

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[7]

Name of the line: ES[7]

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 HLA y microsatélites (ver Anexo 1)

HLA and microsatellite characterization (see Annex 1)

SECCIÓN 2

Section 2

Datos del Depositante

Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Juan Carlos Izpisúa 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 compactación en día 6 de desarrollo <i>Compacted human embryo in day 6 of development</i>	
Muestra biológica <i>Biological sample</i> <p style="text-align: right;">Fresco <input type="checkbox"/> Crioconservado <input checked="" type="checkbox"/></p> <p style="text-align: right;"><i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i></p>	
Fecha de la obtención del muestra biológica <i>Date of obtaining the biological sample</i> 14.07.2003	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 16.01.2009
Fecha de la donación del muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 29.04.2008	

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> <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 3 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 3 of development. After 3 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 una masa celular compactada desprovista de la zona pelúcida.

A compacted cellular mass was seeded without zona pelúcida.

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 y enzimático; *mechanical and enzymatic*

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:				
<i>Markers</i>				
	Método	nº pase	resultado	comentarios
	(ARN/proteínas)			
	<i>Method</i>	<i>Passage n.</i>	<i>results</i>	<i>comments</i>
	<i>(RNA/proteins)</i>			
Oct 4	inmunofluorescencia	11	+	(ver Anexo 3)
Nanog	inmunofluorescencia	11	+	
Rex				
Sox 2	inmunofluorescencia	11	+	
SSEA3	inmunofluorescencia	11	+	
SSEA4	inmunofluorescencia	11	+	
TRA-1-60	inmunofluorescencia	11	+	
TRA-1-81	inmunofluorescencia	11	+	
Telomerasa	actividad	15		
Fosfatasa Alk.	actividad	11/21	+	
Cariotipo / Karyotype		11	46,XY	(ver Anexo 4)
Otros / Others				

Capacidad de diferenciación									
<i>Differentiation capacity</i>									
Ectodermo/ Ectoderm			Endodermo/Endoderm			Mesodermo/ Mesoderm			
marcador	pase	resultado	marcador	pase	resultado	marcador	pase	resultado	
<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>	
In Vitro	Tuj1 (β-tubulin III)	10	+	α-feto proteina	10	+	Sox9	10	+
<i>In vitro</i>				FoxA2	10	+	actin-α-smooth muscle	10	+
ver Anexo 5									
In vivo/ in vivo									
Ver Anexo 6	Método: formación de teratomas en ratones SCID				Resultado: +				
	<i>Method: teratoma formation in SCID mice</i>				<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.

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. Se realizaron tinciones histológicas estándar con hematoxilina/eosina y a continuación fueron identificados tejidos procedentes de las tres capas germinales. 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 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

P 24

¿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.

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