

# 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:** [GA]FiPS4F

*Name of the line:* [GA]FiPS4F

**Investigador principal:** Juan Carlos Izpisúa Belmonte, Anna Veiga Lluch, Alessandra Giorgetti

*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*

**SECCIÓN 2**  
*Section 2*

**Datos del Depositante**  
*Applicant Details*

<b>Investigador Principal:</b> <i>Principal Investigator:</i> Juan Carlos Izpisúa Belmonte Anna Veiga Lluch Alessandra Giorgetti	<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 3160300 <b>Fax:</b> 93 3160362 <b>E-mail:</b> blc@cmrb.eu

**SECCIÓN 3**  
Section 3

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

<p><b>Tipo de muestra biológica (especificar estadio embrionario, semanas de gestación,...)</b> <i>Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...)</i> Fibroblastos procedentes de un paciente afecto de deficiencia de Glutaril aciduria dehidrogenasa. <i>Fibroblasts from a patient with Glutaril aciduria dehydrogenase deficiency disease</i></p>	
<p><b>Muestra biológica</b> <i>Biological sample</i> Fibroblastos procedentes de un paciente afecto de deficiencia de Glutaril aciduria dehidrogenasa. <i>Fibroblasts from a patient with Glutaril aciduria dehydrogenase deficiency disease</i></p> <p style="text-align: center;"> <b>Fresco</b> <input type="checkbox"/>                      <b>Crioconservado</b> <input checked="" type="checkbox"/>  <i>Fresh</i>    <i>Cryopreserved</i> </p>	
<p><b>Fecha de la obtención del muestra biológica</b> <i>Date of obtaining the biological sample</i> 10.10.2003</p>	<p><b>Fecha del uso o descongelación (si congelado)</b> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 07.01.2009</p>
<p><b>Fecha de la donación del muestra biológica</b> <i>Date of donation of the biological sample</i> 10.10.2003</p>	

**Descripción general del procesamiento previo del muestra biológica utilizado (cultivo embrionario, procesamiento muestra fetal o de tejido adulto)**  
*General description of the processing of the biological sample used (embryonic culture, processing of fetal sample or of adult tissue)*

Descongelar 1 vial de fibroblastos (pase 1-5) y sembrar en 6 pocillos de una placa de 6 pocillos con medio DMEM+10% FBS. Incubar a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Cuando estén aproximadamente 50-60% confluentes tripsinizar y sembrar 1x10<sup>5</sup> en una placa de 6 pocillos en medio DMEM+10% FBS. Platear 6 pocillos: 5 para la reprogramación con OSKM o OSK y 1 como control positivo con GFP. Incubar durante 24h.  
Tras 24h las células deben estar confluentes 40-50%. Aspirar el medio de las placas de fibroblastos y añadir 4ml de la mezcla de sobrenadante retroviral de OSKM o OSK filtrado. Centrifugar la(s) placa(s) a 750g durante 45 min. a 32°C. Dejar el medio de retrovirus en los pocillos y incubar a 37°C, 5%CO<sub>2</sub> durante 24h. Tras 24h. repetir la infección. Al día siguiente aspirar el medio y añadir 2ml de DMEM+10% FBS y incubar 24h.  
Un día después de la 2ª infección tripsinizar las células y platear en placas de 100 mm presembradas con HFF-1 irradiados y en presencia de medio hES. Incubar a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Tras dos días cambiar el medio hES diariamente hasta que aparezcan colonias.

*Thaw 1 vial of fibroblast at passage 0-5 and seed into pre-coated 6-wells of 6-well plate with DMEM medium+ 10%FB. Incubate at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. When the cells are approximately 50-60% confluent trypsinize them and seed 1x10<sup>5</sup> of fibroblast in a 6-well plate in presence of DMEM+10% FBS. Plate 6 wells: 5 for reprogramming with OSKM or OSK and 1 as a positive control with GFP reporter. Place in a 37 °C 5% CO<sub>2</sub> incubator for 24h.*

*The following day the cells should be 40-50% confluent. Aspirate the medium of the fibroblast plates and add fresh 4 ml OSKM or OSK mix of retroviral supernatant filtered. Centrifuge the plate(s) at 750xg for 45 min at 32 °C. Leave the retrovirus containing media in the wells and incubate at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 24h. After 24 h repeat, the infection as above. The day after aspirate the medium and add 2 ml of DMEM medium+10% FBS and incubate at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 24h.*  
*One day after the second infection trypsinize the cells and plate them onto 100-mm plates preseeded with irradiated HFFs and in presence of hES medium. Incubate the plate at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. After 2 days change the hES medium daily until iPSC colonies appear.*

**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*

**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: Matrigel (Becton Dickinson, S.A. cat. No. 356234),  
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 micoplasma.

*Mycoplasma analysis.*

**Marcadores:** Ver Anexo 1*Markers*

	<b>Método (ARN/proteínas)</b>	<b>nº pase</b>	<b>resultado</b>	<b>comentarios</b>
	<i>Method (RNA/proteins)</i>	<i>Passage n.</i>	<i>results</i>	<i>comments</i>
<b>Oct4</b>	inmunofluorescencia	12	+	
<b>Nanog</b>	inmunofluorescencia	12	+	
<b>Rex 1</b>	-			
<b>Sox 2</b>	inmunofluorescencia	12	+	
<b>SSEA3</b>	inmunofluorescencia	12	+	
<b>SSEA4</b>	inmunofluorescencia	12	+	
<b>TRA-1-60</b>	inmunofluorescencia	12	+	
<b>TRA-1-81</b>	inmunofluorescencia	12	+	
<b>Telomerasa</b>				
<b>Fosfatasa Alk.</b>	Actividad	15	+	
<b>Cariotipo</b>		11	46, XX	ver Anexo 2
<b>Otros</b>				

**Capacidad de diferenciación***Differentiation capacity*

	<b>Ectodermo/ Ectoderm</b>			<b>Endodermo/Endoderm</b>			<b>Mesodermo/ Mesoderm</b>		
	<b>marcador</b>	<b>pase</b>	<b>resultado</b>	<b>marcador</b>	<b>pase</b>	<b>resultado</b>	<b>marcador</b>	<b>pase</b>	<b>resultado</b>
	<i>marker</i>	<i>passage</i>	<i>result</i>	<i>marker</i>	<i>passage</i>	<i>result</i>	<i>marker</i>	<i>passage</i>	<i>result</i>
<b>In Vitro</b>	GFAP	13	+	$\alpha$ -feto proteina	13	+	actina sarcomerica	13	+
Anexo 3	Tuj1	13	+	FoxA2			PAX7	13	+
<i>In vitro</i>	<i>GFAP</i>	<i>13</i>	<i>+</i>	<i><math>\alpha</math>-feto protein</i>	<i>13</i>	<i>+</i>	<i>sarcomeric actin</i>	<i>13</i>	<i>+</i>
<i>Annex 3</i>	<i>Tuj1</i>	<i>13</i>	<i>+</i>	<i>FoxA2</i>			<i>PAX7</i>	<i>13</i>	<i>+</i>

**In vivo/ in vivo p 15 (Anexo 4)** **Método:** formación de teratomas en ratones SCID **Resultado: +**  
*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. Ectodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio N2/B27.

*Mesoderm: Embryoid 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 4).

*Clumps of undifferentiated cells were injected into the testis of SCID mice. Around 8 weeks later teratomas were analyzed by immunohistochemistry for ectoderm, endoderm and mesoderm (see Annex 4).***Datos de la tipificación HLA***HLA typification data***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

**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.*

<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 style="text-align: right;">Fecha/ Date: 21/05/2010</p>	<b>Firma del Investigador Principal</b> <i>Signature of the Principal Investigator</i>   <p style="text-align: right;">Fecha /Date: 21/05/2010</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. Presidente de la Junta de Gobierno	
<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal Address:</i> Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona Dr. Aiguader, 88, 7ª planta 08003. Barcelona.	<b>Teléfono /Telephone:</b> +34 93 316 03 00 <b>Fax:</b> +34 93 316 03 00 <b>E-mail:</b> com@cmrb.eu