

# 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)*

Anexo 1: Tipado HLA y microsatélites.

HLA and STR analyses

Anexo 2: Secuencia de imágenes de la evolución del embrión descongelado hasta colonia primaria.

Representative images of the thawed embryo throughout the embryonic outgrowth development

Anexo 3: Informe del análisis microbiológico.

Microbiology Testing

Anexo 4: Informe del análisis de micoplasma.

Mycoplasma Testing

Anexo 5: Caracterización fenotípica

Immunophenotypic characterization

Anexo 6: Factores de Transcripción y Cariotipo (Bandeo G).

Expression of transcription factors and Karyotype G-Banding analyses

Anexo 7: Diferenciación *in vitro*.

*In vitro* differentiation

Anexo 8: Diferenciación *in vivo*.

*In vivo* differentiation

Anexo 9: Copia de la publicación (sometida)

Copy of the submitted manuscript.

**SECCIÓN 1**  
*Section 1*

**Información General**  
*General Information*

**Nombre de la línea: AND-2**  
*Name of the line:*

**Investigador principal: PABLO MENENDEZ BUJAN/JOSE LUIS CORTES ROMERO**  
*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 microsatélites (ver anexo 1)**  
**STR Studies (see Annex 1)**



**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*

El blastocisto desorganizado tras la descongelación, desprovisto de zona pelúcida fue colocado sobre hMSCs, sin aislamiento de la masa celular interna (ICM) (**Anexo 2**).

The whole blastocyst was seeded on hMSCs upon removal of the zona pellucida. The ICM was not prospectively isolated (**Annex 2**).

**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 mesenchymal cells cultured in IMDM and advanced-DMEM, respectively, plus 10% FCS and 2mM L-glutamine.

Culture medium: KO-DMEM supplemented with 20% KO Serum Replacement, 1% non-essential amino acids, 1mM L-glutamine, 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and 8ng/mL of bFGF (all from Invitrogen, CA)

**Mantenimiento de la línea: *Line maintenance***

**Ratio de pase:** *Passage ratio*: 1:2-1:3 cada 5-7 días; 1:2-1:3 every 5-7 days

**Método de pase:** *Passage method*: método mecánico y enzimático; either mechanical or enzymatic

Xenobióticos	si X	no
<i>Xenobiotics</i>	Yes	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)*

El aspecto de las colonias es la típica de las hESCs: redondeado, aplanado y uniforme. Las colonias son grandes y sin bordes lisos. Alta relación nucle/citoplasma. (**Anexo 2**).

AND-2 showed the typical hESC morphology: round and flat colonies of uniform size. The colonies are medium-large size with well-defined edges. There is a high nucleus/cytoplasm ratio (**Annex 2**).

**Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)**

Microbiological controls carried out (indicate in detail)

Los estudios externos de micología y micoplasma son negativos (**Anexo 3 y 4**)

Mycology and micoplasma testing proved to be negative (**Annex 3 & 4**).

<b>Marcadores (Anexos 5 &amp; 6)</b>				
<i>Markers</i>				
	<b>Método</b>	<b>nº pase</b>	<b>resultado</b>	<b>comentarios</b>
	<b>(ARN/proteínas)</b>			
	<i>Method</i>	<i>Passage n.</i>	<i>results</i>	<i>comments</i>
	<b>(RNA/proteins)</b>			
Oct 4	RT-PCR	7	+	(Anexo 6)
Nanog	RT-PCR	7	+	(Anexo 6)
Rex 1	RT-PCR	7	+	(Anexo 6)
Sox 2	RT-PCR	7	+	(Anexo 6)
SSEA3	Inmunofluoresc/citom flujo	7	+	(Anexo 5)
SSEA4	Inmunofluoresc/citom flujo	7	+	(Anexo 5)
TRA-1-60	Inmunofluoresc/citom flujo	7	+	(Anexo 5)
TRA-1-81	Inmunofluoresc/citom flujo	7	+	(Anexo 5)
Fosfatasa Alk.	Actividad	7	+	(Anexo 5)
Cariotipo / <i>Karyotype</i>		7	46, XX	(Anexo 6)
Otros / <i>Others</i>				

<b>Capacidad de diferenciación (Anexos 7 &amp; 8)</b>									
<i>Differentiation capacity</i>									
<b>In vitro (Anexo 7). Formación de cuerpos embrionarios</b>									
<b>Presencia de linajes de las tres capas germinales.</b>									
<b>Presence of tissues representing the three germ layers.</b>									
<b>In vivo (Anexo 8)</b>		<b>Método: Formación de teratomas en ratones NOD/SCID</b>					<b>Resultado:+</b>		
		Method: Teratoma formation in NOD/SCID mice.					Result:+		
<b>Ectodermo/ <i>Ectoderm</i></b>			<b>Endodermo/ <i>Endoderm</i></b>			<b>Mesodermo/ <i>Mesoderm</i></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>β-tubulina</b>	<b>18</b>	<b>+</b>	<b>α-fetoproteína</b>	<b>18</b>	<b>+</b>	<b>sm-actina</b>	<b>18</b>	<b>+</b>	
			<b>Pan CK</b>	<b>18</b>	<b>+</b>	<b>Catilago (AT)</b>	<b>18</b>	<b>+</b>	
<b>β-tubulin</b>	<b>18</b>	<b>+</b>	<b>α-fetoprotein</b>	<b>18</b>	<b>+</b>	<b>sm-actin</b>	<b>18</b>	<b>+</b>	
			<b>Pan CK</b>	<b>18</b>	<b>+</b>	<b>Cartilago (AT)</b>	<b>18</b>	<b>+</b>	

**Descripción de las características de diferenciación *in vitro***

*Description of the differentiation characteristics in vitro*

Los cuerpos embrionarios se crecieron durante 22 días en presencia de 20% FCS. A continuación se embebieron en parafina y se hicieron inmunostainings para pan-cytokeratin (endodermo), Vimentina (mesodermo) y  $\beta$ III-Tubulina (ectodermo). (Anexo 7).

Near confluent hESCs were treated with collagenase IV for 5 min at 37°C, transferred ( $2 \times 10^2$  cells/cm<sup>2</sup>) to non-adherent plates and allowed to differentiate spontaneously by embryoid body (EB) formation in DMEM supplemented with 20% FBS, 1% L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids and 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol with media changes every 4 days. After 21 days of EB differentiation, EBs were spun down, fixed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes and embedded in paraffin (Catalina et al., 2008a). For each staining, three sections per specimen were used. Then, the cells were incubated (1 hour at RT) with the primary antibodies anti-pan-cytokeratin (Santa Cruz Biotechnology; 1:500 dilution in PBS), anti- $\beta$ -III Tubulin (Chemicon, 1:100 dilution in PBS) and anti-vimentin (Chemicon, 1:100 dilution in PBS). Slides were then incubated with a biotinylated secondary antibody (30 minutes at RT) and a streptavidin peroxidase complex (30 minutes at RT) (both from Vector Laboratories Inc). The immunostaining was visualized using diaminobenzidine and counterstained with hematoxylin. All the washing steps were done in PBS. (Annex 7)

**Datos de la determinación de pluripotencialidad *in vivo* o formación de teratomas**

*Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation*

Unas 20-40 colonias fueron transplantadas en el testículo de ratones NOG. Tras 8-10 semanas los ratones desarrollaron tumores palpables. Tras el sacrificio del ratón NOD/SCID, se extrajeron los testículos, se fijaron en formol y se obtuvieron muestras histológicas que se tiñeron con hematoxilina/eosina e IH para la identificación de tejidos pertenecientes a las tres capas germinales. (Anexo 8)

During routine passage, 20-40 clumps consisting of about 100 undifferentiated cells each were harvested and injected into the testis of 6 to 8-week-old NOD/SCIDIL2Ry<sup>-/-</sup> mice. Eight to ten weeks later, the resulting teratomas were fixed in 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin, and examined histologically after hematoxylin and eosin staining as previously described (Cortes et al., 2008; Catalina et al., 2008a). (Annex 8)

**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.*

Las células han sido congeladas y descongeladas en varias ocasiones a lo largo de 24 pases. La viabilidad y consistencia celular es óptima. La congelación se ha realizado mediante el uso de un congelador programable.

Human ESCs survived well to several freeze-thaw procedures throughout 24 passages. Cell viability was high and stability was maintained. A programmed freezer was used to warrant high viability rates.

**Pase en el momento del registro**

*Passage at the time of the recording*

Actualmente, la línea AND-2 se encuentra en pase 28. Existen viales congelados a diferentes momentos.

AND-2 hESC line has been grown for up to 28 passages. There are ampoules/stocks frozen at different time points.

**¿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):

La línea embrionaria humana AND-2 ha sido derivada mediante el método de cultivo directo utilizando para el cultivo embrionario medio de cultivo suplementado con un inhibidor de ROCK, sobre una superficie celular formada por células mesenquimales humanas (hMSC).

Esta línea crece actualmente tanto en hMSCs como en Matrigel con medio condicionado por hMSCs.

*AND-2 has been derived on MSCs used as feeders. To improve embryo survival the ROCK inhibitor Y-27632 was used. For ICM isolation the whole blastocyst culture method was employed.*

*Currently, this hESC line has been successfully transferred to feeder-free conditions using matrigel and hMSC-conditioned media. Gra-3 has been maintained feeder-free for 13 passages.*

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.*

<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> JUAN JESÚS BANDERA  Fecha/ Date:	<b>Firma del Investigador Principal</b> <i>Signature of the Principal Investigator</i>  Pablo Menendez Buján  Fecha /Date
<b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b> <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> JUAN JESUS BANDERA. DIRECTOR GERENTE FUNDACIÓN PROGRESO Y SALUD	
<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal Address:</i> Avda. Americo Vespucio, 5., bloque 2, 2ª planta, 41092, isla de la Cartuja, Sevilla	<b>Teléfono / Telephone:</b> +34 955 04 04 50 <b>Fax:</b> +34 955 04 04 57 <b>E-mail:</b> fundacion@fundacionprogresosalud.org