

# BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)

*National Bank of Stem Cell Lines*

## IMPRESO DE SOLICITUD DE DEPÓSITO DE UNA LÍNEA iPS

*Application Form to Deposit an iPS cell line of human origin*

Documentos que se acompañan:

- Copia de la autorización de derivación de la línea celular, junto con informe del Comité Ético del centro de procedencia.

*A copy of the authorization for the derivation of the cell line, with the corresponding ethics committee approval*

- Copia de publicación científica relacionada con la derivación y/o caracterización de la línea.

*A copy of any relevant published scientific papers related to the derivation and/or characterization of the cell line*

- C. V. del investigador principal (una página; formato libre).

*A one page CV for the Principal Investigator*

### SECCIÓN 1

#### Section 1

### Información General

#### General Information

**Nombre de la línea:**

iPSC-HDFs-clone 30

**Investigador principal:**

*Principal Investigator:*

Pablo Menendez (Instituto Josep Carreras-Barcelona) y Plácido Navas (CABD-UPO-Sevilla)

**Tipo de célula de la que se obtiene la línea:**

*Cell type origin of the cell line*

Fibroblastos primarios humanos neonatales.

**¿El sujeto fuente tiene alguna patología?**

*Has the donor any pathological condition?*

**NO**       **SÍ**  (especificar)

**¿La patología es de origen genético?**

*Is the pathological condition of genetic origin?*

**NO**       **SÍ**  (especificar)  
No                      Yes                      (specify)

## Identificación genética de la línea celular. Método y resultado

*Genetic identity of the cell line. Method and result*

Se ha realizado fingerprinting.

[VER ANEXO 1-Fingerprinting](#)

## Cariotipo/Karyotype

**Euploide/Euploid**  **Anormal/Atypical**  (especificar/specify)

Se ha realizado bandeo G en 20 metafases tras 20 pases en cultivo y las células son diploides.

[VER ANEXO 2-Cariotipo](#)

## SECCIÓN 2

*Section 2*

## Datos del Depositante

*Applicant Details*

<b>Investigador Principal:</b> <i>Principal Investigator:</i> Pablo Menendez Plácido Navas	<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal address:</i> Pablo Menéndez PhD ICREA Research Professor Josep Carreras Leukaemia Research Institute Carrer Casanova 143. 08036. Barcelona. Spain
<b>Centro de Trabajo:</b> <i>Institution:</i> Josep Carreras Leukaemia Research Institute Universidad Pablo de Olavide (CABD)	<b>Teléfono (phone):</b> 935572809 <b>Fax:</b> 933231751 <b>E-mail:</b> <a href="mailto:pmenendez@carrerasresearch.org">pmenendez@carrerasresearch.org</a> ; <a href="mailto:pnavas@upo.es">pnavas@upo.es</a>

## SECCIÓN 3

*Section 3*

## Datos de la Línea Celular

*Details of Cell Line*

<b>Tejido de origen y localización anatómica de la muestra biológica</b> <i>Tissue of origin and anatomic location of the biological sample</i> La muestra procede de fibroblastos humanos primarios de prepucio obtenidos de la ATCC.	
<b>Muestra biológica</b> <i>Biological sample</i> <b>Fresco</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>Crioconservado</b> <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i>	
<b>Fecha de la donación del muestra biológica</b> <i>Date of donation of the biological sample</i> 2011	<b>Fecha del uso o descongelación</b> <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> No se congeló. Se expandió y una vez conseguidos stocks se fueron almacenando viales en nitrógeno líquido.

**Origen del soporte celular o acelular utilizado para la derivación, así como de los componentes de los medios de cultivo (si se describen en publicación, indicar además referencia)**

*Origin of the cellular or cellular free support used in derivation in addition to the components of the culture mediums (if they are described in a publication, please indicate the reference).*

Las iPSC se han generado en MEFs de la cepa MF1, irradiados. Se han mantenido en MEFS hasta su estabilización y caracterización. Luego se han pasado y adaptado a matrigel (soporte sin feeders). Siempre se han crecido con medio de ESC convencional (medio condicionado por MEFs; Menendez et al Mol Ther 2004) que contiene KO-DMEM+KO-SR+L-Glu+NEAA+B-mercaptoetanol+8ng/mL de bFGF.  
Las iPSC se han generado con virus de sendai (SeV-OKSM; Kit Cytotune, Invitrogen).

**Mantenimiento de la línea: Line maintenance**

En MEFs y en matrigel. Se mantiene con medio condicionado por MEFs.

**Ratio de pase: Passage ratio**

Se ha estado pasando 1:2, 1:3, 1:4 y 1:10 sin cambios en su estatus pluripotente.

**Método de pase: Passage method**

Se usa tripsina 0.05% durante 30 seg y se pasan en "clumps". Si hay muchas células diferenciadas se pasan con colagenasa/dispasa o de forma manual.

**Xenobióticos** **si**  
*Xenobiotics* *Yes*

**Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo**

**(forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma; otros)**

*Description of the morphological characteristics of the line in culture (form and size of the colonies; form and size of the cells; nucleus/cytoplasm ratio; others)*

Las colonias son típicas de iPSC o hESC. Tienen una alta relación núcleo:citoplasma. Hay colonias de tamaños diferentes pero todas tienen fenotipo epitelial excepto las de los bordes donde hay alguna célula haciendo EMT hacia diferenciación. [VER ANEXO 3-Morfología de las iPSC](#)

**Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)**

*Microbiological controls carried out (indicate in detail)*

**Bacteriología**

*(Bacteriology)*

No se ha testado.

**Micoplasma: PCR**

*(Mycoplasma: by PCR)*

Se han testado cada 4 semanas para micoplasma y son negativas por PCR. [VER ANEXO 4-PCR Micoplasma](#)

**Marcadores: [VER ANEXO 5-Marcadores de pluripotencia](#)**

*Markers*

	Método (ARN/proteínas)	nº pase	resultado	comentarios
<b>Oct 4</b>	ARN/proteína	p10	+	
<b>Nanog</b>	ARN/proteína	p10	+	
<b>Rex 1 (opcional/optional)</b>	ARN	p10	+	
<b>Sox 2</b>	ARN	p10	+	
<b>SSEA3</b>	proteína	p10	+	
<b>SSEA4</b>	proteína	p10	+	
<b>TRA-1-60</b>	proteína	p10	+	
<b>TRA-1-81</b>	proteína	p10	+	
<b>Fosfatasa Alc.</b>	proteína	p10	+	

**Capacidad de diferenciación***Differentiation capacity*VER ANEXO 6-Diferenciación *in vitro*.VER ANEXO 7-Diferenciación *in vivo*.

	Ectodermo/ <i>Ectoderm</i>			Endodermo/ <i>Endoderm</i>			Mesodermo/ <i>Mesoderm</i>		
	marcador <i>marker</i>	pase <i>passage</i>	resultado <i>result</i>	marcador <i>marker</i>	pase <i>passage</i>	resultado <i>result</i>	marcador <i>marker</i>	pase <i>passage</i>	resultado <i>result</i>
<b>In Vitro</b>	Tuj1 Nestin	p20 p20	+ +	AP	p10	+	no testado		
<b>In vivo/ <i>in vivo</i></b>	<b>Método:</b>			teratomas s.c			<b>Resultado: positivo (3 germ layers)</b>		

**Reprogramación del perfil de metilación del ADN***Reprogramming of DNA methylation profile*

Los promotores de NANOG y OCT4 se demetilan en las iPSC VER ANEXO 8.-Demetilación

**Descripción de las características de diferenciación *in vitro****Description of the differentiation characteristics in vitro*

Las células se han diferenciado con éxito a fibroblastos, músculo esquelético (protocolo de Perlingeiro lab) y neuronas motoras (Dircks et al) y precursores neuronales. Estos linajes expresan marcadores como Nestin, Tuj1, Isl1, AP, Pax7 etc. (VER ANEXO 6)

**Datos de la determinación de pluripotencialidad *in vivo* o formación de teratomas***Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation*

1 T25 al 70% de confluencia se ha inyectado vía subcutánea en ratones NSG. Tras 6 semanas han aparecido teratomas que han sido fijados y analizados por hematoxilina eosina mostrando tejidos de las 3 capas germinales.

**Datos de la tipificación HLA***HLA typification data*

Se ha hecho fingerprinting pero no tipaje HLA. (VER ANEXO 1)

**Integración de los transgenes de reprogramación: gPCR para integración de provirus***Integration of reprogramming transgenes: gPCR for provirus integration*

Los genes no se integran porque los SeV son no integrativos.

**Silenciamiento de los transgenes de reprogramación: RT-PCR o Q-RT-PCR***Silencing of reprogramming transgenes: RT-PCR o Q-RT-PCR*

Mostramos por qRT-PCR que los virus de Sendai se eliminan por división VER ANEXO 9-qRT-PCR SeV

**Mantenimiento a largo plazo en cultivo: > 20 pases***Long-term maintenance in culture: >20 passages*

Las iPSC se han mantenido por más de 30 pases y mantienen su pluripotencia y cariotipo normal. Son micoplasma negativas y sobreviven perfectamente a la congelación y descongelación.

**Pase en el momento del registro***Passage at the time of the recording*

Hay iPSC congeladas en distintos tiempos: tras 5, 10, 15, 20 pases etc.

<p><b>¿Ha sido la línea modificada genéticamente?</b>  <i>Has the line been genetically modified?</i></p> <p>Sí Yes <input type="checkbox"/> No No <input checked="" type="checkbox"/></p> <p><b>Comentarios/ Comments:</b></p>	<p><b>¿Se llevó a cabo un análisis clonal?</b>  <i>Has a clonal analysis been carried out?</i></p> <p>Sí/ Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> <b>Resultado / Result</b></p>
---	---

**Otras observaciones o información relevantes** (a juicio del Investigador Principal):  
 Other observations or relevant information (to the discretion of the Principal Investigator):

**Otras observaciones o información relevantes** (a rellenar por el BNLC):  
 Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)


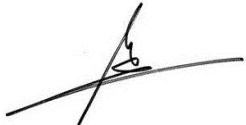
**Seguimiento de la línea** (a rellenar por el BNLC):  
 Follow up of the line (to be completed by BNLC)

## SECCIÓN 4

## Declaración

**Confirmando que la información contenida en estos impresos es cierta y asumo total responsabilidad sobre la misma.**

*I confirm that the information contained in this form is true and I assume total responsibility for it.*

<p><b>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre</b>  <i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i></p>  <p>Fecha/ Date: June 20, 2014</p>	<p><b>Firma del Investigador Principal</b>  <i>Signature of the Principal Investigator</i></p>  <p>Fecha /Date: June 20, 2014</p>
<p><b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b>  <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i>        Carles Esquerre I Victori</p>	
<p><b>Dirección Postal:</b>  <i>Postal Address:</i></p> <p>Carles Esquerre I Victori        Gerente        Instituto Josep Carreras contra la leucemia        Muntaner 383, 3rd 2n        08021 Barcelona</p>	<p><b>Teléfono /Telephone:</b> 935543050</p> <p><b>Fax:</b> 934651472</p> <p><b>E-mail:</b> <a href="mailto:cesquerre@carrerasresearch.org">cesquerre@carrerasresearch.org</a></p>