

# 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

<b>Investigador Principal:</b> <i>Principal Investigator:</i> Juan Carlos Izpisúa Belmonte Anna Veiga Lluch	<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 3160360 <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

<b>Tipo de muestra biológica (especificar estadio embrionario, semanas de gestación,...)</b> <i>Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...)</i> <b>Embrión humano en estadio de blastocisto</b> <i>Blastocyst-stage human embryo</i>	
<b>Muestra biológica</b> <i>Biological sample</i> <b>Fresco</b> <input type="checkbox"/> <b>Crioconservado</b> <input checked="" type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <input type="checkbox"/> <i>Cryopreserved</i> <input checked="" type="checkbox"/>	
<b>Fecha de la obtención del muestra biológica</b> <i>Date of obtaining the biological sample</i> 09.05.2007	<b>Fecha del uso o descongelación (si congelado)</b> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 21.04.2009
<b>Fecha de la donación del muestra biológica</b> <i>Date of donation of the biological sample</i> 15.05.2007	

<b>Descripción general del procesamiento previo del muestra biológica utilizado (cultivo embrionario, procesamiento muestra fetal o de tejido adulto)</b> <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 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.</p> <p><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></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 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 condicionated 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.*

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

<b>Capacidad de diferenciación</b> <i>Differentiation capacity</i>									
<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>	Tuj1	12	+	α-feto proteína	12	+	GATA4	12	+
<i>In vitro</i>	GFAP	12	+	FOXA2	12	+	actin-α-smooth muscle	12	+
ver Anexo 5									
<b>In vivo/ in vivo</b>	<b>Método:</b> formación de teratomas en ratones SCID					<b>Resultado: +</b>			
Ver Anexo 6	<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**

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.*

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