

# 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)*

### SECCIÓN 1

*Section 1*

### Información General

*General Information*

**Nombre de la línea: bES[13]**

*Name of the line: bES[13]*

**(Células madre embrionarias de blastómero)**

*(Blastomeric embryonic stem cell)*

**Investigador principal:** Juan Carlos Izpisúa Belmonte. Anna Veiga Lluch

*Principal Investigator:*

Investigador colaborador: Josep Santaló Pedro (UAB)

*Collaborating 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*

Documento de Solicitud de Depósito de Línea Celular. Versión 3

Los apartados que requieran entrada de texto, deben rellenarse tanto en Castellano como en Inglés

*Text items should be filled in both Spanish and English*

**SECCIÓN 2**  
Section 2

**Datos del Depositante**  
Applicant Details

<b>Investigador Principal:</b> Juan Carlos Izpisúa Belmonte. Anna Veiga Lluch. <i>Principal Investigator:</i> <b>Investigador colaborador:</b> Josep Santaló Pedro (UAB) <i>Collaborating investigator:</i>	<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal address:</i> Dr Aiguader 88 08003 Barcelona
<b>Centro de Trabajo:</b> <i>Institution:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona	<b>Teléfono (phone):</b> 93 3160303 <b>Fax:</b> 93 3160301 <b>E-mail:</b> gerencia@cmrb.eu

**SECCIÓN 3**  
Section 3

**Datos de la Línea Celular**  
Details of Cell Line

<b>Tipo de muestra biológica (especificar estadio embrionario, semanas de gestación,...)</b> <i>Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...)</i> <b>Embrión humano en estadio D+2 (4 células).</b> <i>4 cells-stage human embryo</i>	
<b>Muestra biológica</b> <i>Biological sample</i> <p style="text-align: center;"><b>Fresco</b> <input type="checkbox"/> <b>Críoconservado</b> <input checked="" type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <span style="margin-left: 150px;"><i>Cryopreserved</i></span></p>	
<b>Fecha de la obtención del muestra biológica</b> <i>Date of obtaining the biological sample</i> 23.11.2001	<b>Fecha del uso o descongelación</b> <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 30.11.2011
<b>Fecha de la donación del muestra biológica</b> <i>Date of donation of the biological sample</i> 24.08.2006	

<p><b>Descripción general del procesamiento previo del muestra biológica utilizado (cultivo embrionario, procesamiento muestra fetal o de tejido adulto)</b> <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 criopreservado donado fue descongelado mediante un protocolo lento con PROH y sacarosa. El embrión había sido congelado en el 2º día de desarrollo. Tras 1 día de cultivo (6 células), se realizó una biopsia embrionaria mediante la perforación de la Zona Pelúcida (ZP) con un laser y la retirada de los blastómeros. Los blastómeros se incubaron por pares en un medio G2 (Vitrolife) suplementado con una concentración de 1.5 µg/ml de E-cadherina-Fc (Sigma) durante 24h. Posteriormente se eliminó la E-cadherina-Fc mediante un lavado en PBS sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> durante 5 min. Se sembró y co-cultivó pares de blastómeros aislados sobre una monocapa de fibroblastos irradiados y medio de derivación</p> <p>The donated frozen embryo was thawed using a slow protocol with PROH and sucrose. The embryo had been frozen on day 2 of development. After 1 day of culture (6 cells), embryo biopsy was performed by drilling the zona pellucida (ZP) with a laser and the blastomeres isolation. The blastomeres were incubated in pairs in G2 medium (Vitrolife) supplemented with a concentration of 1.5 µg/ml of E-cadherin-Fc (Sigma) for 24 h. Then, the E-cadherin-Fc was removed by washing in PBS without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> for 5 min. Isolated pairs of blastomeres were seeded on a monolayer of irradiated fibroblast in derivation medium.</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*

Se realizó el aislamiento de los blastómeros mediante perforación de la zona pelúcida con láser.

*The blastomere isolation was performed by drilling the zona pellucida(ZP) with a laser.*

**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 foreskin fibroblasts (ATCC, American Type Culture Collection, CCD1112Sk).

Culture medium: Knockout Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2 mmol/l

GlutaMAX (Gibco, InVitrogen corporation), 0,05mmol/l 2-mercaptoethanol (Gibco, InVitrogen corporation), 16

ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (Invitrogen), 1% non-essential amino acids (Cambrex), 20%

Knockout Serum Replacement (InVitrogen) y 0,5% Penicillin-Streptomycin (Gibco, InVitrogen corporation).

**Mantenimiento de la línea: Line maintenance**

**Ratio de pase:** *Passage ratio 1:2-1:3 cada 6/7 días; 1:2-1:3 every 6/7 days*

**Método de pase:** *Passage method mecánico y enzimático; mechanical and enzymatic*

**Xenobióticos**

*Xenobiotics*

**si X**

*Yes X*

**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)*

Colonias grandes poligonales, ligeramente aplanadas, de un tamaño entre 1- 3 mm de diámetro de diversas formas con bordes lisos. Células de tamaño uniforme y una elevada relación núcleo/citoplasma.

*Large and flat polygonal colonies, with uniformly sized cells of 1-3 mm of diameter. They have several forms and smooth edges. High nucleus/cytoplasm ratio.*

**Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)**

*Microbiological controls carried out (indicate in detail)*

Análisis de esterilidad, hongos, ureplasma y micoplasma. (ver Anexo 2)

*Sterility analysis, fungi, ureplasm and mycoplasm. (see Annex 2)*

**Marcadores: ver Anexo 3***Markers: see Annex 3*

	<b>Método (ARN/proteínas) Method (RNA/proteins)</b>	<b>nº pase Passage n.</b>	<b>resultado results</b>	<b>comentarios comments</b>
<b>Oct 4</b>	inmunofluorescencia	5	+	
<b>Nanog</b>	inmunofluorescencia	5	+	
<b>Rex</b>				
<b>Sox 2</b>	inmunofluorescencia	5	+	
<b>SSEA3</b>	inmunofluorescencia	5	+	
<b>SSEA4</b>	inmunofluorescencia	5	+	
<b>TRA-1-60</b>	inmunofluorescencia	5	+	
<b>TRA-1-81</b>	inmunofluorescencia	5	+	
<b>Telomerasa</b>				
<b>Fosfatasa Alk.</b>	actividad	5	+	
<b>Cariotipo / Karyotype</b>		10	46,XX	(ver Anexo 4)
<b>Otros / Others</b>				

**Capacidad de diferenciación***Differentiation capacity*

	<b>Ectodermo/ Ectoderm</b>			<b>Endodermo/Endoderm</b>			<b>Mesodermo/ Mesoderm</b>		
	<b>marcador marker</b>	<b>pase passage</b>	<b>resultado result</b>	<b>marcador marker</b>	<b>pase passage</b>	<b>resultado result</b>	<b>marcador marker</b>	<b>pase passage</b>	<b>resultado result</b>
<b>In Vitro</b>	Tuj1	5	+	α-feto proteína(AFP)	5	+	ASMA	5	+
<i>In vitro</i>	GFAP	5	+	FOXA2	5	+	ASA	5	+
Ver Anexo 5									
<b>In vivo/ in vivo</b>									
Ver Anexo 6				<b>Método:</b> formación de teratomas en ratones SCID			<b>Resultado: +</b>		
				<i>Method: teratoma formation in SCID mice</i>			<i>Result: +</i>		

**Descripción de las características de diferenciación *in vitro***

*Description of the differentiation characteristics in vitro*

Mesodermo: cultivo de cuerpos embrioides (EBs) en medio de cultivo suplementado con ácido ascórbico.  
Endodermo: cultivo de cuerpos embrioides. Ectodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio N2/B27.

*Mesoderm: Embryoids bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture. Ectoderm: EBs culture in N2/B27..*

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

*Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation*

Inyección intratesticular en ratones SCID de clumps de células indiferenciadas y tras aproximadamente 8 semanas, análisis de los teratomas producidos mediante técnicas de inmunohistoquímica para ectodermo, mesodermo y endodermo. (ver Anexo 6).

*Clumps of undifferentiated cells were injected into the testis and under the skin of SCID mice. Around 8 weeks later teratomas were analyzed by immunohistochemistry for ectoderm, endoderm and mesoderm (see Annex 6).*

**Datos de la tipificación HLA**

*HLA typification data*

Ver Anexo 1

*See Annex 1*

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

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

Se observa consistencia celular tras congelación y descongelación con crecimiento adecuado y características de indiferenciación.

*Cellular consistency after freezing and thawing, with adequate growth and undifferentiation characteristics.*

**Pase en el momento del registro**

*Passage at the time of the recording*

P25

**¿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):

**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.*

<p><b>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre</b> <i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i> <i>(Legal Representative of the Department/Centre)</i></p> <p> <b>CMRB</b> <small>Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona</small> Fecha / Date: 30/07/2012 Dr. Aiguader, 88</p>	<p><b>Firma del Investigador Principal</b> <i>Signature of the Principal Investigator</i></p> <p></p> <p>Fecha /Date 30/07/2012</p>
<p><b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b> <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Miguel Gómez Clares</p>	
<p><b>Dirección Postal:</b> <i>Postal Address:</i> Dr. Aiguader, 88, 7ª planta 08003, Barcelona</p>	<p><b>Teléfono /Telephone:</b> +34 93 316 03 03 <b>Fax:</b> +34 93 316 03 01 <b>E-mail:</b> gerencia@cmrb.eu</p>