

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: ES[11-EM]
Name of the line: ES[11-EM]

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)

Embrión portador de la mutación c.484delC en el exón 2 del gen EXT2, causante de la exostosis múltiple tipo 2.

Embryo carrier of the mutation c.484delC in the exon 2 of the gen EXT2, responsible of the multiple exostosis type 2.

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

Análisis de HLA y microsatélites (ver Anexo 1)

HLA and microsatellite characterization (see Annex 1)

Informe de la detección de la mutación (ver Anexo 2)

Detection of the mutation form (see Annex 2)

SECCIÓN 2

Section 2

Datos del Depositante

Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Juan Carlos Izpisua Belmonte Anna Veiga Lluch	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Dr Aiguader 88 08003 Barcelona
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona	Teléfono (phone): 93 3160360 Fax: 93 3160362 E-mail: blc@cmrb.eu

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> Embrión humano en estadio de blastocisto <i>Blastocyst-stage human embryo</i>	
Muestra biológica <i>Biological sample</i> Fresco ☐ Crioconservado ☒ <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i>	
Fecha de la obtención del muestra biológica <i>Date of obtaining the biological sample</i> 09.05.2007	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 21.04.2009
Fecha de la donación del muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 15.05.2007	

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 criopreservado donado fue desvitrificado mediante un protocolo lento con sacarosa y albúmina humana (HSA). El embrión había sido congelado en el 6º día de desarrollo. Tras 2 días de cultivo en medio condicionado con hESC, se eliminó la zona pelúcida (ZP) del embrión mediante pronasa. Se sembró y co-cultivó el embrión desprovisto de ZP sobre una monocapa de fibroblastos irradiados y medio de derivación. <i>The donated frozen embryo was warmed using a slow protocol with human albumin (HAS) and sucrose. The embryo had been frozen at day 6 of development. After 2 days in culture in conditioned medium with hESC the zona pel-lucida (ZP) was removed using pronase. The embryo was seeded and cultured in derivation medium on top of a irradiated feeder-layer.</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 sembró el embrión compactado desprovisto de la zona pelúcida, sin aislamiento de la masa celular interna.

The compacted embryo 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: 50% hES medium /50% hES condicionado in hESC medium.

hES 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 micoplasma mensuales.
Mycoplasma analisis every month.

Marcadores: <i>Markers</i>				
	Método (ARN/proteínas) <i>Method (RNA/proteins)</i>	nº pase <i>Passage n.</i>	resultado <i>results</i>	comentarios <i>comments</i>
Oct 4	inmunofluorescencia	10	+	(ver Anexo 3)
Nanog	inmunofluorescencia	10	+	
Rex				
Sox 2	inmunofluorescencia	10	+	
SSEA3	inmunofluorescencia	10	+	
SSEA4	inmunofluorescencia	10	+	
TRA-1-60	inmunofluorescencia	10	+	
TRA-1-81	inmunofluorescencia	10	+	
Telomerasa	actividad	10		
Fosfatasa Alk.	actividad	10	+	
Cariotipo / <i>Karyotype</i>		11	46,XY	(ver Anexo 4)
Otros / <i>Others</i>				

Capacidad de diferenciación										
Differentiation capacity										
Ectodermo/ Ectoderm				Endodermo/Endoderm			Mesodermo/ Mesoderm			
marcador	pase	resultado		marcador	pase	resultado	marcador	pase	resultado	
marker	passage	result		marker	passage	result	marker	passage	result	
In Vitro	Tuj1	12	+	α-feto proteína	12	+	GATA4	12	+	
	In vitro	GFAP	12	+	FOXA2	12	+	actin-α-smooth muscle	12	+
	ver Anexo 5									
In vivo/ in vivo		Método: formación de teratomas en ratones SCID					Resultado: +			
Ver Anexo 6		Method: teratoma formation in SCID mice					Result: +			

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.

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

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

Inyección intratesticular en ratones SCID de clumps de células indiferenciadas. Se realizaron tinciones histológicas estándar con hematoxilina/eosina y a continuación fueron identificados tejidos procedentes de las tres capas. También se realizaron pruebas de inmunohistoquímica para evidenciar la presencia de marcadores de las 3 líneas germinales: ectodermo, endodermo y mesodermo.

Clumps of undifferentiated cells were injected into the testis of SCID mice. 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 markers of the three germ lines: ectoderm, endoderm y mesoderm.

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 alter 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

P11

¿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)

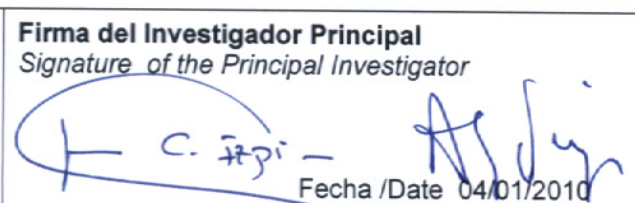
Seguimiento de la línea (a rellenar por el BNLC):
Follow up of the line (to be completed by BNLC)

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.

Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre (Representante legal del Departamento/Centro) (Legal Representative of the Department/Centre)  Dr. Aguader, 88 08003 BARCELONA T. 93 316 7222 Fecha / Date: 04/01/2010	Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator  Fecha / Date: 04/01/2010
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: Name and Position of the Person Representing the Centre: Miguel Gómez Clares. Presidente de la Junta de Gobierno	
Dirección Postal: Postal Address: Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona Dr. Aguader, 88 08003. Barcelona	Teléfono / Telephone: +34 93 316 03 00 Fax: +34 93 316 03 01 E-mail: com@cmrb.eu