

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. de los investigadores principales (una página; formato libre).
A one page CV for the Principal Investigator
- Otros (especificar): - Consentimiento informado de los embriones y su trazabilidad
Others (specify) - Anexo solicitud de depósito (caracterización de la línea HVR-2)

SECCIÓN 1

Section 1

Información General

General Information

Nombre de la línea: HVR-2

Name of the line: HVR-2

Investigador principal: Guillermo Antiñolo Gil, Abdelkrim Hmadcha

Principal Investigator:

Origen de la línea celular:

Origin of the cell line

Embrionario
Embryonic

Fetal
Fetal

Adulto
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
No

SÍ (especificar)
Yes (specify)

Identificación genética de la línea celular. Método y resultado

Genetic identity of the cell line. Method and result

Reordenamiento cromosómico, consistente en una translocación recíproca entre un cromosoma del par 9 y un cromosoma del par 15. Análisis citogenético con bandas G e hibridación in situ fluorescente con sondas de ADN específicas. Fórmula cromosómica: 46,XY,t(9;15)(q34.3;q14)

Balanced rearrangement, interchange chromosomal region between 9q34.3 and 15q14. Cytogenetic analysis with banding chromosome G-band and in situ fluorescence hybridation (FISH) with specific DNA probes. Karyotype 46,XY,t(9;15)(q34.3;q14)

SECCIÓN 2
Section 2

Datos del Depositante
Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i>	Dirección Postal: <i>Postal address:</i>
Guillermo Antiñolo Gil Abdelkrim Hmadcha	Avda Manuel Siurot s/n 41013- SEVILLA Avda, Américo Vespucio s/n Isla de la cartuja - 41092 SEVILLA
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i>	Teléfono (phone): Fax: E-mail:
Hospital Universitario Virgen del Rocío Unidad de Gestión Clínica de Genética Reproducción y Medicina Fetal Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa CBIMER Departamento de Terapia Celular y Medicina Regenerativa	(+34) 955 012 725 (+34) 955 013 292 guillermo.antinolo.sspa@juntadeandalucia.es (+34) 954 468 373 (+34) 954 461 664 karim.hmadcha@cabimer.es

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> Preembrión procedente del programa de Fecundación in vitro, Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal de los HH. UU. Virgen del Rocío: Preembrión humano congelado por vitrificación en día +5 de desarrollo mediante vitrificación. <i>Human pre-embryos, are from IVF program of the Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal de los HH. UU. Virgen del Rocío and were collected after being donated by patients through an informed consent process: pre-embryo frozen at day +5 following the UGC vitrification protocol.</i>	
Muestra biológica <i>Biological sample</i> Blastocisto <input type="checkbox"/> Fresco <input type="checkbox"/> Crioconservado <input checked="" type="checkbox"/> <i>Blastocyst</i> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i>	
Fecha de la obtención del muestra biológica <i>Date of obtaining the biological sample</i> 09/02/2007	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 31/01/2008
Fecha de la donación del muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 23/02/2007	

Descripción general del procesamiento previo de la 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).

Con fecha 09/02/2007 a la pareja progenitora del preembrión del que se ha obtenido esta línea celular se le realizó un ciclo de Diagnóstico Genético Preimplantatorio (PGD) para Distrofia Muscular de Becker en la Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal de Hospitales Virgen del Rocío de Sevilla. Se obtuvieron 13 preembriones, de los cuales se congelaron 6 preembriones en estadio de blastocisto (5º día de desarrollo) mediante vitrificación, según protocolo Vitrification Freeze kit de Irvine Scientific® (Santa Ana, California). El 23/02/2007 la pareja dona sus preembriones criopreservados al proyecto de investigación "Derivación de Líneas de células Troncales Embrionarias Humanas de Preembriones Afectos de Enfermedades Genéticas Obtenidos Tras Diagnóstico Genético Preimplantatorio", firmando los Consentimientos necesarios. Posteriormente fueron descongelados según el protocolo comercial de descongelación Vitrification Thaw kit de Irvine Scientific®. El preembrión se encontraba en día 5 de desarrollo (estadio de blastocisto) y se cultivó en medio G2 de la serie GIII de Vitrolife® (Kungsbacka, Suecia).

Preembryos were obtained as donation from a couple undergoing Preimplantation genetic diagnosis (PGD) treatment for Becker Muscular Dystrophy (BMD) at Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal (UGC) de los HH. UU. Virgen del Rocío in Seville. They signed an informed consent form. Thirteen preembryos were obtained, and six of them were donated. The six preembryos were frozen at the blastocyst stage using Vitrification Freeze kit from Irvine Scientific® (Santa Ana, California). All of them were thawed using Vitrification Thaw kit from Irvine Scientific® and cultured using G2 medium (GIII series, Vitrolife®).

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 aisló la masa celular interna (ICM) mediante microcirugía de forma manual bajo estereomicroscopio en un pocillo con medio K-SR, cuando el preembrión se encontraba en estadio de blastocisto "hatched". Para ello, se utilizaron dos agujas de insulina estériles (25G). Con una se sujetó el preembrión por el trofoectodermo presionando sobre el fondo de la placa y con la otra se separó la ICM del trofoectodermo. La ICM se pasó varias veces por una pipeta pasteur estirada a la llama de diámetro similar, para eliminar los restos de trofoectodermo y se sembró y co-cultivó sobre una capa de fibroblastos inactivados con mitomicina C, en medio de cultivo de las células troncales embrionarias humanas (CTEh): ver la composición del medio en el siguiente apartado.

Inner Cell Mass (ICM) was mechanically isolated under estereomicroscope using 2 insulin syringe (25G) at "hatched blastocyst" stage. After several pipetting using a Pasteur pipette, the ICM-containing part was plated onto mitomycin-C inactivated fibroblasts dishes. Media formulation is detailed below.

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 utilizado fue fibroblastos fetales humanos (American Type Cultura Collection: CRL-2429). Medio de cultivo: Knockout Dubelcco's modified Eagle's medium supplemented with 2 mM Glutamine (Gibco, Invitrogen corporation), 0.1mM 2-mercaptoethanol (Gibco, Invitrogen corporation), 8 ng/ml basic fibroblasto growth factor (bFGF) (R&D Systems), 1% non-essential amino acids (Gibco, Invitrogen corporation), 20% Knockout Serum Replacement (Gibco, Invitrogen corporation) and 50U/ml-50mg/ml Penicillin-Streptomycin (Gibco, Invitrogen corporation).

Human foreskin from the American Type Cultura Collection: CRL-2429 were used as feeders. Cell culture Medium used: Knockout Dubelcco's modified Eagle's medium supplemented with 2 mM Glutamine (Gibco, Invitrogen corporation), 0.1mM 2-mercaptoethanol (Gibco, Invitrogen corporation), 8 ng/ml basic fibroblasto growth factor (bFGF) (R&D Systems), 1% non-essential amino acids (Gibco, Invitrogen corporation), 20% Knockout Serum Replacement (Gibco, Invitrogen corporation) and 50U/ml-50mg/ml Penicillin-Streptomycin (Gibco, Invitrogen corporation).

**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)

Las células crecen en colonias grandes, aplanadas de un tamaño ≥ 1 mm y presentan un núcleo predominante (80%) característico de las células troncales embrionarias.

Colony growth and cells with predominant nucleus (80%), characteristics of hESC.

Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)

Microbiological controls carried out (indicate in detail)

El control microbiológico, es una práctica rutinaria que se realiza en la unidad de cultivo de las CTE de CABIMER. Durante los 3 años y medio que llevamos trabajando en esta unidad, nunca se han dado incidencias de contaminación. En cuanto a los controles realizados durante distintas fases del cultivo celular, los ensayos realizados son:

1.- Control de esterilidad: El ensayo de esterilidad se realiza en condiciones asépticas, pero las precauciones tomadas para evitar la contaminación no deben afectar a los microorganismos cuya presencia deba ponerse de manifiesto en el ensayo. Los medios de cultivo para el ensayo son medios comerciales a los que previamente se les ha realizado un control de esterilidad por lote recibido. Los medios utilizados en el ensayo de esterilidad son el caldo de tioglicolato, para la detección de bacterias anaerobias, aunque también permite detectar bacterias aerobias, y el caldo de peptona de caseína y de soja para el cultivo de bacterias aerobias, pero también apropiado para hongos. Las muestras son inoculadas e incubadas durante 14 días a las temperaturas apropiadas para cada medio, se observa el cultivo varias veces durante el periodo de incubación.

2.- Detección de micoplasma: Se ha testado la presencia de micoplasmas en los cultivos de la línea CTEh como de los fibroblastos (HEFs) siguiendo dos protocolos de diferentes casas comerciales.

Por un lado, se utilizó MycoAlert Micoplasma Detection Kit (LONZA), basado en un método bioquímico que detecta la actividad de ciertos enzimas micoplasmáticos mediante luminometría con muestras celulares tras nueve días en cultivo. El resultado fue negativo para ambas muestras.

Por otro lado, se utilizó Venor®GeM (Minerva biolabs), basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), método de elección por su alta sensibilidad en la detección de contaminación por Micoplasma y Acholeplasma en cultivos celulares, con las muestras las mismas muestras tras cinco días en cultivo. De nuevo, el resultado fue negativo para ambas muestras.

The microbiological controls were carried out following the GLP procedures established in the cell culture unit, two tests were performed:

1- Microorganism detection control.

2- Micoplasma detection.

The results were negative

Mantenimiento de la línea: Se realiza un cambio diario de medio
Line maintenance: *Cell culture medium was changed every single day*

Ratio de pase: El periodo entre pases es 6-7 días
Passage ratio: *Passage was carried out each 6-7 days*

Método de pase: Los pases se realizan de forma mecánica
Passage method: *Passage was carried out each 6-7 days*

Xenobióticos **si**
Xenobiotics *Yes*

Marcadores: La caracterización de la línea se llevo a cabo a distintos pases (P6-P10 y P40-P50)
Markers: *The in Vitro characterization was carried out at different passages (P6-P10 y P40-P50)*

	Método (ARN/proteínas) <i>Method</i> <i>(RNA/proteins)</i>	nº pase <i>Passage n.</i>	resultado <i>results</i>	comentarios <i>comments</i>
Oct 4	RT-PCR/ IF	Distintos Pases	+	Anexo
Nanog	RT-PCR	Distintos Pases	+	Anexo
Rex 1				
Sox 2	RT-PCR/ IF	Distintos Pases	+	Anexo
SSEA3				
SSEA4	IF / FCM	Distintos Pases	+	Anexo
TRA-1-60	IF / FCM	Distintos Pases	+	Anexo
TRA-1-81	IF	Distintos Pases	+	Anexo
Telomerasa	RT-PCR	Distintos Pases	+	Anexo
Fosfatasa Alk.	Kit Tinción (SIGMA®)	Distintos Pases	+	Anexo
Cariotipo	Bandeo cromosómico GTL	Distintos Pases	46, XY <i>t(9;15)(q34.3;q14)</i>	Anexo
Otros / Others	(HLAs RT-PCR)	Distintos Pases	+	Anexo

IF: Inmunofluorescencia / *Immunofluorescence*

FCM: Citometría de flujo / *Flow cytometry*

Capacidad de diferenciación

Differentiation capacity

	Ectodermo/ <i>Ectoderm</i>			Endodermo/ <i>Endoderm</i>			Mesodermo/ <i>Mesoderm</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>	marcador <i>marker</i>	pase <i>passage</i>	resultado <i>result</i>
In Vitro <i>In vitro</i>	Isl-1	(P35)	+	α-fetoproteína Sox17	(P35)	+	BMP4	(P35)	+

In vivo/ *in vivo*

Método: Inyección intratesticular de CTEh en ratones inmunodeprimidos NOD-SCID Beige

Resultado: formación de teratomas (Teratomas con fluido quístico) en los que se objetivan los distintos componentes tisulares derivados de las distintas hojas embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo.

Method: *injection of undifferentiated hESC into SCID-beige, to generate teratomas.*

Results: *Teratoma formation and the derivatives from the three germ layers were detected.*

<p>Descripción de las características de diferenciación <i>in Vitro</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vitro</i></p> <p>Para la diferenciación <i>in vitro</i> se recurre a la formación de cuerpos embrionarios. La obtención de los cuerpos embrionario humanos se realiza en gota pendiente durante dos días seguida de un cultivo masivo en placas tratadas con gelatina, después de 14 días de cultivo en medio sin FGF se extrae el ARN para detectar la expresión de los marcadores de las 3 capas germinales: (i) ectodermo (ii) mesodermo y (iii) endodermo.</p> <p><i>For the in vitro differentiation study, embryoid bodies (EB) were cultured in hanging drop for 2 days in suspension and then transferred onto gelatin-coated dishes and cultured for an additional 10–14 days. Total RNA was extracted for RT-PCR, to assess the expression of markers associated with differentiation of the 3 germ layers.</i></p>
<p>Datos de la determinación de pluripotencialidad <i>in vivo</i> o formación de teratomas <i>Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation</i></p> <p>A las 6-8 semanas de inocular las CTEh indiferenciadas en ratones inmunodeprimidos NOD-SCID Beige, se formaron teratomas. En los teratomas se objetivan los distintos componentes titulares derivados de las distintas hojas embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo.</p> <p><i>In vivo differentiation studies were carried out by the generation of teratomas via injection of undifferentiated hESC into SCID-beige. 6 to 8 weeks later, the teratomas were processed and the three germ layers (Endoderm, Mesoderm and Ectoderm) derivatives were detected.</i></p>
<p>Datos de la tipificación HLA <i>HLA typification data</i></p> <p>La línea expresa: HLA-A; HLA-B y HLA-C a nivel de mensajero (RT-PCR) <i>HLA-A; HLA-B and HLA-C were detect by RT-PCR</i></p>
<p>Consistencia celular tras 6 pases de congelación y descongelación. Resultados. <i>Cell consistency alter 6 passages of freezing and thawing.</i></p> <p>La línea preserva todas sus características de CTEh, tras varios ciclos de congelación/descongelación (> 6 pases). <i>Cryopreservation of hESC colonies was successfully performed, The thawing and freezing protocol was carried out over 6 passages.</i></p>
<p>Pase en el momento del registro <i>Passage at the time of the recording</i></p> <p>La línea se encuentra actualmente en el pase P-83 <i>This human ESC, have reach passage P-83.</i></p>

<p>¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i></p> <p>Sí Yes <input type="checkbox"/> No No <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Comentarios/ Comments:</p>	<p>¿Se llevó a cabo un análisis clonal? <i>Has a clonal analysis been carried out?</i></p> <p>Sí/ Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Resultado / Result</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Otras observaciones o información relevantes (a juicio de los Investigadores Principales):
Other observations or relevant information (to the discretion of the Principal Investigators):

- A- La línea celular obtenida presenta un cariotipo de varón portador de una translocación recíproca entre 9q34.4 y 15q14 confirmada mediante técnica de hibridación fluorescente *in situ* - FISH (ver Anexo).

- B- Listado del personal investigador que ha participado en el proceso:
 - 1- Criopreservación y Descongelación de los preembriones y Aislamiento de la ICM:
 - M^a Dolores Lozano Arana (HUVR)
 - Cristina Moya de Alarcón (HUVR)

 - 2- Mantenimiento y Caracterización:
 - Yolanda Aguilera García (CABIMER)
 - Nuria Mellado Damas (CABIMER)

 - 3- Cariotipo
 - Javier Sánchez García (HUVR)

 - 4- Diferenciación "in-vivo"
 - Luis Sánchez Palazón (CABIMER)
 - Yolanda Aguilera (CABIMER)

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.

<p>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre <i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i></p> <p>Juan Jesús Bandera González</p>  <p>Fecha/ Date:</p>	<p>Firma de los Investigadores Principales <i>Signature of the Principal Investigators</i></p> <p>Guillermo Antiñolo Abdelkrim Hmadcha</p>  <p>Fecha /Date: 21-12-2009</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i></p> <p>Juan Jesús Bandera González, Director Gerente, Fundación Progreso y Salud</p>	
<p>Dirección Postal: <i>Postal Address:</i></p> <p>Avda. Américo Vespucio, nº5 Bloque 2, 2ª Planta Isla de la Cartuja 41092 - Sevilla</p>	<p>Teléfono /Telephone: 955 04 04 50</p> <p>Fax: 955 04 04 57</p> <p>E-mail: juanjesus.bandera@juntadeandalucia.es</p>