

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: XF-iPSF44-3F-1

Name of the line: XF-iPSF44-3F-1 (iPSXFII+III-1 fue el nombre de esta línea)

XF-iPSF44-3F-1 (iPSXFII+III-1 was the initial name of this line)

Investigador principal: Juan Carlos Izpisúa Belmonte, Anna Veiga Lluch, Ignacio Rodríguez Pizá

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)

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

SECCIÓN 2
Section 2

Datos del Depositante
Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Juan Carlos Izpisúa Belmonte Anna Veiga Lluch Ignacio Rodríguez Pizá	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> Biopsia de prepucio humano. <i>Human foreskin biopsy.</i>	
Muestra biológica <i>Biological sample</i> <p style="text-align: center;">Fresco <input checked="" type="checkbox"/> Crioconservado <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i></p>	
Fecha de la obtención del muestra biológica <i>Date of obtaining the biological sample</i> 9.02.2009	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 9.02.2009
Fecha de la donación del muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 9.02.2009	

<p>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> <p>Se utilizó una biopsia de prepucio de un paciente de 3 años tras la obtención del consentimiento informado firmado por los padres. La muestra fue recogida en solución salina, dividida en pequeños trozos y cultivada en IMDM (Invitrogen) suplementado con suero humano al 10% (HS) (Sigma) y penicilina/streptomycin (0.5%). Tras 10 días en cultivo se disociaron y pasaron los fibroblastos (XF-HFFs) mediante TrypLE Select (Invitrogen). Para la reprogramación se usaron XF-HFFs en pases 2-3. Para la generación de feeders, los XF-HFFs se expandieron hasta pase 5 y fueron irradiados y congelados en 90%HS y 10%DMSO.</p> <p><i>A foreskin biopsy from a 3-years old individual was used after obtaining his parents' given informed consent. The sample was collected in sterile saline solution, divided into small pieces and cultured in IMDM (Invitrogen) supplemented with 10% human serum (HS)(Sigma) and penicillin/streptomycin (0.5X). After 10 days of culture, fibroblasts (XF_HFFs) outgrowths were dissociated and split using TrypLE Select (Invitrogen). XF-HFFs were used for reprogramming at passages 2-3. For the generation of feeder layers, XF-HFFs were expanded five passages and then irradiated and cryopreserved in 90% HS and 10% DMSO.</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

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).

Soporte: fibroblastos de prepucio humanos procedentes de la misma muestra cultivados en condiciones libres de xenobióticos.

Support: human foreskin fibroblasts from the same sample cultured in xenofree conditions.

Culture medium (F44m): 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), 10% F44 (Grifols), 1% Xeno-free KO-SR Growth Factor Cocktail (Invitrogen) y 0,5% Penicillin-Streptomycin (Gibco).

Reprogramming of human fibroblasts to induce pluripotent stem cells under xeno-free conditions. Rodriguez-Pizà et al. Stem Cells 2009, 28: 36-44.

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
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)

micoplasma

mycoplasma

Marcadores: Ver Anexo 2*Markers*

	Método (ARN/proteínas) <i>Method (RNA/proteins)</i>	nº pase <i>Passage n.</i>	resultado <i>results</i>	comentarios <i>comments</i>
Oct4	inmunofluorescencia	5	+	
Nanog	inmunofluorescencia	5	+	
Rex 1	-			
Sox 2	inmunofluorescencia	5	+	
SSEA3	inmunofluorescencia	5	+	
SSEA4	inmunofluorescencia	5	+	
TRA-1-60	inmunofluorescencia	5	+	
TRA-1-81	inmunofluorescencia	5	+	
Telomerasa				
Fosfatasa Alk.	Actividad	5	+	
Cariotipo		10	46, XY	ver Anexo 3
Otros				

Capacidad de diferenciación*Differentiation capacity*

	Ectodermo/ Ectoderm			Endodermo/Endoderm			Mesodermo/ Mesoderm		
	marcador <i>marker</i>	pase <i>passage</i>	resultado <i>result</i>	marcador <i>marker</i>	pase <i>passage</i>	resultado <i>result</i>	marcador <i>marker</i>	pase <i>passage</i>	resultado <i>result</i>
In Vitro Anexo 4	TUJ1	8	+	α -feto proteina FOXA2	8	+ +	ASA, SMA GATA4	8 8	+ +
<i>In vitro</i> Annex 4	<i>TUJ1</i>	8	+	<i>α-feto protein</i> <i>FOXA2</i>	8	+ +	<i>ASA, SMA</i> <i>GATA4</i>	8 8	+ +
In vivo/ in vivo (ver Anexo 5) pase/passage 10	Método: formación de teratomas en ratones SCID <i>Method: teratoma formation in SCID mice</i>						Resultado: + <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. Ectodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio N2/B27. (ver Anexo 4)

Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture. Ectoderm: EBs culture in N2/B27 (see Annex 4)

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 5)

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 5).

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

15

¿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):

Esta línea se ha obtenido, expandido y criopreservado en condiciones totalmente libres de xenobióticos

Para la reprogramación se infectaron los fibroblastos con el sobrenadante retroviral del policistrón OSKG (OCT4, SOX2, Klf4 y GFP). Se realizan 2 rondas de infección en días consecutivos. Al día siguiente los fibroblastos fueron disociados y sembrados en placas con monocapas de XF-HFF en medio F44 que se cambió diariamente. Tras 25-35 días, se eligieron las colonias según su morfología y se pasaron a nuevas placas con iXF-HFF. Las líneas xenofree iPS obtenidas se mantuvieron en estas condiciones y se pasaron mediante disociación mecánica.

This line was obtained, expanded and cryopreserved in totally xeno-free conditions.

For reprogramming fibroblasts were infected with retroviral supernatant encoding the OKSG polycistron (OCT4, SOX2, Klf4 and GFP). Two rounds of infection were performed on consecutive days. The following day, fibroblasts were dissociated and seeded onto iXF-HFF in F44m. the médium was replaced daily. Colonies were picked based on morphology 25-35 days after and replated onto fresh iXF-HFF. Xeno.free iPS lines were maintained in this conditions and passed by mechanical dissociation of colonies

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 (Representante legal del Departamento/Centro) (Legal Representative of the Department/Centre)  Dr. Aiguader. Fecha/ Date: 21/05/2010	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i>  Fecha/Date: 21/05/2010
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Miguel Gómez Clares	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona Dr. Aiguader, 88, 7ª planta 08003. Barcelona.	Teléfono / Telephone: +34 93 316 03 00 Fax: +34 93 316 03 00 E-mail: com@cmrb.eu