

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: VAL-7

Name of the line:

Investigador principal: Carlos Simón Vallés

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?

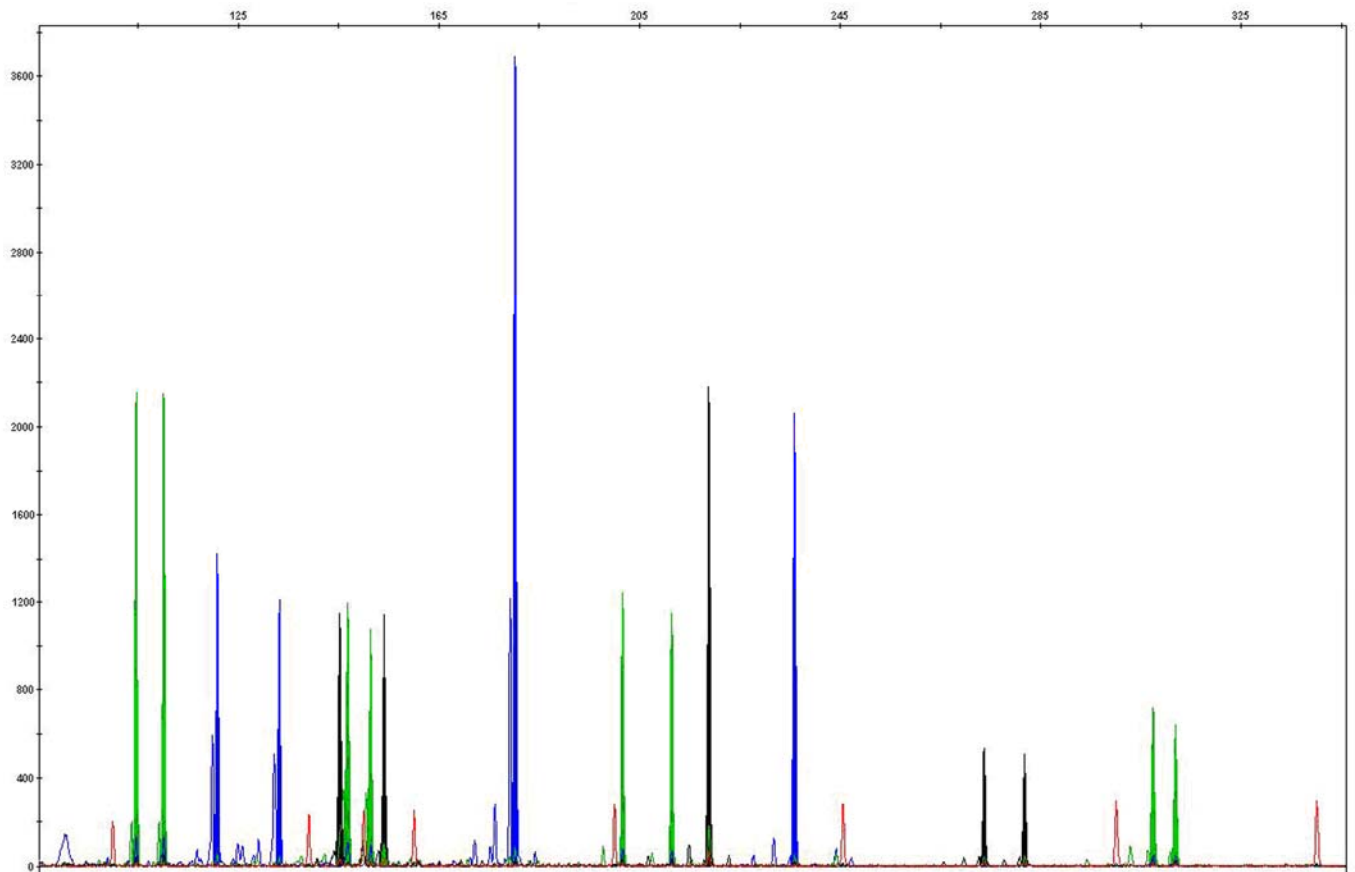
Has the cell line been derived from an embryo with genetic anomaly?

NO **SÍ** (especificar)
No *Yes* *(specify)*

Identificación genética de la línea celular. Método y resultado

Fingerprinting

Genetic identity of the cell line. Method and result



SECCIÓN 2
Section 2

Datos del Depositante
Applicant Details

Investigador Principal: Principal Investigator: Carlos Simón Vallés	Dirección Postal: Postal address: Av. Autopista del Saler, 16
Centro de Trabajo: Institution: Centro de Investigación Príncipe Felipe (C.I.P.F.)	Teléfono (phone): 963 28 96 80 Fax: 963 28 96 81 E-mail: csimon@cipf.es

SECCIÓN 3
Section 3

Datos de la Línea Celular
Details of Cell Line

Tipo de muestra biológica (especificar estadio embrionario, semanas de gestación,...) Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...) Embrión en día 3 de desarrollo (estadio 8 células) / Embryo on day 3 of development (8 cells)	
Muestra biológica Biological sample <div style="text-align: right;"> Fresco <input type="checkbox"/> Crioconservado <input checked="" type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i> </div>	
Fecha de la obtención del muestra biológica Date of obtaining the biological sample Congelación: 01-11/2002 Recepción: 01-07/2007 Freeze: 01-11/2002 Reception: 01-07/2007	Fecha del uso o descongelación (si congelado) Date used or thawed (if frozen) 26-09/2007
Fecha de la donación del muestra biológica Date of donation of the biological sample 15-03/2007	

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) <p>Tras tratamiento hormonal, extracción de ovocitos y Fecundación In Vitro (FIV) mediante la técnica de ICSI, se obtuvieron embriones que fueron mantenidos en cultivo embrionario a 37°C y CO₂ de 5%, hasta día 3 de desarrollo (6-8 células). Algunos de ellos fueron transferidos a la madre y los restantes fueron congelados, mediante un protocolo de congelación controlado con PROH y sacarosa.</p> <p>Los embriones congelados y donados fueron descongelados mediante un protocolo lento con gradientes de PROH y sacarosa, posteriormente fueron mantenidos en cultivo en medio CCM (Vitrolife) desde día 3 hasta día 5 de desarrollo. El embrión origen de la línea de célula madre alcanzó el estadio de blastocisto expandido en día 5 y fue micromanipulado con láser para el aislamiento de la masa celular interna la cual fue colocada sobre células humanas de Foreskin irradiadas y medio de cultivo hES y b-FGF.</p> <p>After hormonal treatment, oocyte retrieval and In Vitro Fertilization (IVF) using ICSI technique, resulting embryos were cultured at 37°C and 5 % CO₂, until day 3 of development (6-8 cells). Some of them were transferred back to the patient and the rest were frozen with PROH and sucrose controlled protocol.</p> <p>The frozen and donated embryos were thawed following a thawing protocol with PROH and sucrose gradients, and were maintained in sequential culture medium CCM (Vitrolife) from day 3 until day 6. The embryo from which the hESC line was derived, arrived to expanded blastocyst stage at day 5 and then the inner cell mass was isolated by laser micromanipulation and plated on irradiated human Foreskin cells and hES medium plus b-FGF.</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 utilizó la masa celular interna del blastocisto aislada mediante micromanipulación con láser.

The inner cell mass (ICM) of the blastocyst was isolate by laser micromanipulation.

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 celular /cellular support : human foreskin fibroblasts (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA). N° catálogo: CRL-2429.

Componentes del medio / medium components:

DMEM high glucose (Gibco/BRL, Paisley, Scotland, UK), n° Catálogo: 41965039 ; Medium 199 (Gibco), n° catálogo: 31150022

Fetal Bovine Serum (Gibco), n° catálogo:10091148; Fungizone (Gibco), n° catálogo: 15290034; Gentamicin (Gibco), n° catálogo: 15750-037

Valbuena D, Galán A, Sánchez E, Poo ME, Gómez E, Sánchez-Luengo S, Melguizo D, García A, Ruiz A, Moreno R, Pellicer A, Simón C. Derivation and characterization of three new Spanish human embryonic stem cell lines (VAL-3,-4,-5) on human feeder and in serum-free conditions. *Reproductive BioMedicine Online* 2006; 13(6):875-86.

Mantenimiento de la línea: Line maintenance

Ratio de pase: *Passage ratio* (1:1 - 1:2)

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)

Morfología característica de células madre: colonias aplanadas, translúcidas y con bordes definidos, con células homogéneamente dispuestas en monocapa, y ratio núcleo/citoplasma elevado. Se agrupan en colonias de 3000-5000 células.

Characteristic morphology of human embryonic stem cells: flat colonies, translucent, with defined borders, with cells homogeneously located in a monolayer, and a high ratio of nucleus/cytoplasm . Colonies with 3000-5000 cells.

Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)

Microbiological controls carried out (indicate in detail)

El soporte celular fue testado para: bacterias habituales, Mycoplasma, endotoxinas, citomegalovirus, Epstein-Barr, VHB, VHC, herpes humano 6(A) y 6(B), VIH1, VIH2, HTLV-I/II, parvovirus y transcriptasa reversa. Los resultados fueron negativos. Los controles fueron realizados por el Instituto Valenciano de Microbiología (IVAMI), entidad homologada por AENOR, ENAC y Consellería de Sanitat.

La línea fue testada para patógenos habituales. De forma rutinaria se realizan controles microbiológicos que aseguran la ausencia de microorganismos en las condiciones de cultivo utilizadas.

Cellular support was tested for: usual bacteria, Mycoplasm, endotoxin, cytomegalovirus, Epstein-Barr, HBV, HCV, human herpes 6(A) y 6(B), HIV1, HIV2, HTLV-I/II, parvovirus and reverse transcriptase. Results were negative. Controls were done by the Instituto Valenciano de Microbiología (IVAMI), homologated by AENOR, ENAC and Consellería de Sanitat. Cell line was tested for common pathogens. Routinely, we perform microbiologic controls that ensure the absence of microorganisms in the culture conditions used.

Marcadores:*Markers*

	Método (ARN/proteínas) Method (RNA/proteins)	nº pase Passage n.	resultado results	comentarios comments	
Oct 4	PCR e inmunocitoquímica (ICQ) / PCR and immunocytochemistry (ICC)	20/21	positivo/positive	indiferenciación/indifferentiation	
Nanog	PCR e ICQ/ PCR and ICC	20/21	positivo/positive	indiferenciación/indifferentiation	
Rex 1	PCR	20	positivo/positive	indiferenciación/indifferentiation	
Sox 2	PCR	20	positivo/positive	indiferenciación/indifferentiation	
SSEA3	-	-			
SSEA4	ICQ/ICC	23	positivo/positive	indiferenciación/indifferentiation	
TRA-1-60	ICQ/ICC	16	positivo/positive	indiferenciación/indifferentiation	
TRA-1-81	ICQ/ICC	16	positivo/positive	indiferenciación/indifferentiation	
Telomerasa/ Telomerase	PCR	17	positivo/positive	indiferenciación/indifferentiation	
Fosfatasa Alk. /Alkaline phosphatase	ICQ/ICC	24	positivo/positive	indiferenciación/indifferentiation	
Cariotipo / Karyotype	bandas G / G bands	23	46,XY	masculino normal/normal male	
Otros / Others					
	Thy-1, Cripto, FOXD3	PCR	20	positivos/positives	indiferenciación/indifferentiation
	Nfh	PCR	20	negativo/negative	diferenciación /differentiation (ectodermo) / (ectoderm)
	Ren	PCR	20	negativo/negative	diferenciación /differentiation (mesodermo) / (mesoderm)
	Amy	PCR	20	negativo/negative	diferenciación /differentiation (endodermo) / (endoderm)

Capacidad de diferenciación*Differentiation capacity*

	Ectodermo/ Ectoderm			Endodermo/Endoderm			Mesodermo/ Mesoderm		
	marcador marker	pase passage	resultado result	marcador marker	pase passage	resultado result	marcador marker	pase passage	resultado result
In Vitro	tubulin β -III	22	positivo	α -fetoproteína	24	positivo	actina muscular	24	positivo
<i>In vitro</i>	tubulin β -III	22	positive	α -fetoprotein	24	positive	muscle actin	24	positive

In vivo/ in vivo**Método:**
*Method:*inducción de teratomas
teratomas induction**Resultado:** positivo
Result: positive

Descripción de las características de diferenciación *in vitro**Description of the differentiation characteristics in vitro*

Se sembraron colonias sobre placas recubiertas con gelatina al 1% y se dejó que diferenciaron espontáneamente durante tres semanas. Posteriormente, se fijaron las células y se realizó inmunocitoquímica para marcadores de las tres capas germinales.

Colonies were plated on 1% gelatine coated plates and left for three weeks to allow spontaneous differentiation. Afterwards, cells were fixed and immunocytochemistry was performed against the three germ layers.

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 colonias de la línea y posterior análisis morfológico de los teratomas. Obtención de tipos celulares propios de ectodermo, mesodermo y endodermo.

Cell colonies were injected into the testis of SCID mice and afterwards morphologically analyzed for teratoma formation. Typical tissues from the ectoderm, mesoderm and endoderm were obtained.

Datos de la tipificación HLA*HLA typification data*

A*24, A*25;
B*18, B*40;
Cw*02, Cw*12;
DRB1*04, DRB1*11

Consistencia celular tras 6 pases de congelación y descongelación. Resultados.*Cell consistency after 6 passages of freezing and thawing. Results.*

La línea celular se mantiene estable tras más de 6 pases siguiendo los procedimientos de congelación y descongelación propios.

The cell line is stable for more than 6 passages following our freezing and thawing protocol.

Valbuena D., Sánchez-Luengo S., Galán A., Sánchez E., Gómez E., Poo ME, Ruiz V, Genbacev O., Krtolica A., Pellicer A., Moreno R., Simón C. An Efficient Slow Freezing hESC Cryopreservation Method in Xeno-Free Conditions without the use of a programmable freezer. Reproductive BioMedicine Online, 2008, *in press*.

Pase en el momento del registro*Passage at the time of the recording*

Pase 28

Passage 28

¿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> Rubén Moreno Palanques Fecha/ Date: 21/02/2008	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i> Carlos Simón Vallés Fecha /Date 21/02/2008
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Rubén Moreno Palanques. Director General.	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Centro de Investigación Príncipe Felipe. Av. Autopista del Saler, 16-3 46012 Valencia	Teléfono /Telephone: 963 28 96 80 Fax: 963 28 97 01 E-mail: rmorenop@cipf.es