

# 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

### SECCIÓN 1

*Section 1*

### Información General

*General Information*

**Nombre de la línea:** VAL-10B

*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**

*Genetic identity of the cell line. Method and result*

Fingerprinting

Valencia, 14 de Enero 2009

**Código:** VAL10

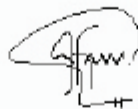
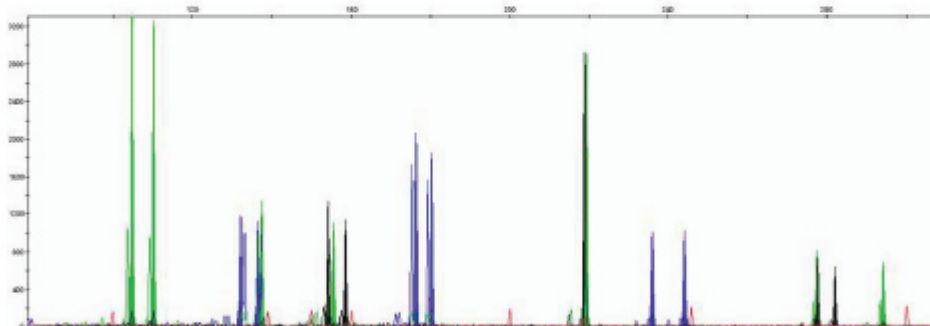
**Servicio:** Prueba de *fingerprinting* basada en el análisis de nueve marcadores polimórficos (ver lista); Estos 9 *loci* se heredan de forma independiente. Simultáneamente se co-amplifica un segmento del gen amelogenina, homólogo en cr. X e Y, para determinación del sexo de la muestra:

- A. D3S1358
- B. vWA
- C. FGA
- D. D8S1179
- E. D21S11
- F. D18S51
- G. D5S818
- H. D13S317
- I. D7S820

**Método:** PCR fluorescente y análisis de fragmentos en analizador genético AB 3130 según AmpFISTR Profiler Plus Loci, Applied Biosystems.

**Muestras:** ADN extraído a partir de colonias de VAL10 recogidas en PBS.

**Resultados:** Línea de sexo masculino



Julio Martín, PhD

Laboratorio de Diagnóstico Molecular (DGP-PCR)  
Unidad de Diagnóstico Genético Preimplantacional  
Tel 96 303 72 73 (Horario 16-19:00 horas) Fax 96 345 55 12



**SECCIÓN 2**  
Section 2

**Datos del Depositante**  
Applicant Details

<b>Investigador Principal:</b> <i>Principal Investigator:</i> Carlos Simón Vallés	<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal address:</i> Av. Autopista del Saler, 16
<b>Centro de Trabajo:</b> <i>Institution:</i> Centro de Investigación Príncipe Felipe (C.I.P.F.)	<b>Teléfono (phone):</b> +34 963 28 96 80 <b>Fax:</b> +34 963 28 97 01 <b>E-mail:</b> csimon@cipf.es

**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> Blastómera de un embrión humano en día 3 de desarrollo en estadio de 7 células. <i>Blastomere of a human embryo at day 3 of development in 7 cells stage.</i>	
<b>Muestra biológica</b> <i>Biological sample</i> <p style="text-align: right;"><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"/></p>	
<b>Fecha de la obtención de la muestra biológica</b> <i>Date of obtaining the biological sample</i> Congelación: 01/04/2007 Recepción: 30/04/2008 <i>Freeze: 01/04/2007</i> <i>Reception: 30/04/2008</i>	<b>Fecha del uso o descongelación (si congelado)</b> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 11/11/2008
<b>Fecha de la donación del muestra biológica</b> <i>Date of donation of the biological sample</i> 04/04/2007	

<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> El embrión vitrificado en estadio de 7 células (día 3 de desarrollo) donado para este proyecto, fue desvitrificado mediante un protocolo con DMSO y etilenglicol. El embrión se mantuvo en medio CCM (Vitrolife) durante 4 horas. Posteriormente se realizó el procedimiento modificado de biopsia de blastómera para PGD a través de micromanipulación y microdissección por láser. La blastómera se dejó en cultivo y 24 horas después, tras haberse dividido se puso en co-cultivo con fibroblastos humanos de foreskin irradiados y medio de cultivo hES y bFGF. <i>The vitrified and donated embryo was thawed following a devitrification protocol with DMSO and ethilenglicol, and was maintained in CCM medium (Vitrolife), for 4 hours. After that, the blastomere biopsy procedure for PGD using laser microdissection and micromanipulation was performed. The blastomere was cultured and divided during 24 hours and then was co-cultured with irradiated human foreskin fibroblast and hES medium plus bFGF.</i>
---

**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 una blastómera de un embrión en día 3 de desarrollo en estadio de 7 células, obtenida por micromanipulación y microdissección por láser siguiendo un procedimiento modificado para PGD.

*A blastomere of an embryo at day 3 of development in 7 cells stage was used, obtained by laser microdissection and micromanipulation, following a modified procedure for PGD.*

**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 CCD1112Sk (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA. N° catálogo: CRL-2429).
- **Componentes del medio para Feeder / Feeder medium components**: 90% Iscoves' Modified Dulbecco's médium (ATCC), n° Catálogo: 30-2005) + 10%Fetal Bovine Serum ((Gibco), n° catálogo:10091148).
- **Componentes del medio para hESC/ hESC medium components**: 80% Knockout DMEM (Gibco/BRL, Paisley, Scotland, UK; n° catálogo 10829-018), 20% Knockout SERUM Replacement (Gibco/BRL; n° catálogo: 10828-028), 1 mM L-glutamine solution (Gibco/BRL; n° catálogo: 25030-024), 1% MEM non essential amino acids (100x) (Gibco/BRL; n° catálogo: 11140-035), 0.1 mM β-mercaptoethanol (Gibco/BRL; n° catálogo: 31350-10), 10 ng/ml human recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF) (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA ; n° catálogo: 13256-029)

**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** 1:3

**Método de pase: Passage method** mecánico / *mechanical*

**Xenobióticos** **si** **no**  
*Xenobiotics* **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)*

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 Mycoplasma y 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, Mycoplasma, endotoxin, cytomegalovirus, Epstein-Barr, HBV, HCV, human herpes 6(A) and 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 Mycoplasma and common pathogens. Routinely, we perform microbiologic controls that ensure the absence of microorganisms in the culture conditions used.*

**Marcadores:***Markers*

	<b>Método (ARN/proteínas) Method (RNA/proteins)</b>	<b>nº pase Passage n.</b>	<b>resultado results</b>	<b>comentarios comments</b>
<b>Oct 4</b>	PCR e inmunocitoquímica (ICQ) / <i>PCR and immunocytochemistry ( ICC)</i>	13	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
<b>Nanog</b>	PCR e ICQ/ <i>PCR and ICC</i>	13	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
<b>Rex 1</b>				
<b>Sox 2</b>				
<b>SSEA3</b>				
<b>SSEA4</b>	ICQ / <i>ICC</i>	13	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
<b>TRA-1-60</b>	ICQ / <i>ICC</i>	13	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
<b>TRA-1-81</b>	ICQ / <i>ICC</i>	13	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
<b>Telomerasa/ <i>Telomerase</i></b>	PCR	4	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
<b>Fosfatasa Alk. / <i>Alkaline phosphatase</i></b>	ICQ / <i>ICC</i>	13	+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
<b>Cariotipo / <i>Karyotype</i></b>	bandas G / <i>G bands</i>	6 y 21	46,XY	masculino normal / <i>normal male</i>
<b>Otros / <i>Others</i></b>				
Cripto, Dnmt3b, Gabr, Gdf3	PCR		+	indiferenciación / <i>indifferentiation</i>
Nfh	PCR	4	-	diferenciación / <i>differentiation</i> (ectodermo) / <i>(ectoderm)</i>
Ren	PCR	4	-	diferenciación / <i>differentiation</i> (mesodermo) / <i>(mesoderm)</i>
Amy	PCR	4	-	diferenciación / <i>differentiation</i> (endodermo) / <i>(endoderm)</i>

**Capacidad de diferenciación***Differentiation capacity*

	<b>Ectodermo/ <i>Ectoderm</i></b>			<b>Endodermo/ <i>Endoderm</i></b>			<b>Mesodermo/ <i>Mesoderm</i></b>		
	<b>marcador <i>marker</i></b>	<b>pase <i>passage</i></b>	<b>resultado <i>result</i></b>	<b>marcador <i>marker</i></b>	<b>pase <i>passage</i></b>	<b>resultado <i>result</i></b>	<b>marcador <i>marker</i></b>	<b>pase <i>passage</i></b>	<b>resultado <i>result</i></b>
<b>In Vitro</b>	tubulin $\beta$ -III	10	positivo	$\alpha$ -fetoproteína	10	positivo	actina muscular	10	positivo
<i>In vitro</i>	<i>tubulin <math>\beta</math>-III</i>	<i>10</i>	<i>positive</i>	<i><math>\alpha</math>-fetoprotein</i>	<i>10</i>	<i>positive</i>	<i>muscle actin</i>	<i>10</i>	<i>positive</i>
<b>In vivo / <i>in vivo</i></b>				<b>Método:</b> <i>Method:</i>	inducción de teratomas <i>teratomas induction</i>			<b>Resultado:</b> <i>Result:</i>	positivo <i>positive</i>

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

Formación de cuerpos embrioides e inmunocitoquímica para marcadores de diferenciación de ectodermo, mesodermo y endodermo.

*Embryoid bodies formation and immunostaining against differentiation markers from ectoderm, mesoderm and endoderm.*

**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 30 colonias de la línea por testículo (90.000-150.000 células). Transcurridas 12 semanas, se sacrificaron los ratones y se obtuvieron tumores cuyo análisis anatómico-patológico e inmunohistoquímico demostró que se trataba de teratomas formados por tipos celulares propios de ectodermo, mesodermo y endodermo.

*Intratesticular injection in SCID mice of 30 cell colonies of the line/testis (90,000-150,000 cells). After 12 weeks, the mice were sacrificed and tumors were obtained. Anatomopathological analysis and immunohistochemistry of tumors showed that they were teratomas with typical tissues from the ectoderm, mesoderm and endoderm.*

**Datos de la tipificación HLA***HLA typification data*

HLA-A\*2902, HLA-A\*3002  
 HLA-B\*4403, HLA-B\*5801  
 HLA-Cw\*0718, HLA-Cw\*160101  
 HLA-DRB1\*0102, HLA-DRB1\*1501  
 HLA-DRB5\*010101  
 HLA-DQA1\*0101, HLA-DQA1\*0102  
 HLA-DPB1\*0501, HLA-DPB1\*0602  
 HLA-DPB1\*0101, HLA-DPB1\*0401

**Consistencia celular tras 6 pases de congelación y descongelación. Resultados.***Cell consistency alter 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 ; 17(1) : 127-135.

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

Pase 25

*Passage 25*

**¿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):

En los controles habituales, ésta línea de hESC obtenida de una blastómera se comporta igual a las derivadas del embrión completo. Sin embargo, estamos realizando análisis genómicos y de metilación comparativos con nuestras líneas registradas.

*Normal controls showed that this hESC line derived from a single blastomere behaves like hESC derived from complete embryos. However, we are making genomics and methylation analysis comparing with our lines registered*

**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> Rubén Moreno Palanques  Fecha/ Date: 31/03/2009	<b>Firma del Investigador Principal</b> <i>Signature of the Principal Investigator</i>  Carlos Simón Vallés  Fecha /Date 31/03/2009
<b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b> <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Rubén Moreno Palanques. Director General.	
<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal Address:</i> Centro de Investigación Príncipe Felipe Av. Autopista del Saler, 16-3 46012 Valencia	<b>Teléfono /Telephone:</b> +34 963 28 96 80 <b>Fax:</b> +34 963 28 97 01 <b>E-mail:</b> rmorenop@cipf.es