

# 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: Informe independiente del análisis de microsatélites y del tipado HLA

Anexo 2: Informe independiente del análisis microbiológico

Anexo 3: Fenotipo. Marcadores indiferenciación

Anexo 4: Informe independiente de la caracterización cariotípica

Anexo 5: Diferenciación *in vitro*

Anexo 6: Diferenciación *in vivo*.

## SECCIÓN 1

*Section 1*

## Información General

*General Information*

**Nombre de la línea: ES[6]**

*Name of the line:*

**Investigador principal: JUAN CARLOS IZPISÚA BELMONTE/ANNA VEIGA LLUCH**

*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

<b>Investigador Principal:</b> <i>Principal Investigator:</i> JUAN CARLOS IZPISÚA BELMONTE ANNA VEIGA LLUCH	<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. Center of Regenerative Medicine in Barcelona	<b>Teléfono (phone):</b> +34 93 316 03 60 <b>Fax:</b> +34 93 316 03 62 <b>E-mail:</b> blc@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 de blastocisto</b> <i>Blastocyst-stage human embryo</i>	
<b>Muestra biológica</b> <i>Biological sample</i> <p style="text-align: center;"><b>Fresco</b> <input type="checkbox"/> <b>Crioconservado</b> <input checked="" type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <input type="checkbox"/> <i>Cryopreserved</i> <input checked="" type="checkbox"/></p>	
<b>Fecha de la obtención del muestra biológica</b> <i>Date of obtaining the biological sample</i> 09.05.2001	<b>Fecha del uso o descongelación (si congelado)</b> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 16.10.2006
<b>Fecha de la donación del muestra biológica</b> <i>Date of donation of the biological sample</i> 14.03.2006	

<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>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 4 días de cultivo, se eliminó la zona pelúcida (ZP) del embrión mediante pronasa. Se sembró y co-cultivó el blastocisto desprovisto de ZP sobre una monocapa de fibroblastos irradiados y medio de cultivo hES.</p> <p><i>The donated frozen embryo was thawed using a slow protocol with PROH and sucrose. The embryo had been frozen at day 2 of development. After 4 days in culture, the embryo achieved the blastocyst stage. The zona pel-lucida (ZP) was removed using pronase. The blastocyst was seeded and cultured in hES medium on top of a irradiated feeder-layer.</i></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 sembró el blastocisto entero desprovisto de la zona pelúcida, sin aislamiento de la masa celular interna.

The whole blastocyst was seeded without zona pel-lucida, without prior isolation of the inner cell mass.

**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), 8

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; mechanical*

**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)

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 y micoplasma. (ver Anexo 2)

Sterility analysis, fungi and mycoplasma. (see Annex 2)

<b>Marcadores:</b> <i>Markers</i>				
	<b>Método</b> <b>(ARN/proteínas)</b> <i>Method</i> <i>(RNA/proteins)</i>	<b>nº pase</b> <i>Passage n.</i>	<b>resultado</b> <i>results</i>	<b>comentarios</b> <i>comments</i>
<b>Oct 4</b>	inmunofluorescencia	21	+	(ver Anexo 3)
<b>Nanog</b>	inmunofluorescencia	21	+	
<b>Rex 1</b>				
<b>Sox 2</b>	inmunofluorescencia	21	+	
<b>SSEA3</b>	inmunofluorescencia	21	+	
<b>SSEA4</b>	inmunofluorescencia	21	+	
<b>TRA-1-60</b>	inmunofluorescencia	21	+	
<b>TRA-1-81</b>	inmunofluorescencia	21	+	
<b>Telomerasa</b>	actividad	58	+	
<b>Fosfatasa Alk.</b>	actividad	22	+	
<b>Cariotipo</b>		20	46, XY	(ver Anexo 4)
<b>Otros</b>				

<b>Capacidad de diferenciación</b> (ver Anexo 5) <i>Differentiation capacity</i>									
	<b>Ectodermo/ Ectoderm</b>			<b>Endodermo/Endoderm</b>			<b>Mesodermo/ Mesoderm</b>		
	<b>marcador</b> <i>marker</i>	<b>pase</b> <i>passage</i>	<b>resultado</b> <i>result</i>	<b>marcador</b> <i>marker</i>	<b>pase</b> <i>passage</i>	<b>resultado</b> <i>result</i>	<b>marcador</b> <i>marker</i>	<b>pase</b> <i>passage</i>	<b>resultado</b> <i>result</i>
<b>In Vitro</b>	$\beta$ -tubulina	42	+	$\alpha$ -fetoproteína	42	+	$\alpha$ -actinina	42	+
<i>In vitro</i>	$\beta$ -tubulin	42	+	$\alpha$ -fetoprotein	42	+	$\alpha$ -actinin	42	+
<b>In vivo/ in vivo</b> (ver Anexo 6)		<b>Método: formación de teratomas en ratones SCID</b> <i>Method: teratoma formation in SCID mice.</i>				<b>Resultado: +</b> <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 en medio de cultivo. Ectodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio N2/B27 suplementado con ácido retinoico.

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

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

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

Se realizaron tinciones histológicas estándar con hematoxilina/eosina y a continuación fueron identificados tejidos procedentes de las tres capas germinales por un histopatólogo. También se realizaron pruebas de inmunohistoquímica para evidenciar la presencia de los mismos marcadores que en la diferenciación *in vitro*.

*Standard histological staining was done with hemotoxilin/eosin and tissues derived from all three germ layer were identified by a hystopathologist. Immunohystochemistry staining also was performed to show the presence of the same markers than in vitro differentiation.*

**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 6 pases de congelación y descongelación con crecimiento adecuado y características de indiferenciación.

*Cellular consistency after 6 procedures of freezing and thawing, with adequate growth and undifferentiation characteristics.*

**Pase en el momento del registro**

*Passage at the time of the recording*

P 75

**¿Ha sido la línea modificada genéticamente?**

*Has the line been genetically modified?*

Sí Yes

No No

**¿Se llevó a cabo un análisis clonal?**

*Has a clonal analysis been carried out?*

Sí/ Yes  No

**Resultado / Result**

**Comentarios/ Comments:**

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

La línea ES[5] y la línea ES[6] proceden de dos embriones de la misma cohorte.

*The ES[5] and ES[6] lines come from two embryos from the same cohort.*

**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)

