

# 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[8]**

*Name of the line: ES[8]*

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

*Principal Investigator:*

**Origen de la línea celular:**

*Origin of the cell line*

**Embrionario** ☒

*Embryonic*

**Fetal** ☐

*Fetal*

**Adulto** ☐

*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** ☒

*No*

**SÍ** ☐ (especificar)

*Yes (specify)*

**Identificación genética de la línea celular. Método y resultado**

*Genetic identity of the cell line. Method and result*

**Análisis de HLA y microsatélites (ver Anexo 1)**

*HLA and microsatellite characterization (see Annex 1)*

## SECCIÓN 2

### Section 2

## Datos del Depositante

### Applicant Details

|                                                                                                                      |                                                                                             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Investigador Principal:</b><br><i>Principal Investigator:</i><br>Juan Carlos Izpisua Belmonte<br>Anna Veiga Lluch | <b>Dirección Postal:</b><br><i>Postal address:</i><br>Dr Aiguader 88 08003 Barcelona        |
| <b>Centro de Trabajo:</b><br><i>Institution:</i><br>Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona                     | <b>Teléfono (phone):</b> 93 3160360<br><b>Fax:</b> 93 3160362<br><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><br><i>Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...)</i><br><b>Embrión humano en estadio de compactación en día 8 de desarrollo</b><br>Compacted human embryo at day 8 of development |                                                                                                              |
| <b>Muestra biológica</b><br><i>Biological sample</i><br><div><b>Fresco</b> <input type="checkbox"/><br/><i>Fresh</i></div> <div><b>Crioconservado</b> <input checked="" type="checkbox"/><br/><i>Cryopreserved</i></div>                                                                                        |                                                                                                              |
| <b>Fecha de la obtención del muestra biológica</b><br><i>Date of obtaining the biological sample</i><br>18.06.2002                                                                                                                                                                                              | <b>Fecha del uso o descongelación (si congelado)</b><br><i>Date used or thawed (if frozen)</i><br>06.03.2009 |
| <b>Fecha de la donación del muestra biológica</b><br><i>Date of donation of the biological sample</i><br>20.10.2006                                                                                                                                                                                             |                                                                                                              |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Descripción general del procesamiento previo del muestra biológica utilizado (cultivo embrionario, procesamiento muestra fetal o de tejido adulto)</b><br><i>General description of the processing of the biological sample used (embryonic culture, processing of fetal sample or of adult tissue)</i><br><p>El embrión criopreservado donado fue descongelado mediante un protocolo lento con PROH y sacarosa. El embrión había sido congelado en el 3er día de desarrollo. Tras 5 días de cultivo, se eliminó la zona pelúcida (ZP) del embrión mediante pronasa. Se sembró y co-cultivó el embrión en estadio de compactación desprovisto de ZP sobre una monocapa de fibroblastos irradiados y medio de derivación.</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 zona pel-lucida (ZP) was removed using pronase. The compacted embryo was seeded and cultured in derivation 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 embrión en estadio de compactación entero desprovisto de la zona pelúcida.

*The whole compacted embryo was seeded without zona pel·lucida.*

**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, CCD112Sk).

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 esterilidad, hongos y micoplasma. (ver Anexo 2)

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

| Marcadores:<br><i>Markers</i> |                                                               |                              |                             |                                |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
|                               | Método<br>(ARN/proteínas)<br><i>Method<br/>(RNA/proteins)</i> | nº pase<br><i>Passage n.</i> | resultado<br><i>results</i> | comentarios<br><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                                                     | 10/15                        | +                           |                                |
| Cariotipo / <i>Karyotype</i>  |                                                               | 10                           | 46,XY                       | (ver Anexo 4)                  |
| Otros / <i>Others</i>         |                                                               |                              |                             |                                |

| Capacidad de diferenciación<br><i>Differentiation capacity</i> |                                                                                                  |                            |   |                            |                        |                                  |                            |                        |                            |
|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|---|----------------------------|------------------------|----------------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|
| Ectodermo/ <i>Ectoderm</i>                                     |                                                                                                  |                            |   | Endodermo/ <i>Endoderm</i> |                        |                                  | Mesodermo/ <i>Mesoderm</i> |                        |                            |
| marcador<br><i>marker</i>                                      | pase<br><i>passage</i>                                                                           | resultado<br><i>result</i> |   | marcador<br><i>marker</i>  | pase<br><i>passage</i> | resultado<br><i>result</i>       | marcador<br><i>marker</i>  | pase<br><i>passage</i> | resultado<br><i>result</i> |
| In Vitro                                                       | Tuj1                                                                                             | 10                         | + | α-feto proteína            | 10                     | +                                | GATA4                      | 10                     | +                          |
| In vitro                                                       | GAFP                                                                                             | 10                         | + | FoxA2                      | 10                     | +                                | actin-α-smooth muscle      | 10                     | +                          |
| ver Anexo 5                                                    |                                                                                                  |                            |   |                            |                        |                                  |                            |                        |                            |
| In vivo/ <i>in vivo</i>                                        | Método: formación de teratomas en ratones SCID<br><i>Method: teratoma formation in SCID mice</i> |                            |   |                            |                        | Resultado: +<br><i>Result: +</i> |                            |                        |                            |
| Ver Anexo 6                                                    |                                                                                                  |                            |   |                            |                        |                                  |                            |                        |                            |

**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**

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

Inyección intratesticular en ratones SCID de clumps de células indiferenciadas. Pendiente de resultados.

*Clumps of undifferentiated cells were injected into the testis of SCID mice. Results on going.*

**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*

P16

**¿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)

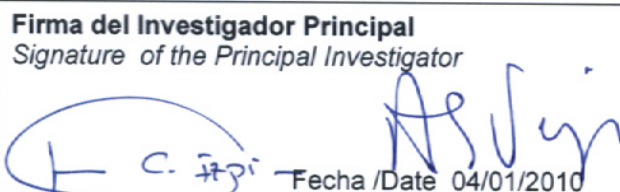
**Seguimiento de la línea** (a rellenar por el BNLC):  
Follow up of the line (to be completed by BNLC)

## SECCIÓN 4

## Declaración

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.

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