

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)
National Bank of Stem Cell Lines
IMPRESO DE SOLICITUD DE DEPÓSITO DE UNA LÍNEA
Application Form to Deposit a Human Cell Line

Documentos que se acompañan:

Attached documents:

- 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 cualquier 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
- Otros (especificar).
Others (specify)

Anexo 1: Tipado HLA y microsatélites.
HLA and STR analyses

Anexo 2: Secuencia de imágenes de la evolución del embrión descongelado hasta colonia primaria.
Representative images of the thawed embryo throughout the embryonic outgrowth development

Anexo 3: Informe del análisis microbiológico.
Microbiology Testing

Anexo 4: Informe del análisis de micoplasma.
Mycoplasma Testing

Anexo 5: Caracterización fenotípica
Immunophenotypic characterization

Anexo 6: Factores de Transcripción y Cariotipo (Bandeo G).
Expression of transcription factors and Karyotype G-Banding analyses

Anexo 7: Diferenciación *in vitro*.
In vitro differentiation

Anexo 8: Diferenciación *in vivo*.
In vivo differentiation

Anexo 9: Copia de la publicación (sometida)
Copy of the submitted manuscript.

SECCIÓN 1
Section 1

Información General
General Information

Nombre de la línea: AND-1
Name of the line:

Investigador principal: PABLO MENENDEZ BUJAN/JOSE LUIS CORTES ROMERO
Principal Investigator:

Origen de la línea celular:
Origin of the cell line

Embrionario Fetal Adulto
Embryonic Fetal Adult

¿La línea celular ha sido derivada de un embrión con anomalía genética?
Has the cell line been derived from an embryo with genetic anomaly?

NO SÍ (especificar)
No Yes (specify)

Identificación genética de la línea celular. Método y resultado
Genetic identity of the cell line. Method and result

Análisis de microsatélites (ver anexo 1)
Microsatellite characterization (see Annex 1)

SECCIÓN 2
Section 2

Datos del Depositante
Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Pablo Menendez Buján J.L. Cortés Romero	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Avda. Conocimiento s/n. Centro de Investigación Biomédica. 18100. Armilla (Granada)
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> BANCO ANDALUZ DE CÉLULAS MADRE Andalusian Stem Cell Bank	Teléfono (phone): +34 958 894 672 Fax: +34 958 894 652 E-mail: pablo.menendez@juntadeandalucia.es

<p>Tipo de muestra biológica (especificar estadio embrionario, semanas de gestación,...) <i>Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...)</i></p> <p>Embrión humano en estadio de blastocisto Blastocyst-stage human embryo</p>	
<p>Muestra biológica <i>Biological sample</i></p> <p style="text-align: center;">Fresco <input type="checkbox"/> Crioconservado <input checked="" type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i></p>	
<p>Fecha de la obtención del muestra biológica <i>Date of obtaining the biological sample</i></p> <p>July 1999</p>	<p>Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i></p> <p>9.6.2008</p>
<p>Fecha de la donación del muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i></p> <p>12.12.2007</p>	

<p>Descripción general del procesamiento previo del muestra biológica utilizado (cultivo embrionario, procesamiento muestra fetal o de tejido adulto) <i>General description of the processing of the biological sample used (embryonic culture, processing of fetal sample or of adult tissue)</i></p> <p>El embrión crioconservado donado fue descongelado en junio de 2008 mediante un protocolo de descongelación lenta utilizando glicerol y sacarosa. El embrión estaba congelado en día +6 desde el mes de julio de 1999. Tras 2 días de cultivo en medio secuencial especial para cultivo embrionario, suplementado con el inhibidor de ROCK Y-27632, se eliminó la zona pelucida utilizando Ácido Tyrode. El embrión se colocó directamente sobre una monocapa de células mesenquimales humanas (hMSCs) irradiadas y medio de cultivo de células madre embrionarias humanas (hESCs). Tras 4 días de cultivo, se apreció en la colonia primaria una zona que se correspondía con el aspecto característico de la masa celular interna (ICM). Se procedió entonces a la destrucción de las células del trofoblasto mediante el empleo de un disector láser para poder aislar la ICM, que fue subcultivada mecánicamente a una nueva placa con hMSCs (0.5×10^5 cells/cm²). (Anexo 2)</p> <p>The donated frozen embryo was thawed last June 2008 using a slow-freezing method with glycerol and sacarose. The embryo was initially frozen at day 6 of development. After 2 days in culture with sequential embryo culture media, G-1 v.5 and G-2 v.5 (Vitrolife) supplemented with the ROCK inhibitor Y-27632, the zona pellucida was removed with Tyrode's Acid. The embryo was then placed on a feeder layer of irradiated human mesenchymal stem cells and hESC media. Four days later, the inner cell mass could be detected. The trophoctoderm was disrupted by means of laser-assisted technology releasing the ICM. ICM outgrowths were allowed to expand further. The first ESC colonies started to show up and were subsequently subcultured on fresh irradiated human mesenchymal stem cells (0.5×10^5 cells/cm²) and hESC media (Annex 2).</p>

En caso de muestra embrionaria, indicar si se utilizaron blastómeros o células de la masa celular interna y el método de aislamiento utilizado

If of embryonic origin, indicate whether blastomeres or internal cell mass were used, as well as the isolation method

El blastocisto completo desprovisto de zona pelúcida fue colocado sobre hMSCs, aislando posteriormente la ICM mediante el empleo del láser (Anexo 2).

The whole blastocyst was seeded on hMSCs upon removal of the zona pellucida. The ICM was isolated using laser-assisted whole embryo culture (annex 2).

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).

Support: human mesenchymal cells cultured in IMDM and advanced-DMEM, respectively, plus 10% FCS and 2mM L-glutamine.

Culture medium: KO-DMEM supplemented with 20% KO Serum Replacement, 1% non-essential amino acids, 1mM L-glutamine, 0.1 mM β -mercaptoethanol and 8ng/mL of bFGF (all from Invitrogen, CA)

Mantenimiento de la línea: Line maintenance

Ratio de pase: *Passage ratio:* 1:2-1:3 cada 5-7 días; 1:2-1:3 every 5-7 days

Método de pase: *Passage method:* **método mecánico y enzimático;** either mechanical or enzymatic

Xenobióticos
Xenobiotics

si X
Yes

no
No

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)

El aspecto de las colonias es la típica de las hESCs: redondeado, aplanado y uniforme. Las colonias son grandes y sin bordes lisos. Alta relación nucle/citoplasma. (Anexo 2).

AND-1 showed the typical hESC morphology: round and flat colonies of uniform size. The colonies are medium-large size with well-defined edges. There is a high nucleus/cytoplasm ratio (Annex 2).

Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)

Microbiological controls carried out (indicate in detail)

Los estudios externos de micología y micoplasma son negativos tras 26 pases (Anexo 3 y 4)

Mycology and mycoplasma testing proved to be negative (Annex 3 & 4).

Marcadores (Anexos 5 & 6)*Markers*

	Método (ARN/proteínas) <i>Method</i> <i>(RNA/proteins)</i>	nº pase <i>Passage n.</i>	resultado <i>results</i>	comentarios <i>comments</i>
Oct 4	RT-PCR	7	+	(Anexo 6)
Nanog	RT-PCR	7	+	(Anexo 6)
Rex 1	RT-PCR	7	+	(Anexo 6)
Sox 2	RT-PCR	7	+	(Anexo 6)
SSEA3	Inmunofluoresc/citom flujo	7	+	(Anexo 5)
SSEA4	Inmunofluoresc/citom flujo	7	+	(Anexo 5)
TRA-1-60	Inmunofluoresc/citom flujo	7	+	(Anexo 5)
TRA-1-81	Inmunofluoresc/citom flujo	7	+	(Anexo 5)
Fosfatasa Alk.	Actividad	7	+	(Anexo 5)
Cariotipo / <i>Karyotype</i>		7	46, XY	(Anexo 6)
Otros / <i>Others</i>				

Capacidad de diferenciación (Anexos 7 & 8)*Differentiation capacity***In vitro (Anexo 7). Formación de cuerpos embrionarios****Presencia de linajes de las tres capas germinales.****Presence of tissues representing the three germ layers.****In vivo (Anexo 8)****Método: Formación de teratomas en ratones NOD/SCID****Resultado:+**

Method: Teratoma formation in NOD/SCID mice.

Result:+

Ectodermo/ <i>Ectoderm</i>			Endodermo/ <i>Endoderm</i>			Mesodermo/ <i>Mesoderm</i>		
marcador	pase	resultado	marcador	pase	resultado	marcador	pase	resultado
<i>marker</i>	<i>passage</i>	<i>result</i>	<i>marker</i>	<i>passage</i>	<i>result</i>	<i>marker</i>	<i>passage</i>	<i>result</i>
β-tubulina	10	+	α-fetoproteína	10	+	sm-actina	10	+
			Pan CK	10	+			
β-tubulin	10	+	α-fetoprotein	10	+	sm-actin	10	+
			Pan CK	10	+			

Descripción de las características de diferenciación *in vitro*

Description of the differentiation characteristics in vitro

Los cuerpos embrionarios se crecieron durante 22 días en presencia de 20% FCS. A continuación se embebieron en parafina y se hicieron inmunostainings para α -fetoproteína (endodermo), Actina (mesodermo) y β III-Tubulina (ectodermo). (Anexo 7).

Near confluent hESCs were treated with collagenase IV for 5 min at 37°C, transferred (2×10^2 cells/cm²) to non-adherent plates and allowed to differentiate spontaneously by embryoid body (EB) formation in DMEM supplemented with 20% FBS, 1% L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids and 0.1 mM β -mercaptoethanol with media changes every 4 days. After 21 days of EB differentiation, EBs were spun down, fixed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes and embedded in paraffin (Catalina et al., 2008a). For each staining, three sections per specimen were used. Then, the cells were incubated (1 hour at RT) with the primary antibodies anti- α -fetoprotein (Santa Cruz Biotechnology; 1:500 dilution in PBS), anti- β -III Tubulin (Chemicon, 1:100 dilution in PBS) and anti-smooth-muscle actin (Chemicon, 1:100 dilution in PBS). Slides were then incubated with a biotinylated secondary antibody (30 minutes at RT) and a streptavidin peroxidase complex (30 minutes at RT) (both from Vector Laboratories Inc). The immunostaining was visualized using diaminobenzidine and counterstained with hematoxylin. All the washing steps were done in PBS. (Annex 7).

Datos de la determinación de pluripotencialidad *in vivo* o formación de teratomas

Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation

Unas 20-40 colonias fueron transplantadas en el testículo de ratones NOD/SCID. Tras 8-10 semanas los ratones desarrollaron tumores palpables. Tras el sacrificio del ratón NOD/SCID, se extrajeron los testículos, se fijaron en formol y se obtuvieron muestras histológicas que se tiñeron con hematoxilina/eosina e IH para la identificación de tejidos pertenecientes a las tres capas germinales. (Anexo 8)

During routine passage, 20-40 clumps consisting of about 100 undifferentiated cells each were harvested and injected into the testis of 6 to 8-week-old NOD/SCIDIL2Ry^{-/-} mice. Eight to ten weeks later, the resulting teratomas were fixed in 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin, and examined histologically after hematoxylin and eosin staining as previously described (Cortes et al., 2008; Catalina et al., 2008a). (Annex 8)

Datos de la tipificación HLA

HLA typification data

Anexo 1 / Annex 1

Consistencia celular tras 6 pases de congelación y descongelación. Resultados.

Cell consistency after 6 passages of freezing and thawing. Results.

Las células han sido congeladas y descongeladas en varias ocasiones a lo largo de 28 pases. La viabilidad y consistencia celular es óptima. La congelación se ha realizado mediante el uso de un congelador programable.

Human ESCs survived well to several freeze-thaw procedures throughout 28 passages. Cell viability was high and stability was maintained. A programmed freezer was used to warrant high viability rates.

Pase en el momento del registro

Passage at the time of the recording

Actualmente, la línea se encuentra en pase 28. Existen viales congelados a diferentes momentos.

AND-1 hESC line has been grown for up to 28 passages. There are ampoules/stocks frozen at different time points.

¿Ha sido la línea modificada genéticamente?

Has the line been genetically modified?

Sí Yes

No No

Comentarios/ *Comments:*

¿Se llevó a cabo un análisis clonal?

Has a clonal analysis been carried out?

Sí Yes No

Resultado / *Result*

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

La línea embrionaria humana AND-1 ha sido derivada mediante el método de cultivo directo utilizando para el cultivo embrionario medio de cultivo suplementado con un inhibidor de ROCK, sobre una superficie celular formada por células mesenquimales humanas (hMSC). Esta línea crece actualmente tanto en hMSCs como en Matrigel.

AND-1 has been derived on MSCs used as feeders. To improve embryo survival the ROCK inhibitor Y-27632 was used. For ICM isolation the whole blastocyst culture method was employed. Currently, this hESC line has been successfully transferred to a feeder-free conditions using matrigel and hMSC-conditioned media. Gra-3 has been maintained feeder-free for 13 passages.

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

Confirmo 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.

Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre <i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i> <i>(Legal Representative of the Department/Centre)</i> JUAN JESÚS BANDERA Fecha/ Date:	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i> PABLO MENENDEZ BUJAN/JOSE LUIS CORTES ROMERO Fecha /Date
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> JUAN JESUS BANDERA. DIRECTOR GERENTE FUNDACIÓN PROGRESO Y SALUD	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Avda. Americo Vespucio, 5., bloque 2, 2ª planta, 41092, isla de la Cartuja, Sevilla	Teléfono / Telephone: +34 955 04 04 50 Fax: +34 955 04 04 57 E-mail: fundacion@fundacionprogresoysalud.org