

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

SECCIÓN 1

Section 1

Información General

General Information

Nombre de la línea: VAL-11B

Name of the line:

Investigador principal: Carlos Simón Vallés

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

Fingerprinting

Código: VAL-11B

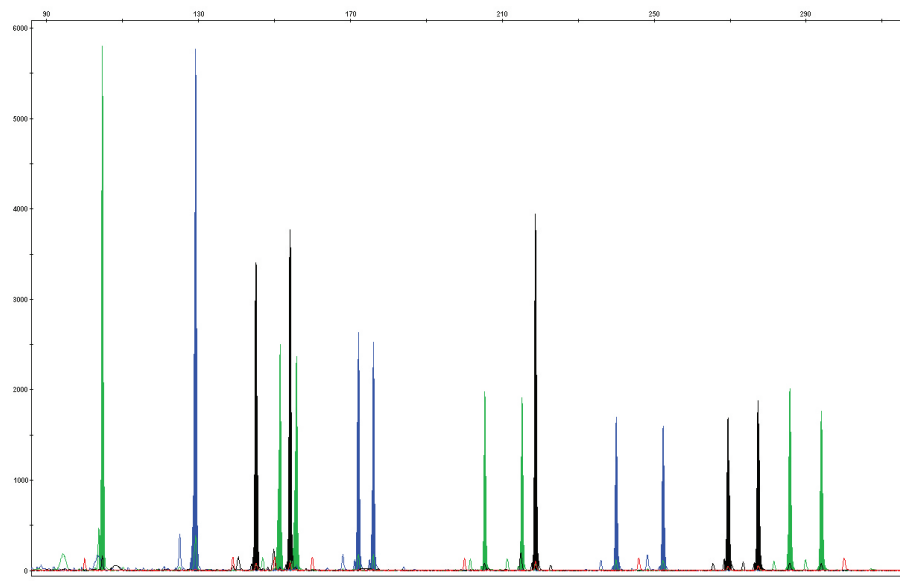
Servicio: Prueba de *fingerprinting* basada en el análisis de nueve marcadores polimórficos (ver lista); Estos 9 *loci* se heredan de forma independiente. Simultáneamente se co-amplifica un segmento del gen amelogenina, homólogo en cr. X e Y, para determinación del sexo de la muestra:

- A. D3S1358
- B. vWA
- C. FGA
- D. D8S1179
- E. D21S11
- F. D18S51
- G. D5S818
- H. D13S317
- I. D7S820

Método: PCR fluorescente y análisis de fragmentos en analizador genético AB 3130 según AmpFISTR Profiler Plus Loci, Applied Biosystems.

Muestras: ADN extraído a partir de colonias de VAL-11B recogidas en PBS.

Resultados: Línea de sexo femenino



Ana Cervero, PhD
Laboratorio de Diagnóstico Molecular (DGP-PCR)
Unidad de Diagnóstico Genético Preimplantacional
Tel 96 303 72 73 (Horario 16-19:00 horas) Fax 96 345 55 12



SECCIÓN 2
Section 2

Datos del Depositante
Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Carlos Simón Vallés	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Av. Autopista del Saler, 16
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centro de Investigación Príncipe Felipe (C.I.P.F.)	Teléfono (phone): +34 963 28 96 80 Fax: +34 963 28 97 01 E-mail: csimon@cipf.es

SECCIÓN 3
Section 3

Datos de la Línea Celular
Details of Cell Line

Tipo de muestra biológica (especificar estadio embrionario, semanas de gestación,...) <i>Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...)</i> Blastómera de un embrión humano en día 3 de desarrollo. <i>Blastomere of a human embryo at day 3 of development.</i>	
Muestra biológica <i>Biological sample</i> <p style="text-align: right;">Fresco <input type="checkbox"/> Crioconservado <input checked="" type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <input type="checkbox"/> <i>Cryopreserved</i> <input checked="" type="checkbox"/></p>	
Fecha de la obtención de la muestra biológica <i>Date of obtaining the biological sample</i> Congelación: 24/10/1996 Recepción: 18/05/2009 <i>Freeze: 24/10/1996</i> <i>Reception: 18/05/2009</i>	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 25/05/2009
Fecha de la donación del muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 10/02/2009	

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> El embrión congelado en día 2 de desarrollo donado para este proyecto, fue descongelado mediante un protocolo con DMSO y etilenglicol. Tras la descongelación, se mantuvo en medio IVF/CCM 1:1 (Vitrolife) durante 24 horas resultando en un embrión en día 3 de desarrollo con 1 sola blastómera íntegra y 5 degeneradas. Posteriormente se realizó el procedimiento modificado de biopsia de blastómera para PGD a través de micromanipulación y microdissección por láser. La blastómera se dejó en cultivo y 24 horas después, tras haberse dividido se cocultivó con fibroblastos humanos de foreskin irradiados y medio de cultivo hES y bFGF. <i>The frozen day-2 embryo was donated for this project, thawed following a protocol with DMSO and ethilenglicol. The embryo obtained was cultured in IVF/CCM medium 1:1 (Vitrolife) for 24 hours resulting in a day 3 embryo with one normal blastomere and five degenerated. After that, the blastomere biopsy procedure for PGD using laser microdissection and micromanipulation was performed. The blastomere was cultured and divided for 24 hours and then was cocultured with irradiated human foreskin fibroblast and hES medium plus bFGF.</i>
--

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 utilizó la única blastómera íntegra de un embrión en día 3 de desarrollo, obtenida por micromanipulación y microdissección por láser siguiendo un procedimiento modificado para PGD.

A single blastomere from a day 3 embryo was used, obtained by laser microdissection and micromanipulation, following a modified procedure for PGD.

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).

- Soporte celular /cellular support : human foreskin fibroblasts CCD112Sk (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA. N° catálogo: CRL-2429).
- Componentes del medio para Feeder / Feeder medium components: 90% Iscoves' Modified Dulbecco's médium (ATCC), n° Catálogo: 30-2005) + 10%Fetal Bovine Serum (PAA), n° catálogo:A15-101).
- Componentes del medio para hESC/ hESC medium components: 80% Knockout DMEM (Gibco/BRL, Paisley, Scotland, UK; n° catálogo 10829-018), 20% Knockout SERUM Replacement (Gibco/BRL; n° catálogo: 10828-028), 1 mM L-glutamine solution (Gibco/BRL; n° catálogo: 25030-024), 1% MEM non essential amino acids (100x) (Gibco/BRL; n° catálogo: 11140-035), 0.1 mM β -mercaptoethanol (Gibco/BRL; n° catálogo: 31350-10), 10 ng/ml human recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF) (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA ; n° catálogo: 13256-029)

Valbuena D, Galán A, Sánchez E, Poo ME, Gómez E, Sánchez-Luengo S, Melguizo D, García A, Ruiz A, Moreno R, Pellicer A, Simón C. Derivation and characterization of three new Spanish human embryonic stem cell lines (VAL-3,-4,-5) on human feeder and in serum-free conditions. *Reproductive BioMedicine Online* 2006; 13(6):875-86.

Cristobal Aguilar; María Poo; Eva Gomez; Amparo Galan; Eva Sanchez; Ana Marques-Mari; Veronica Ruiz; Jose Medrano; Marcia Riboldi; Diana Valbuena; Carlos Simon. Derivation, Characterization, Differentiation and Registration of Seven Human Embryonic Stem Cell Lines (VAL-3, -4, -5, -6M, -7, -8, and -9) on Human Feeder. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 2009 ; *In press*.

Mantenimiento de la línea: Line maintenance

Ratio de pase: Passage ratio 1:5

Método de pase: Passage method mecánico / mechanical

Xenobióticos si no
Xenobiotics Yes 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)

Morfología característica de células madre: colonias aplanadas, translúcidas y con bordes definidos, con células homogéneamente dispuestas en monocapa, y ratio núcleo/citoplasma elevado. Se agrupan en colonias de 3000-5000 células.

Characteristic morphology of human embryonic stem cells: flat colonies, translucent, with defined borders, with cells homogeneously located in a monolayer, and a high ratio of nucleus/cytoplasm . Colonies with 3000-5000 cells.

Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)

Microbiological controls carried out (indicate in detail)

El soporte celular fue testado para: mycoplasma, endotoxinas, citomegalovirus, Epstein-Barr, VHB, VHC, herpes humano 6(A) y 6(B), VIH1, VIH2, HTLV-I/II, parvovirus y transcriptasa reversa. Los resultados fueron negativos. Los controles fueron realizados por el Instituto Valenciano de Microbiología (IVAMI), entidad homologada por AENOR, ENAC y Consellería de Sanitat.

La línea fue testada para Mycoplasma y patógenos habituales. De forma rutinaria se realizan controles microbiológicos que aseguran la ausencia de microorganismos en las condiciones de cultivo utilizadas.

Cellular support was tested for: usual bacteria, Mycoplasma, endotoxin, cytomegalovirus, Epstein-Barr, HBV, HCV, human herpes 6(A) and 6(B), HIV1, HIV2, HTLV-I/II, parvovirus and reverse transcriptase. Results were negative. Controls were done by the Instituto Valenciano de Microbiología (IVAMI), homologated by AENOR, ENAC and Consellería de Sanitat.

Cell line was tested for Mycoplasma and common pathogens. Routinely, we perform microbiologic controls that ensure the absence of microorganisms in the culture conditions used.

Marcadores:*Markers*

	Método (ARN/proteínas) Method (RNA/proteins)	nº pase Passage n.	resultado results	comentarios comments
Oct 4	PCR e inmunocitoquímica (ICQ) / <i>PCR and immunocytochemistry (ICC)</i>	8	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
Nanog	PCR e ICQ/ <i>PCR and ICC</i>	8	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
Rex 1				
Sox 2				
SSEA3				
SSEA4	ICQ / <i>ICC</i>	8	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
TRA-1-60	ICQ / <i>ICC</i>	8	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
TRA-1-81	ICQ / <i>ICC</i>	8	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
Telomerasa/Telomerase	PCR	5	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
Fosfatasa Alk. /Alkaline phosphatase	ICQ / <i>ICC</i>	8	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
Cariotipo / Karyotype	bandas G / <i>G bands</i>	5	46,XX	femenino normal / <i>normal female</i>
Otros / Others				
Cripto, Dnmt3b, Gabr, Gdf3	PCR	5	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
Nfh	PCR	5	-	diferenciación / <i>differentiation</i> (ectodermo) / <i>(ectoderm)</i>
Ren	PCR	5	-	diferenciación / <i>differentiation</i> (mesodermo) / <i>(mesoderm)</i>
Amy	PCR	5	-	diferenciación / <i>differentiation</i> (endodermo) / <i>(endoderm)</i>

Capacidad de diferenciación*Differentiation capacity*

	Ectodermo/ Ectoderm			Endodermo/Endoderm			Mesodermo/ Mesoderm		
	marcador marker	pase passage	resultado result	marcador marker	pase passage	resultado result	marcador marker	pase passage	resultado result
In Vitro	tubulin β -III	8	positivo	α -fetoproteína	8	positivo	actina muscular	8	positivo
<i>In vitro</i>	<i>tubulin β-III</i>	<i>8</i>	<i>positive</i>	<i>α-fetoprotein</i>	<i>8</i>	<i>positive</i>	<i>muscle actin</i>	<i>8</i>	<i>positive</i>
In vivo / in vivo				Método: <i>Method:</i>	inducción de teratomas <i>teratomas induction</i>			Resultado: <i>Result:</i>	positivo <i>positive</i>

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

Formación de cuerpos embrioides e inmunocitoquímica para marcadores de diferenciación de ectodermo, mesodermo y endodermo.

Embryoid bodies formation and immunostaining against differentiation markers from ectoderm, mesoderm and endoderm.

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 30 colonias de la línea por testículo (90.000-150.000 células). Transcurridas 12 semanas, se sacrificaron los ratones y se obtuvieron tumores cuyo análisis anatómico-patológico e inmunohistoquímico demostró que se trataba de teratomas formados por tipos celulares propios de ectodermo, mesodermo y endodermo.

Intratesticular injection in SCID mice of 30 cell colonies of the line/testis (90,000-150,000 cells). After 12 weeks, the mice were sacrificed and tumors were obtained. Anatomopathological analysis and immunohistochemistry of tumors showed that they were teratomas with typical tissues from the ectoderm, mesoderm and endoderm.

Datos de la tipificación HLA*HLA typification data*

HLA-A*0101, HLA-A*0201
 HLA-B*1501, HLA-B*3701
 HLA-Cw*0303, HLA-Cw*0602
 HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*1104
 HLA-DQA1*0301, HLA-DQA1*0505
 HLA-DQB1*0302, HLA-DQB1*0301
 HLA-DPB1*0401, HLA-DPB1*0502

Consistencia celular tras 6 pases de congelación y descongelación. Resultados.*Cell consistency after 6 passages of freezing and thawing. Results.*

La línea celular se mantiene estable tras más de 6 pases siguiendo los procedimientos de congelación y descongelación propios.

The cell line is stable for more than 6 passages following our freezing and thawing protocol.

Valbuena D., Sánchez-Luengo S., Galán A., Sánchez E., Gómez E., Poo ME, Ruiz V, Genbacev O., Krtolica A., Pellicer A., Moreno R., Simón C. An Efficient Slow Freezing hESC Cryopreservation Method in Xeno-Free Conditions without the use of a programmable freezer. Reproductive BioMedicine Online, 2008 ; 17(1) : 127-135.

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

Pase 25

Passage 25

¿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):

En los controles habituales, ésta línea de hESC obtenida de una blastómera se comporta igual a las derivadas del embrión completo. Sin embargo, estamos realizando análisis genómicos y de metilación comparativos con nuestras líneas registradas.

Normal controls showed that this hESC line derived from a single blastomere behaves like hESC derived from complete embryos. However, we are making genomics and methylation analysis comparing with our lines registered

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>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></p> <p>Carlos Simón Vallés</p> <p>Fecha/ Date: 22/02/2010</p>	<p>Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i></p> <p>Carlos Simón Vallés</p> <p>Fecha /Date 22/02/2010</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Carlos Simón Vallés. Director Científico.</p>	
<p>Dirección Postal: <i>Postal Address:</i></p> <p>Centro de Investigación Príncipe Felipe Av. Autopista del Saler, 16-3 46012 Valencia</p>	<p>Teléfono /Telephone: +34 963 28 96 80</p> <p>Fax: +34 963 28 97 01</p> <p>E-mail: csimon@cipf.es</p>