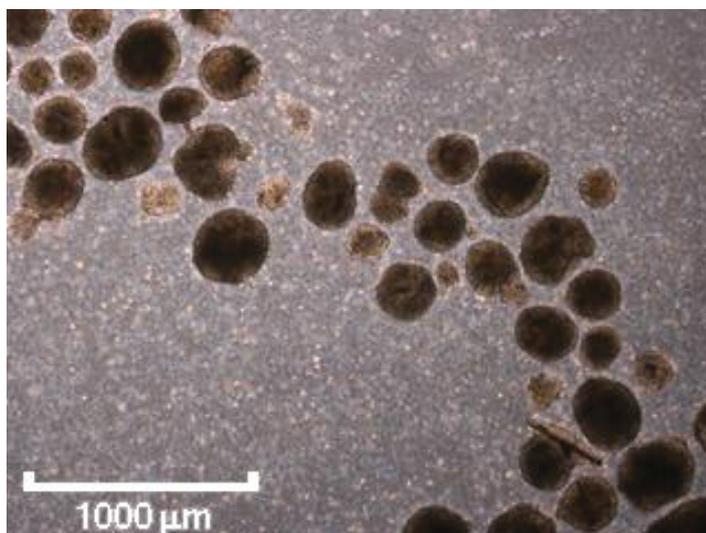
PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION  
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES  
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

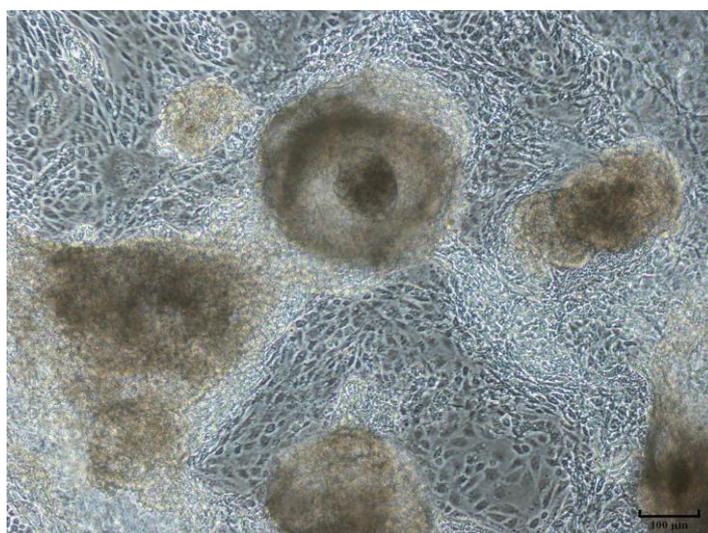
## PLURIPOTENCIALIDAD DE VAL-11B

### Diferenciación espontánea *in vitro* de VAL-11B

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 = 1000  $\mu\text{m}$ .



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 a los 7 días se observaron focos de latido. Barra escala = 100  $\mu\text{m}$ .

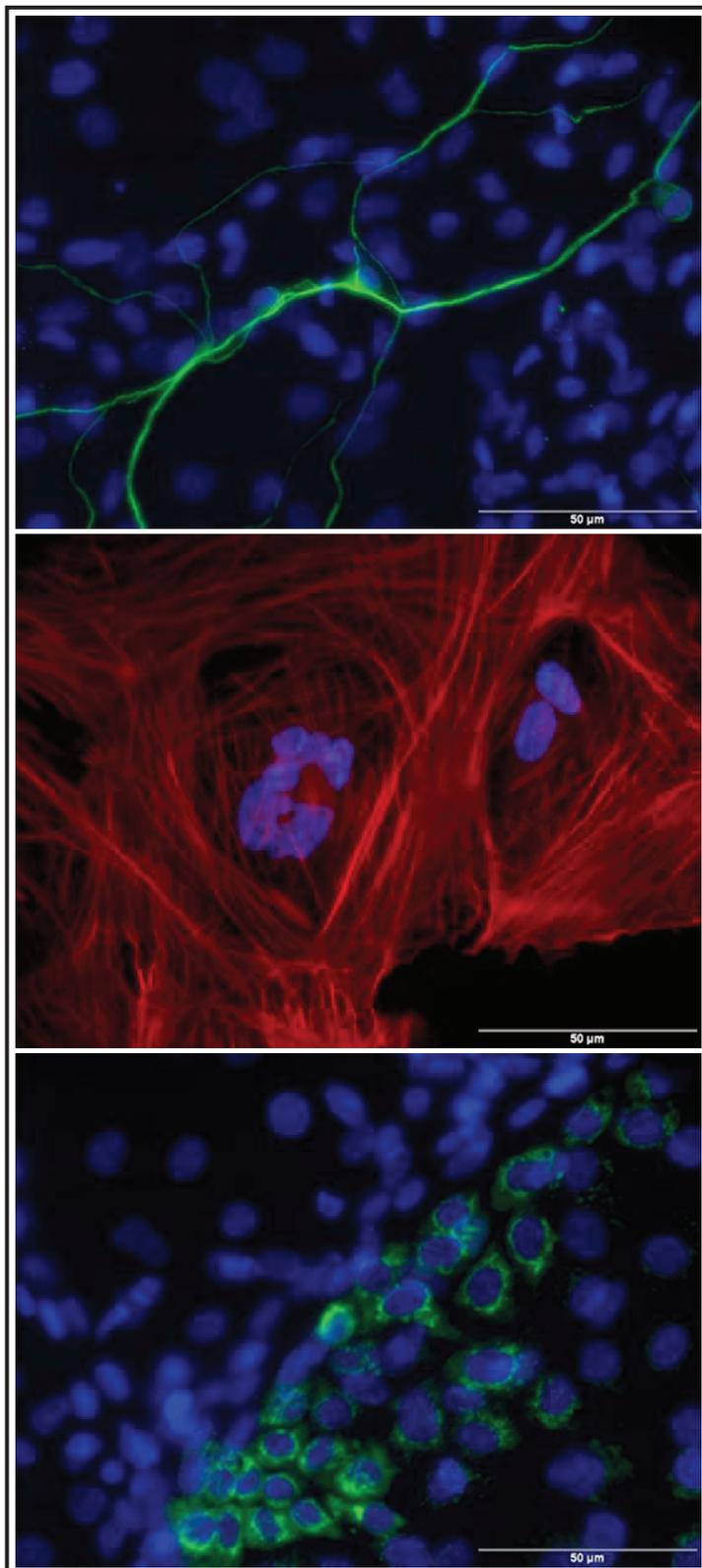




## PRINCIPE FELIPE

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 (A) ectodermo (tubulin,  $\beta$ -III), (B) mesodermo (actina muscular) y (C) endodermo ( $\alpha$ -fetoproteína). Barra de escala = 50  $\mu$ m.



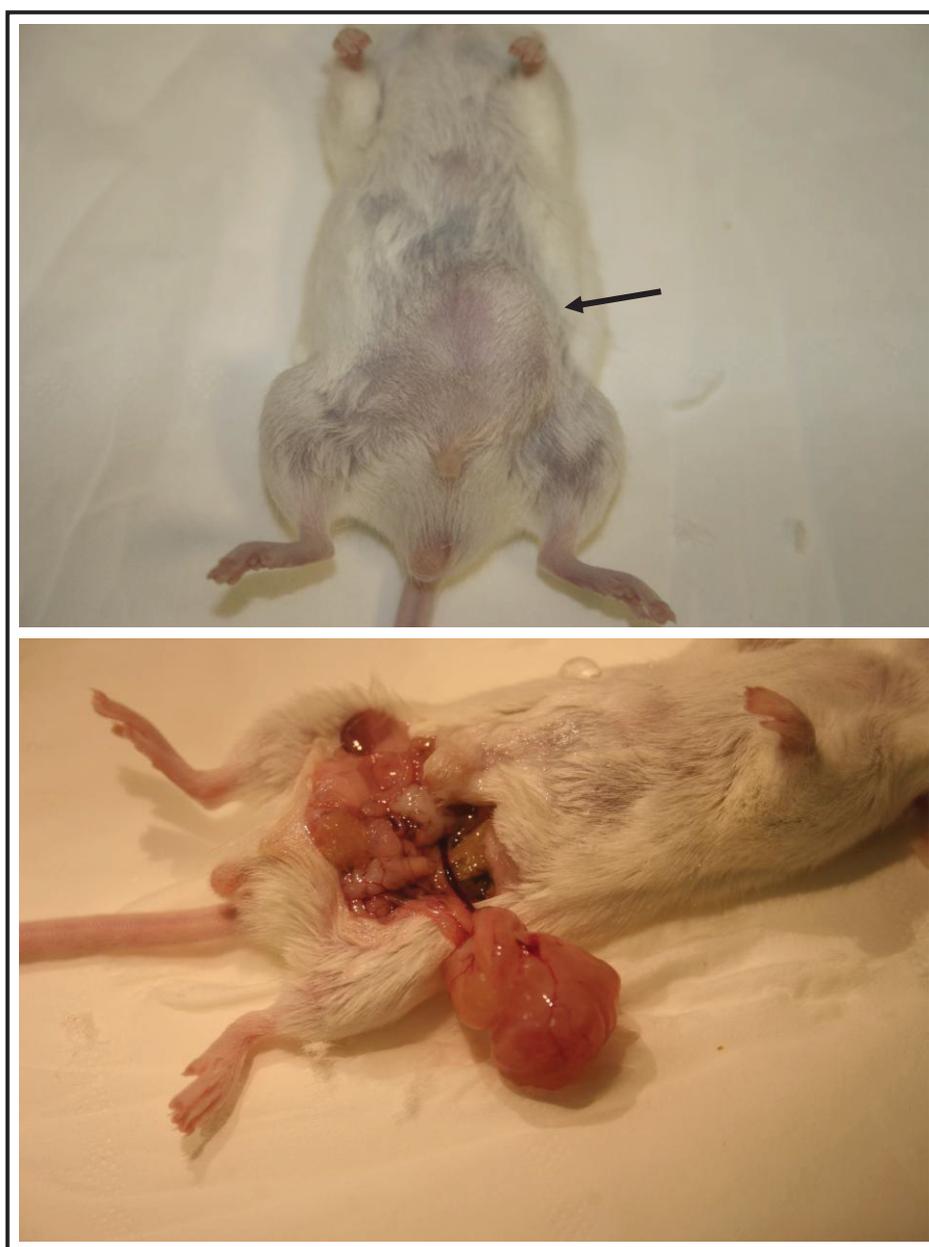


## PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION  
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES  
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

### Diferenciación espontánea *in vivo* de VAL-11B

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.).

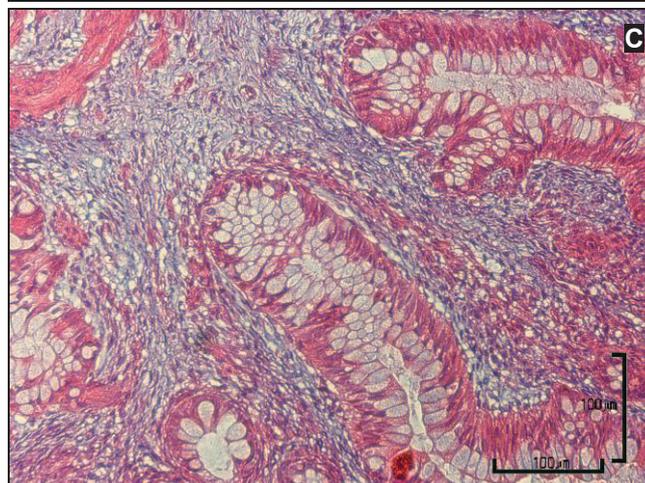
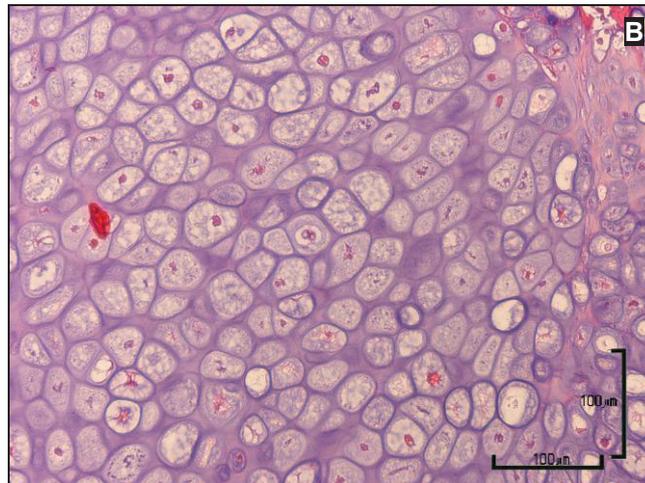
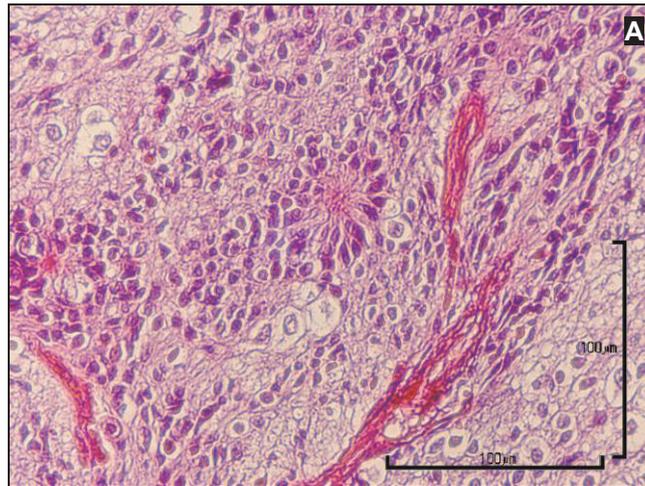
CITOPAT S.L.		C/Micer Mascó 7-6ª Valencia 46010 Valencia	
<b><u>ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO</u></b>			
Paciente:	<b>CIPF</b>	Edad:	
Médico remitente:		Sexo:	Desconocido
Fecha de recepción:	27/01/2010		
<b>MUESTRA RECIBIDA:</b>			
VAL-11B		TESTICULO (NEOM)	
<b>DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA:</b>			
Teste de 2 x 1,8 cm de límites redondeados con áreas sólidas y parcialmente quístico al corte. Se incluye toda la pieza en dos bloques. (12 portas: 1º y 12º H-E, 10 seriados sin teñir en superfrost plus)			
<b>DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:</b>			
Histológicamente se encuentran restos de parenquima testicular con tubulos discretamente dilatados con predominio de células de Sertoli. Dicho parenquima se halla desplazado por una proliferación tumoral de carácter teratomatoso. El teratoma se halla constituido por áreas de patrón tubular con epitelio de tipo digestivo con células prismáticas y células caliciformes así como otras estructuras tubulares con epitelio ciliado de tipo respiratorio. Se acompaña de componentes mesenquimales con tejido muscular esquelético y tejido condral. Asimismo aparecen amplias áreas de tejido neural. No se observan áreas inmaduras en las múltiples secciones practicadas.			
<b>DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO:</b>			
<b>Teratoma maduro testicular con áreas de tejido neural.</b>			
Salida: 01/02/2010			
 <b>Dra. C. Calabuig Graso</b> Anatomía Patológica Col. n.º 9254			
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) rosetas neurales, (B) osificación endocranal o (C) glándulas. Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ .

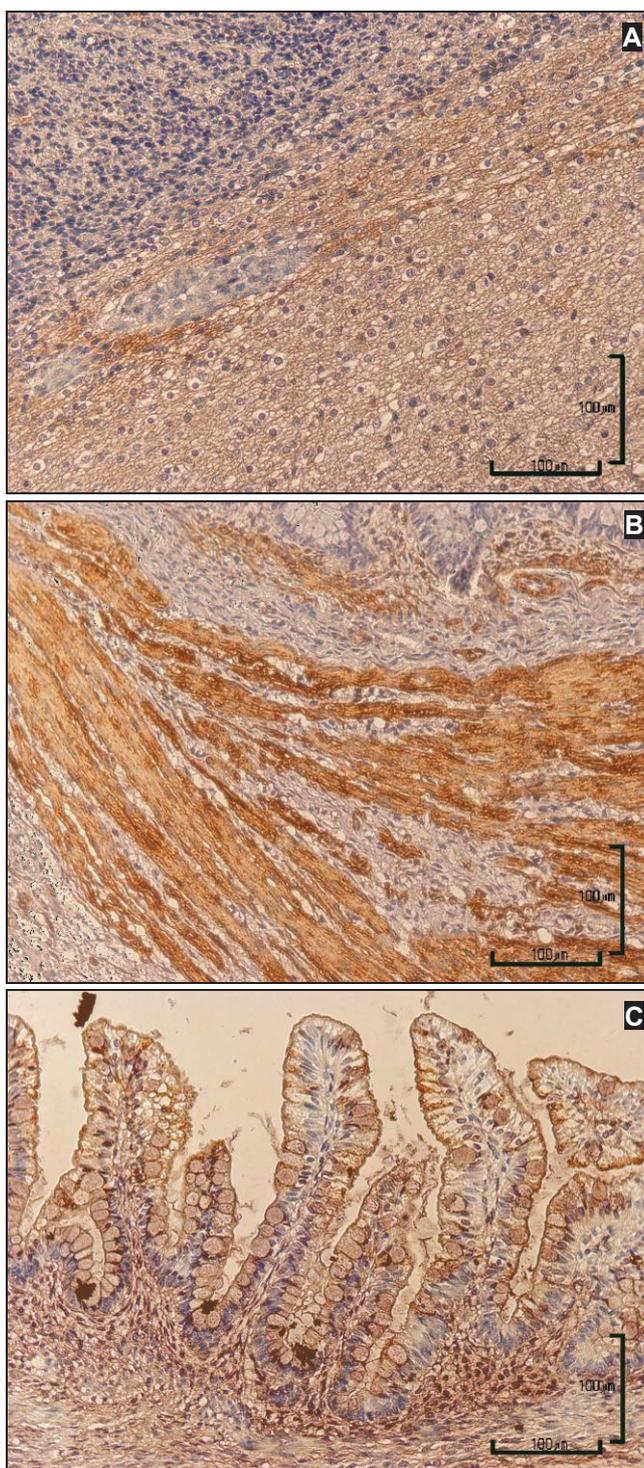




## PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION  
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES  
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

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





**PRINCIPE FELIPE**

CENTRO DE INVESTIGACION  
BANCO NACIONAL DE LINEAS CELULARES  
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

# ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE VAL-11B



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: 20687**

**MUESTRAS PARA TESTAR**  
**(CIPF 29/10/09 )**

<i>MUESTRA</i>	<i>RESULTADO</i>
-VAL-11B P25 .....	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 04-11-09

LABORATORIOS DR. MAIQUES, S.L. Inscrita en el Registro Mercantil de la Provincia de Valencia, al Tomo 6.335, Libro 3.640, Folio 1, Sección 8, Hoja V465722. Inscriptor: I.ª - C.I.F.: B-96853007



## 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](mailto:ivami@ivami.com) <http://www.ivami.com>

Nombre	: VAL-11B P9	Nº Historia	: No consta
Nº muestra	: 11000060	F y H Recepción	: 09/06/2009 9:20:28
Su referencia	: VAL-11B P9		
Doctor/ra	: No consta	F. Extracción	: No consta
Centro	: CENTRO INVESTIG. PRINCIPE FELIPE (I-15)	H. Extracción	: No consta
Tipo muestra	: <b>Células y medio de cultivo</b>		
Condiciones	: <b>Congelada</b>		
Observaciones	: <b>A/A Verónica Ruiz/Eugenia Póo</b> <b>Proyecto I15/Pedido nº 16537</b>		

#### 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

15 de junio de 2009  
Encarna Esteban Bermúdez

Primera impresión: 15/06/2009 17:08:25

Página 1 de 1

Registro mercantil de Valencia, tomo 5903, 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

## 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 10(5)  
Expected Viability: 96% to 97%  
Ampule 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 20108-2209

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**

Masia El Romeral  
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@ivami.com  
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 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 x 10.6 células  
Método utilizado: Mycotec TM con células indicadoras 376  
Resultado: Negativo (ausencia de Mycoplasma spp.)

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

Investigación de Citomegalovirus  
Muestra: ADN extraído de 2 x 10.6 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 3111, sección 6, folio 46, hoja nº 9/3111, inscripción 1ª - C.I.F. B-46037217

**Instituto Valenciano de Microbiología**

Masia El Romeral  
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@ivami.com  
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 10.6 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 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 x 10.6 células  
Método utilizado: doble PCR con secuencia del gen de la región NS5B.  
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 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 x 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 (VH-1)  
Muestra: ADN extraído de 2 x 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)

Registro mercantil de Valencia, tomo 5003, libro 3111, sección 6, folio 46, hoja nº 9/3111, inscripción 1ª - C.I.F. B-46037217

**Instituto Valenciano de Microbiología**

Masia El Romeral  
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@ivami.com  
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 (VH-2)  
Muestra: ADN extraído de 2 x 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 x 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 x 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)  
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 3111, sección 6, folio 46, hoja nº 9/3111, inscripción 1ª - C.I.F. B-46037217