

**BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)**  
*National Bank of Stem Cell Lines*  
**IMPRESO DE SOLICITUD DE REGISTRO Y DEPÓSITO DE UNA LÍNEA iPS HUMANA**  
*Application Form to Register and Deposit of an human iPS cell line*

**FECHA:** 23/06/2015

**DOCUMENTOS QUE DEBEN ACOMPAÑAR LA SOLICITUD:**

*Attached documents:*

- ☒ **Copia de la autorización del proyecto en el cual se genera la línea celular, junto con informe favorable del Comité Ético del centro de procedencia.**  
*A copy of the project authorization in which the cell line is obtained along with a favourable report of the Clinical Research Ethics Committee*
- ☐ **Copia de cualquier publicación científica relacionada con la línea iPS generada.**  
*A copy of any relevant published scientific papers related to the iPS cell line generated*
- ☒ **C. V. del investigador principal (una página; formato libre).**  
*A one page CV for the Principal Investigator*

**SECCIÓN 1-INFORMACIÓN DE LA MUESTRA ORIGINAL Y DE LA iPS GENERADA.**

*Section 1-Information of the original cell line and the generated iPS*

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Nombre de la línea iPS</b><br><i>Name of the iPS line:</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | [PD]FiPS031-4F-1                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                         |
| <b>Muestra original donada.</b><br><b>Detallar tipo de célula, tejido de origen y localización anatómica de la muestra biológica de la que se obtiene la línea original.</b><br><b>Si son células comerciales, detallar nombre, referencia y distribuidor comercial</b><br><i>Original sample donated.</i><br><i>Detail cell type, tissue of origin and anatomic location of the biological sample from which the original line is obtained.</i><br><i>If cells are commercial, detail name, reference and trade distributor.</i> | Fibroblastos procedentes de Telethon Biobank (FFF-031/FFF0322010), procedentes de un paciente con Enfermedad de Parkinson.<br><br>Fibroblasts from Telethon Biobank (FFF-031/FFF0322010), from a patient with Parkinson's disease. |                                                                                                         |
| <b>Sexo y edad del donante.</b><br><i>Sex and age of the donor</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Masculino/male                                                                                                                                                                                                                     | 48                                                                                                      |
| <b>¿El donante tiene alguna patología?</b><br><i>Has the donor any pathological condition?</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <b>NO</b> <input type="checkbox"/><br><i>No</i>                                                                                                                                                                                    | <b>SÍ</b> <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Parkinson's disease<br><i>Yes (specify)</i> |
| <b>¿La patología es de origen genético?</b><br><i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>NO</b> <input type="checkbox"/><br><i>No</i>                                                                                                                                                                                    | <b>SÍ</b> <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) SNCA A53T<br><i>Yes (specify)</i>           |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Muestra biológica recibida</b><br><i>Biological sample</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <b>Fresco</b> <input type="checkbox"/><br/> <i>Fresh</i> </div> <div style="text-align: center;"> <b>Crioconservado</b> <input checked="" type="checkbox"/><br/> <i>Cryopreserved</i> </div> </div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Fecha de la donación de la muestra biológica</b><br><i>Date of donation of the biological sample</i><br>01.10.2012                                                                                                                                                                                                                          | <b>Fecha del uso o descongelación</b> <i>(si congelado)</i><br><i>Date used or thawed (if frozen)</i><br>3.04.2011                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario).</b><br><i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>                                                                                                                                                              | Medio de cultivo/ Culture media:<br>IMDM + 10%FBS + 0,5% Penicilin-Streptomycin (Gibco, InVitrogen corporation).<br><br>37°C- 5%CO2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>¿Hay disponibilidad de viales congelados de las células de origen? ¿En qué pase?</b><br><i>Is there availability of frozen vials of original cells? At what passage?</i>                                                                                                                                                                    | Si, p7<br><br>Yes, p7                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Método utilizado en la generación de la línea iPSc. (Integrativa/ No-integrativa)</b><br><b>Especificar factores y plásmidos de reprogramación utilizados.</b><br><i>Method used for the generation of iPSC line (Integrative / Non-integrative)</i><br><i>Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>                          | Generación de las células pluripotenciales inducidas (iPSC) a partir de fibroblastos procedentes de un paciente (SNCA A53T) usando una infección retroviral con los siguientes factores de transcripción: Oct-4, Sox2, Klf-4 y c-Myc. Vectores utilizados: pMX-FLAG-Oct4VP16-Orange, pMSCV-FLAG-hKLF4, pMSCV-FLAG-hcMyc y pMSCV-FLAG-hSOX2.<br><br>The induced pluripotent stem cell line (iPS) has been generated with fibroblasts from a patient (SNCA A53T) using a retroviral infection with the selected transcription factors: Oct-4, Sox2, Klf-4 and c-Myc. Vectors used: pMX-FLAG-Oct4VP16-Orange, pMSCV-FLAG-hKLF4, pMSCV-FLAG-hcMyc and pMSCV-FLAG-hSOX2. |
| <b>Condiciones de cultivo de la línea de iPSc generada. (si se describen en publicación, indicar referencia)</b><br><i>iPS Culture conditions (if they are described in a publication, please indicate the reference)</i>                                                                                                                      | Support: human foreskin fibroblasts (ATCC, American Type Culture Collection, CCD112Sk). Culture 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), 10 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).                                                                                                                                                             |
| <b>Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo (forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma; otros)</b><br><i>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)</i> | 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.<br><br>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.                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación)</b><br><i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i>                                                                                                                                                                  | La congelación de los clumps de colonias se ha realizado en FBS(90%) + DMSO(10%), mediante congelador programable (-0.5°C/min.). Los viales se han descongelado a 37°C durante unos minutos<br>The clumps of colonies were cryopreserved in FBS(90%)+ DMSO (10%), by a programmable freezer (-0.5°C/min.). Vials were thawed at 37°C for some minutes.                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

|                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Pase de la línea celular en el momento del banqueo/registro. (Máximo: Pase 15)</b><br><i>Passage at the time of the banking/registration (Max: Passage 15)</i>                                                                    | p9-p18                                                                                                                                                                                                               |
| <b>¿Ha sido la línea modificada genéticamente?</b><br><i>Has the line been genetically modified?</i><br><b>Sí</b> Yes <input checked="" type="checkbox"/> <b>No</b> No <input type="checkbox"/><br><br><b>Comentarios/ Comments:</b> | <b>¿Se llevó a cabo un análisis clonal?</b><br><i>Has a clonal analysis been carried out?</i><br><br><b>Sí/ Yes</b> <input type="checkbox"/> <b>No</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>Resultado / Result</b> |

## SECCIÓN 2 RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA iPS.

Adjuntar resultados (imágenes o gráficos) como anexo

Section 2 iPS Cell Line characterization results. Attach results (images and graphics) as an annex

| Test de pluripotencia<br><i>Pluripotency test</i><br>Anexo 1<br>Annex 1                                                                                                                    | Método                                                                                                                                                                                                                                   | Marcador                 | Nº pase           | Resultado      |                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------|----------------|-----------------|
|                                                                                                                                                                                            | Comentarios<br><i>Method</i>                                                                                                                                                                                                             | <i>Marker</i>            | <i>Passage n.</i> | <i>Results</i> | <i>Comments</i> |
|                                                                                                                                                                                            | Oct 4                                                                                                                                                                                                                                    | Inmunocitoq.             |                   | +              |                 |
|                                                                                                                                                                                            | Nanog                                                                                                                                                                                                                                    | Inmunocitoq.             |                   | +              |                 |
|                                                                                                                                                                                            | Sox 2                                                                                                                                                                                                                                    | Inmunocitoq.             |                   | +              |                 |
|                                                                                                                                                                                            | SSEA3                                                                                                                                                                                                                                    | Inmunocitoq.             |                   | +              |                 |
|                                                                                                                                                                                            | SSEA4                                                                                                                                                                                                                                    | Inmunocitoq.             |                   | +              |                 |
|                                                                                                                                                                                            | TRA-1-60                                                                                                                                                                                                                                 | Inmunocitoq.             |                   | +              |                 |
|                                                                                                                                                                                            | TRA-1-81                                                                                                                                                                                                                                 | Inmunocitoq.             |                   | +              |                 |
|                                                                                                                                                                                            | Fosfatasa. Alk                                                                                                                                                                                                                           | Actividad                |                   | +              |                 |
| Test de diferenciación<br>in vitro<br><i>In vitro differentiation test</i>                                                                                                                 | Método                                                                                                                                                                                                                                   | Marcador                 | Nº pase           | Resultado      |                 |
|                                                                                                                                                                                            | Comentarios<br><i>Method</i>                                                                                                                                                                                                             | <i>Marker</i>            | <i>Passage n</i>  | <i>Results</i> | <i>Comments</i> |
|                                                                                                                                                                                            | Ectodermo<br><i>Ectoderm</i>                                                                                                                                                                                                             | Inmunocitoq. Tuj1        |                   | +              |                 |
|                                                                                                                                                                                            | Mesodermo<br><i>Mesoderm</i>                                                                                                                                                                                                             | Inmunocitoq. GATA4 / AAS |                   | + / +          |                 |
|                                                                                                                                                                                            | Endodermo<br><i>Endoderm</i>                                                                                                                                                                                                             | Inmunocitoq. AFP / FOXA2 |                   | + / +          |                 |
| Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> (espontánea/inducida)<br><br><i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i> | Mesodermo: cultivo de cuerpos embrioides (EBs) en medio de cultivo suplementado con ácido ascórbico. Endodermo: cultivo de cuerpos embrioides. Ectodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio N2/B27 sobre células PA6 (ver Anexo 2). |                          |                   |                |                 |
|                                                                                                                                                                                            | Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture. Ectoderm: EBs culture in N2/B27on PA6 cells (see Annex 2).                                                            |                          |                   |                |                 |

| <b>Test de diferenciación in vivo</b><br><i>In vivo differentiation test</i>                                                                                                                            | <table><tr><th></th><th>Método</th><th>Marcador</th><th>Nº pase</th><th>Resultado</th><th></th></tr><tr><th>Comentarios</th><th>Method</th><th>Marker</th><th>Passage n</th><th>Results</th><th>Comments</th></tr><tr><td><b>Ectodermo</b><br/><i>Ectoderm</i></td><td>Imunohistoq.</td><td>GFAP</td><td></td><td>+</td><td></td></tr><tr><td><b>Mesodermo</b><br/><i>Mesoderm</i></td><td>Imunohistoq.</td><td>ASMA / ASA</td><td></td><td>+</td><td></td></tr><tr><td><b>Endodermo</b><br/><i>Endoderm</i></td><td>Imunohistoq.</td><td>AFP / FOXA2</td><td></td><td>+</td><td></td></tr></table> |             | Método    | Marcador  | Nº pase  | Resultado |  | Comentarios | Method | Marker | Passage n | Results | Comments | <b>Ectodermo</b><br><i>Ectoderm</i> | Imunohistoq. | GFAP |  | + |  | <b>Mesodermo</b><br><i>Mesoderm</i> | Imunohistoq. | ASMA / ASA |  | + |  | <b>Endodermo</b><br><i>Endoderm</i> | Imunohistoq. | AFP / FOXA2 |  | + |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-----------|-----------|----------|-----------|--|-------------|--------|--------|-----------|---------|----------|-------------------------------------|--------------|------|--|---|--|-------------------------------------|--------------|------------|--|---|--|-------------------------------------|--------------|-------------|--|---|--|
|                                                                                                                                                                                                         | Método                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Marcador    | Nº pase   | Resultado |          |           |  |             |        |        |           |         |          |                                     |              |      |  |   |  |                                     |              |            |  |   |  |                                     |              |             |  |   |  |
| Comentarios                                                                                                                                                                                             | Method                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Marker      | Passage n | Results   | Comments |           |  |             |        |        |           |         |          |                                     |              |      |  |   |  |                                     |              |            |  |   |  |                                     |              |             |  |   |  |
| <b>Ectodermo</b><br><i>Ectoderm</i>                                                                                                                                                                     | Imunohistoq.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | GFAP        |           | +         |          |           |  |             |        |        |           |         |          |                                     |              |      |  |   |  |                                     |              |            |  |   |  |                                     |              |             |  |   |  |
| <b>Mesodermo</b><br><i>Mesoderm</i>                                                                                                                                                                     | Imunohistoq.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | ASMA / ASA  |           | +         |          |           |  |             |        |        |           |         |          |                                     |              |      |  |   |  |                                     |              |            |  |   |  |                                     |              |             |  |   |  |
| <b>Endodermo</b><br><i>Endoderm</i>                                                                                                                                                                     | Imunohistoq.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | AFP / FOXA2 |           | +         |          |           |  |             |        |        |           |         |          |                                     |              |      |  |   |  |                                     |              |            |  |   |  |                                     |              |             |  |   |  |
| <b>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i></b><br><br><i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i>                                                     | <p>Inyección intratesticular en ratones SCID de 4•10 mill de células indiferenciadas y tras 8 semanas, análisis de los teratomas producidos mediante técnicas de inmunohistoquímica para ectodermo, mesodermo y endodermo (Anexo 3).</p> <p>4•10 mill of undifferentiated cells were injected into the testis of SCID mice. After 8 weeks, teratomas were analyzed by immunohistochemistry for ectoderm, endoderm and mesoderm (Annex 3).</p>                                                                                                                                                       |             |           |           |          |           |  |             |        |        |           |         |          |                                     |              |      |  |   |  |                                     |              |            |  |   |  |                                     |              |             |  |   |  |
| <b>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase)</b><br><i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i>                                                                                   | 46 XY p4                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |             |           |           |          |           |  |             |        |        |           |         |          |                                     |              |      |  |   |  |                                     |              |            |  |   |  |                                     |              |             |  |   |  |
| <b>Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de la línea celular</b><br><i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the cell line</i> | <p>Los marcadores de microsatélites de los fibroblastos originales coinciden con los de la línea de iPS generada (Anexo 5)</p> <p>Microsatellites markers of the initial fibroblasts sample are identical than the markers of the iPS line (Annex 5).</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |             |           |           |          |           |  |             |        |        |           |         |          |                                     |              |      |  |   |  |                                     |              |            |  |   |  |                                     |              |             |  |   |  |
| <b>Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular)</b><br><i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>                                 | <p>La qPCR evidenció la integración de los 4 genes; Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-myc (Anexo 6)</p> <p>Integration of the 4 genes; Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-myc was shown by qPCR (Annex 6).</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |             |           |           |          |           |  |             |        |        |           |         |          |                                     |              |      |  |   |  |                                     |              |            |  |   |  |                                     |              |             |  |   |  |

|                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Test de silenciamiento<br/>(detallar método<br/>utilizado según tipo de<br/>reprogramación<br/>celular)</b><br><i>Silencing Test (specify<br/>method used depending<br/>on cell reprogramming)</i>                                                       | <p>Se evidenció el silenciamiento de los 4 genes de reprogramación: Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc (Anexo 6)</p> <p>Silencing of reprogramming genes Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc has been shown (Annex 6)</p>                                   |
| <b>Confirmación del<br/>diagnóstico genotípico<br/>en las iPSC generadas<br/>a partir de muestras<br/>con mutación genética</b><br><i>Confirmation of<br/>genotypic diagnosis of<br/>the cell line generated<br/>from samples with<br/>genetic mutation</i> | <p>La línea de iPS generada presenta la mutación A53T en el gen SNCA, que también presentan los fibroblastos de los que procede (Anexo 7)</p> <p>The iPS line shows the A53T mutation in SNCA as the fibroblasts from origin (Annex 7)</p> |
| <b>Test de micoplasma<br/><i>Mycoplasma Test</i></b>                                                                                                                                                                                                        | <p>Negativo por PCR (Anexo 8)</p> <p>Negative by PCR (Annex 8)</p>                                                                                                                                                                         |

### SECCIÓN 3      DATOS DEL DEPOSITANTE

Section 3      Applicant Details

|                                                                                                  |                                                                                                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Investigador Principal:</b><br><i>Principal Investigator:</i><br>Anna Veiga Lluch             | <b>Dirección Postal:</b><br><i>Postal address:</i><br>CMRB. Doctor Aiguader, 88, 08003, Barcelona |
| <b>Centro de Trabajo:</b><br><i>Institution:</i><br>Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona | <b>Teléfono (phone):</b> 933160360<br><b>Fax:</b> 933160301<br><b>E-mail:</b> blc@cmrb.eu         |

**SECCIÓN 4**      **INFORMACIÓN ADICIONAL (OPCIONAL)**  
*Section 4*      *Additional information (optional)*

**Otras observaciones o información relevantes** (a juicio del Investigador Principal):  
Other observations or relevant information (to the discretion of the Principal Investigator):

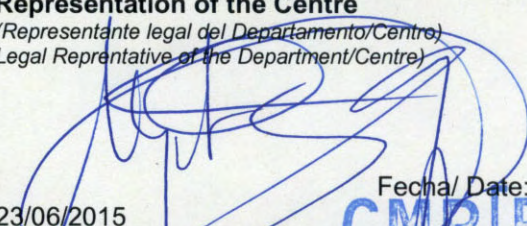
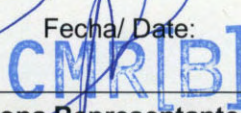
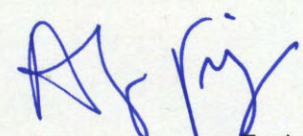
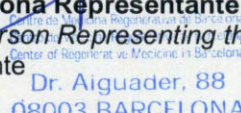
**Otras observaciones o información relevantes** (a rellenar por el BNLC):  
Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)

**Seguimiento de la línea** (a rellenar por el BNLC):  
Follow up of the line (to be completed by BNLC)

## SECCIÓN 5 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><br><i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i><br><i>Legal Representative of the Department/Centre</i><br><br>Fecha / Date: 23/06/2015<br> | <b>Firma del Investigador Principal</b><br><i>Signature of the Principal Investigator</i><br><br>Fecha /Date 23/06/2015 |
| <b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b><br><i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i><br>Margarita Sala Azón, Gerente<br><br>Dr. Aiguader, 88<br>08003 BARCELONA<br>NIF G-63687222                                                                                              |                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Dirección Postal:</b><br><i>Postal Address:</i><br>Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona<br>Doctor Aiguader, 88, 7ª planta, 08003, Barcelona                                                                                                                                                                                                                                                      | <b>Teléfono /Telephone:</b> 933160303<br><b>Fax:</b> 933160301<br><b>E-mail:</b> gerencia@cmrb.eu                                                                                                         |

# **ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR [PD]FiPS031-4F-1 EN EL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES**

## ANEXOS

Anexo 1: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

Anexo 2: Diferenciación *in vitro*

Anexo 3: Diferenciación *in vivo*

Anexo 4: Cariotipo

Anexo 5: Estudio microsatélites

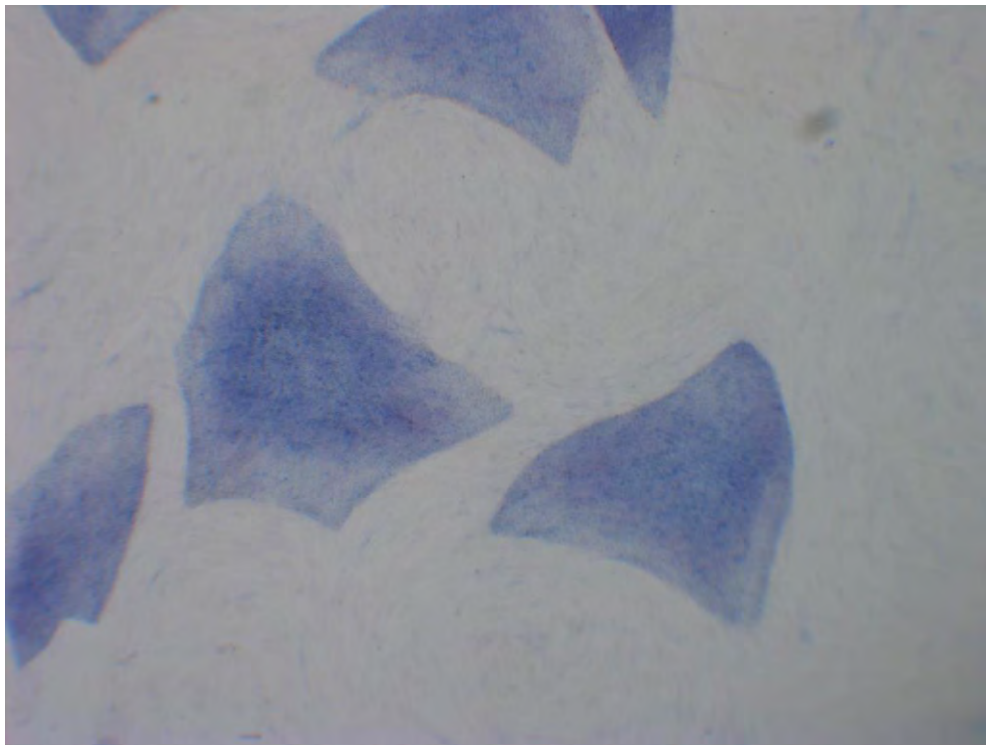
Anexo 6: Test de integración y de silenciamiento

Anexo 7: Genotipación de la línea

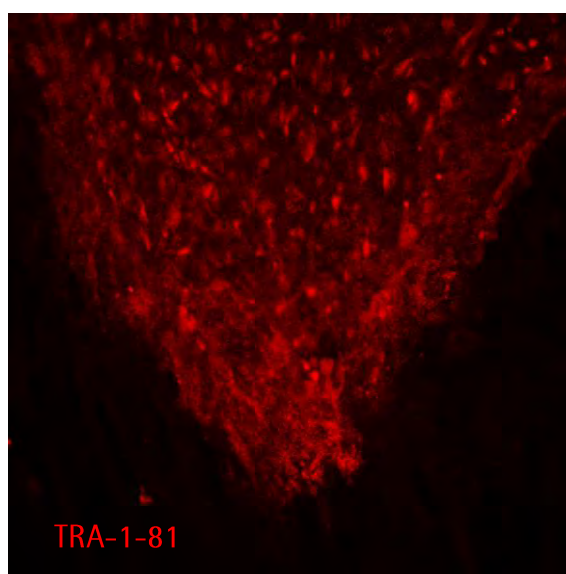
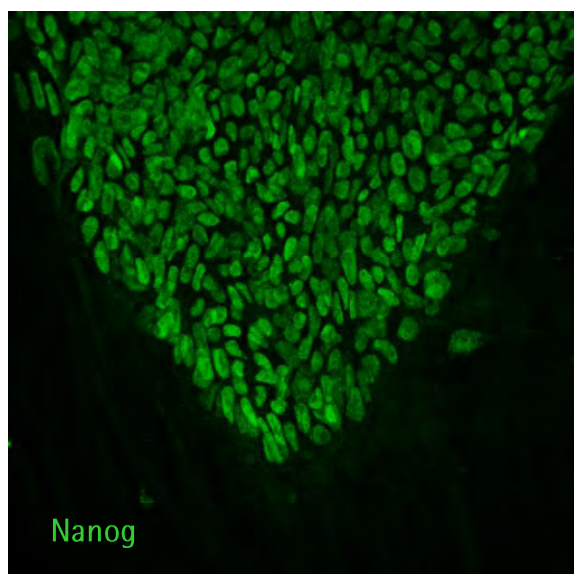
Anexo 8: Test de mycoplasma

## **Anexo 1**

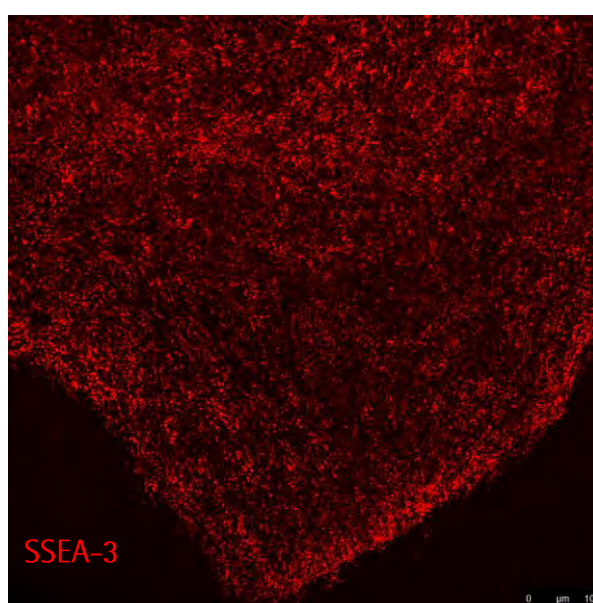
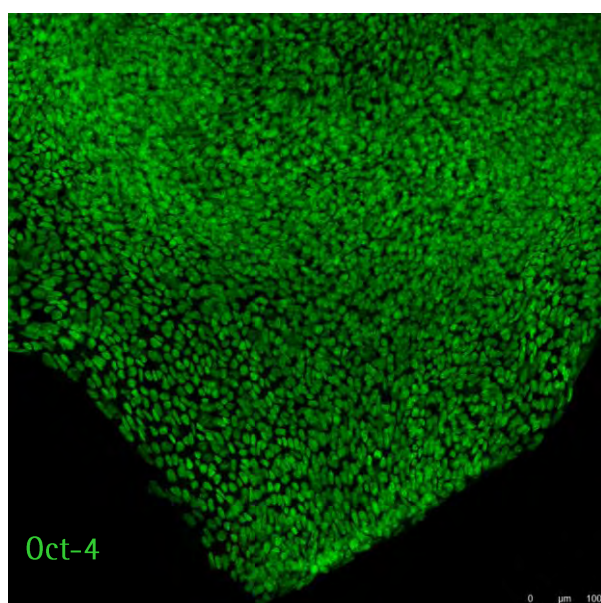
### **Fenotipo. Marcadores de pluripotencia**



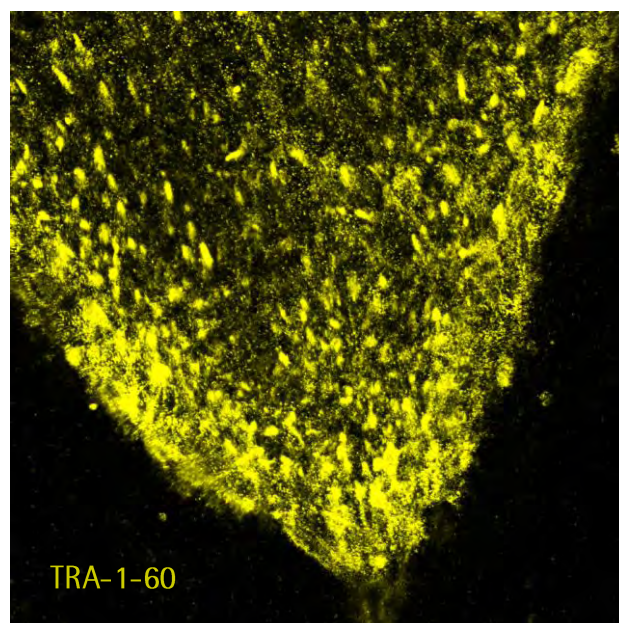
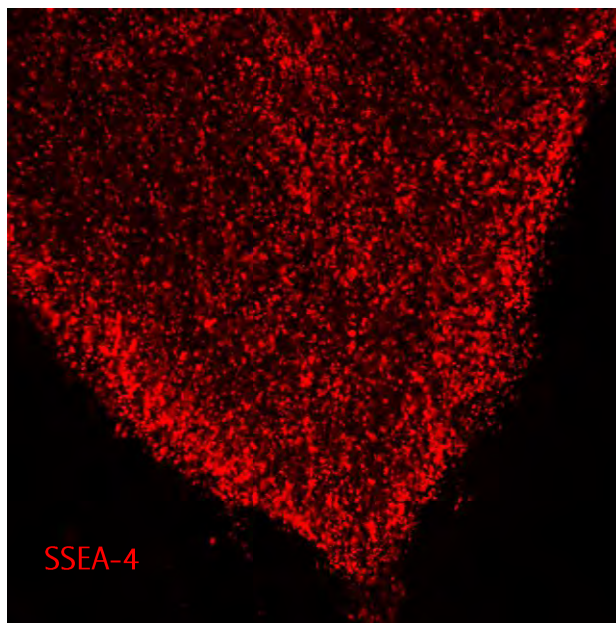
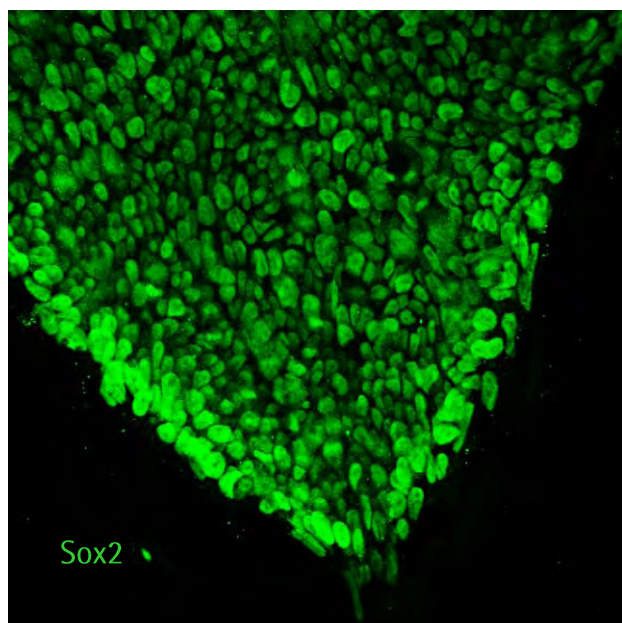
Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células madre pluripotentes



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia  
**Nanog y TRA1-81**



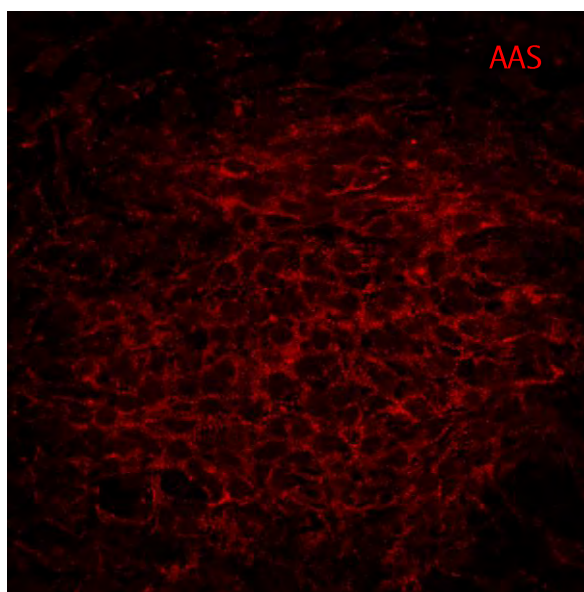
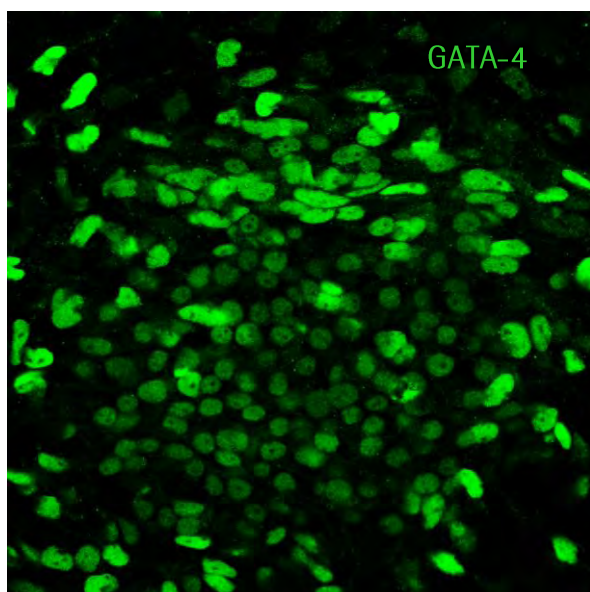
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia  
**Oct-4 y SSEA-3**



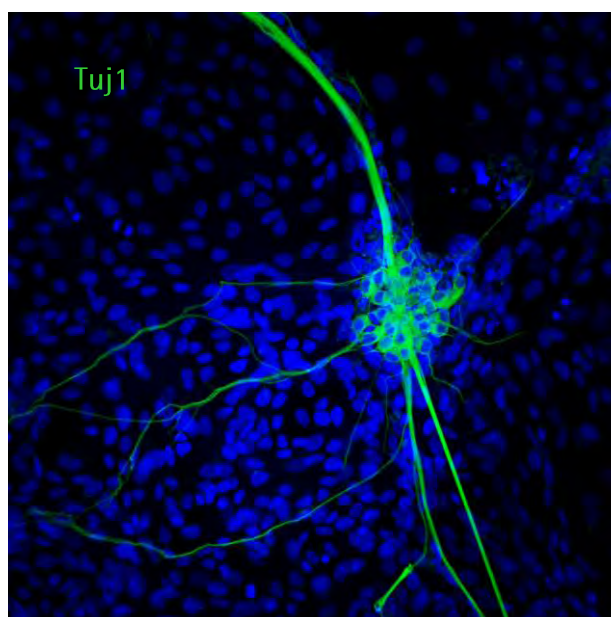
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia  
**Sox-2, SSEA-4 y TRA-1-60**

## **Anexo 2**

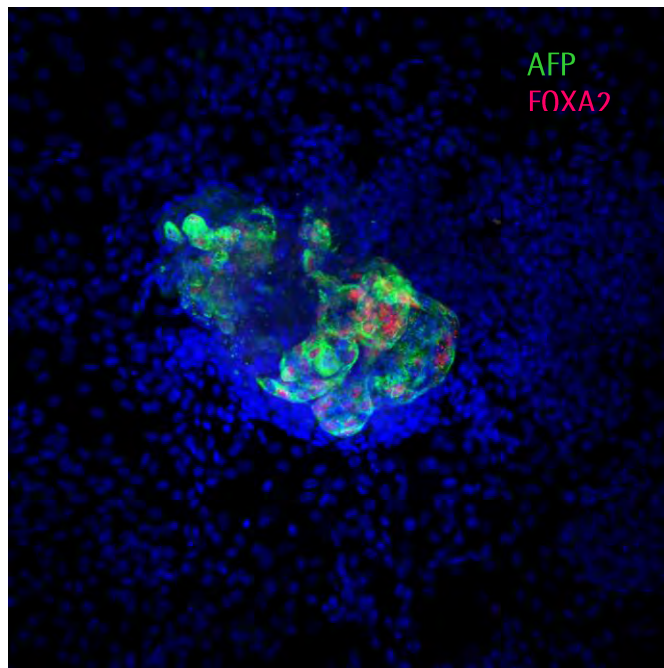
### **Diferenciación *in vitro***



Diferenciación *in vitro* a mesoderma: Células positivas para **GATA-4** y **AAS**



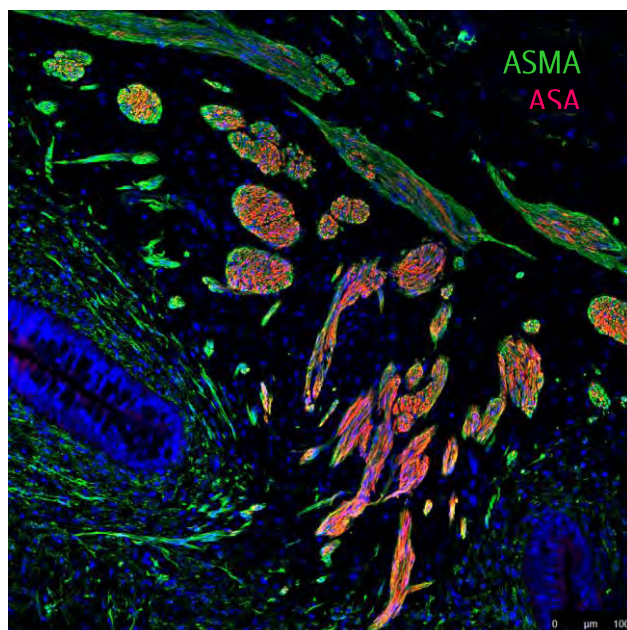
Diferenciación *in vitro* a ectoderma: Células positivas para **Tuj1**



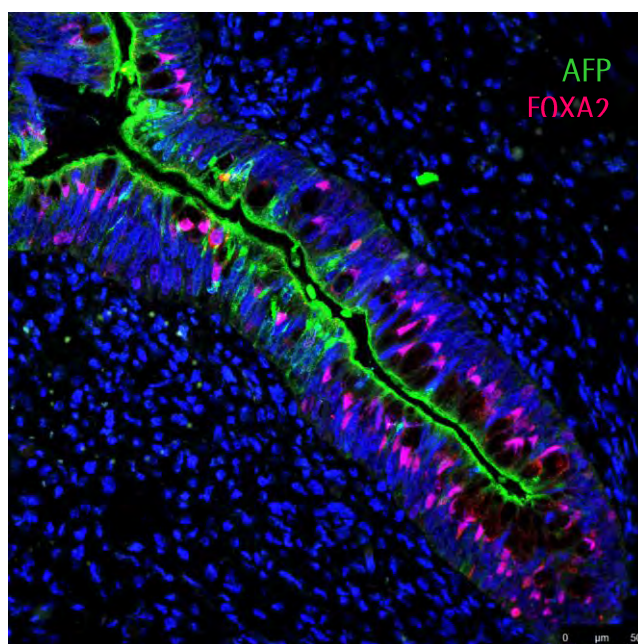
Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **AFP y FOXA2**

## **Anexo 3**

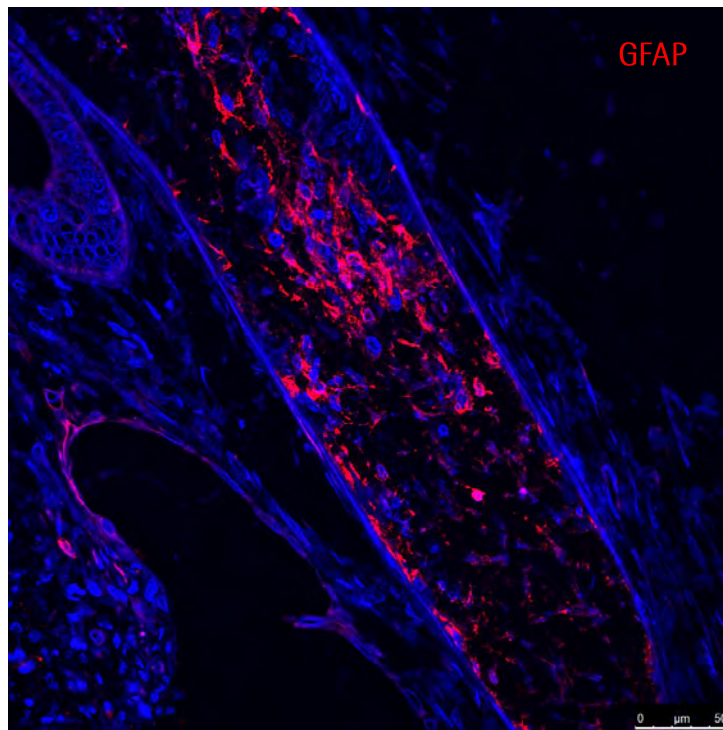
### **Diferenciación *in vivo***



Diferenciación *in vivo* a mesodermo: Células positivas para **ASMA y ASA**



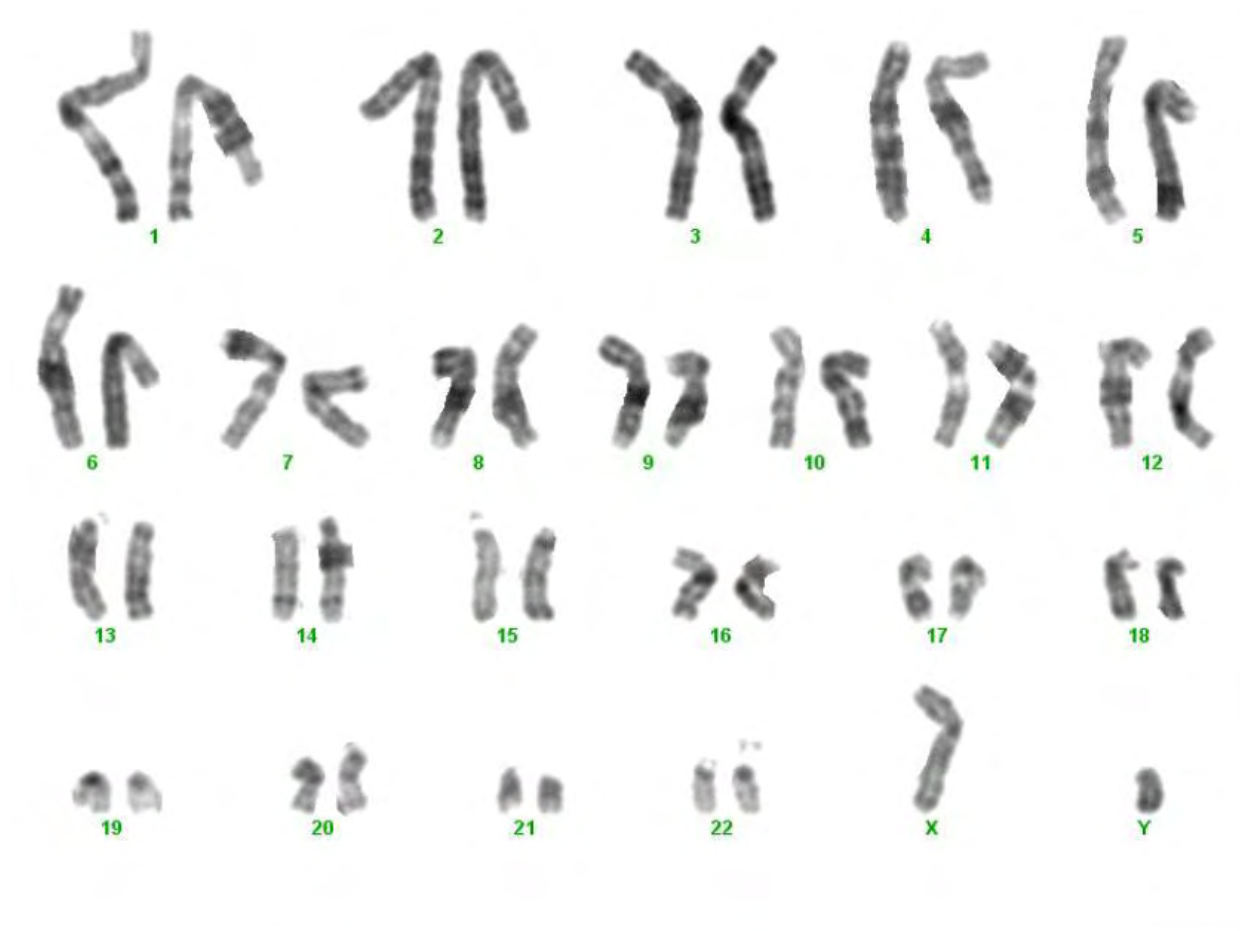
Diferenciación *in vivo* a endodermo: Células positivas para **AFP y FOXA2**



Diferenciación *in vivo* a ectodermo: Células positivas para **GFAP**

## **Anexo 4**

### **Cariotipo**



## **Anexo 5**

### **Estudio microsatélites**

Análisis de microsatélites en la línea de células madre pluripotentes [PD]031 FiPS-4F-1 y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.



## qCell Identity Test

Web: <http://www.qgenomics.com>  
Email: [info@qgenomics.com](mailto:info@qgenomics.com)  
Tel: 93.316.08.08

### Servicio de autenticación de líneas celulares

#### Detalles de la solicitud

**Solicitante:** Cristina Gómez Santos  
**Centro:** Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona  
**Departamento:**

#### Detalles de la muestra

**Identificador externo:** PD031 FiPS-4F-1  
**Identificador interno:** qG15013241  
**Descripción:** 1 tubo de 15mL con pellet celular.  
Nota: ID petición PD031 FiPS-4F-1, pero en el tubo indica PD FiPS 031 4F-1

### Informe de resultados

#### Resultados

**Calidad de la muestra:** Correcta

| Muestra         | TH01 | D21S11  | D5S818 | D13S317 | D7S820 | D16S539 | CSF1PO | AMEL | vWA   | TPOX |
|-----------------|------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|------|-------|------|
| PD031 FiPS-4F-1 | 7-9  | 30-31.2 | 11-13  | 11-11   | 10-11  | 9-12    | 12-12  | XY   | 16-18 | 8-8  |

**Coincidencia con línea celular conocida:** No Cual:

**Contaminación con otra línea celular humana:** No detectable

**Observaciones:** El patrón de marcadores STR coincide en un 100 % con la línea celular Parkinson FFF-031 p7 (qG1503234)

**Firmado:**  
Manel Garcia

**Fecha:** 02/06/2015

#### Breve descripción del método

El estudio se ha realizado mediante el genotipado de marcadores STR (también conocidos como microsatélites: TH01, D21S11, D5S828, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, vWA y TPOX). La combinación de los nueve marcadores utilizados produce un perfil de alelos con una probabilidad de coincidencia por azar de 1 en  $2,9 \times 10^9$ . Se usa además un marcador para identificar el sexo de la muestra (AMEL).

### Servicio de autenticación de líneas celulares

#### Detalles de la solicitud

**Solicitante:** Cristina Gómez Santos  
**Centro:** Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona  
**Departamento:**

#### Detalles de la muestra

**Identificador externo:** Parkinson FFF-031 p7  
**Identificador interno:** qG15013234  
**Descripción:** 1 tubo 1.5mL con pellet celular.  
Nota: ID petición Parkinson FFF-031 p7, pero en el tubo indica Fibras FFF-03

### Informe de resultados

#### Resultados

**Calidad de la muestra:** Correcta

| Muestra              | TH01 | D21S11  | D5S818 | D13S317 | D7S820 | D16S539 | CSF1PO | AMEL | vWA   | TPOX |
|----------------------|------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|------|-------|------|
| Parkinson FFF-031 p7 | 7-9  | 30-31.2 | 11-13  | 11-11   | 10-11  | 9-12    | 12-12  | XY   | 16-18 | 8-8  |

**Coincidencia con línea celular conocida:** No Cual:

**Contaminación con otra línea celular humana:** No detectable

**Observaciones:** El patrón de marcadores STR coincide en un 100 % con la línea celular PD031 FIPS-4F-1 (qG15013241)

**Firmado:**  
Manel Garcia

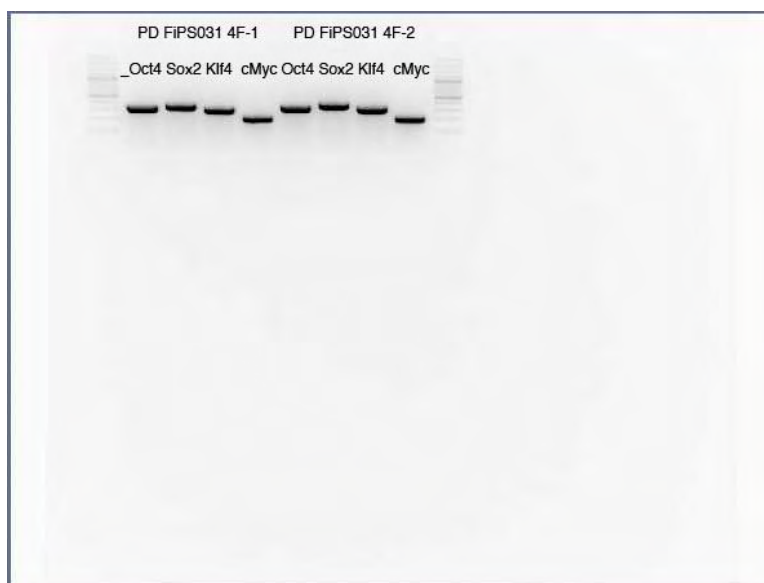
**Fecha:** 02/06/2015

#### Breve descripción del método

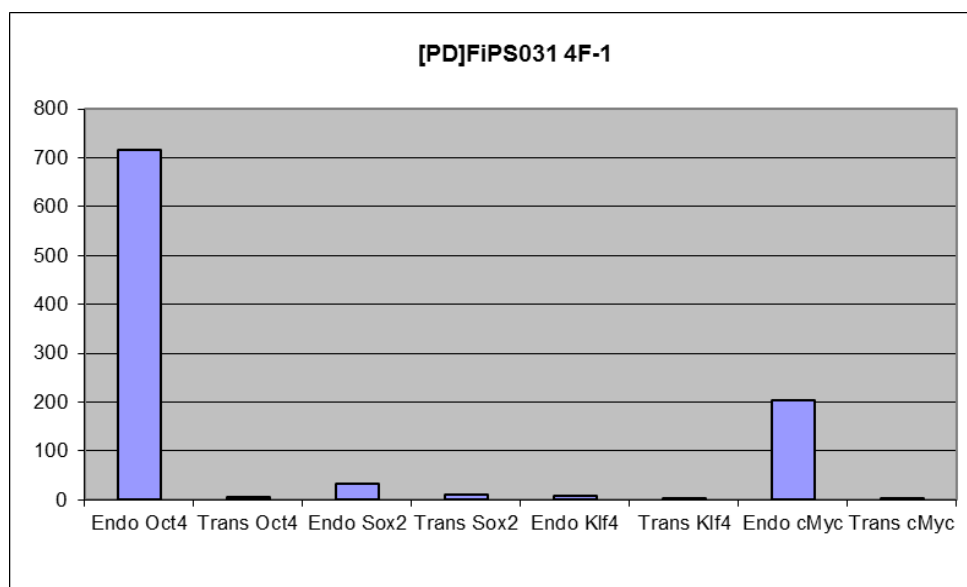
El estudio se ha realizado mediante el genotipado de marcadores STR (también conocidos como microsatélites: TH01, D21S11, D5S828, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, vWA y TPOX). La combinación de los nueve marcadores utilizados produce un perfil de alelos con una probabilidad de coincidencia por azar de  $1 \text{ en } 2,9 \times 10^9$ . Se usa además un marcador para identificar el sexo de la muestra (AMEL).

## **Anexo 6**

### **Estudio integración y de silenciamiento**



Análisis gPCR mostrando las integraciones genómicas de los 4 genes utilizados Oct-4, Sox-2, Klf4 y c-myc) para generar la línea [PD]031 FiPS-4F-1



Silenciamiento de los transgenes de reprogramación. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de los niveles de expresión de los transgenes indicados. Se muestra expresión relativa a GAPDH.

## **Anexo 7**

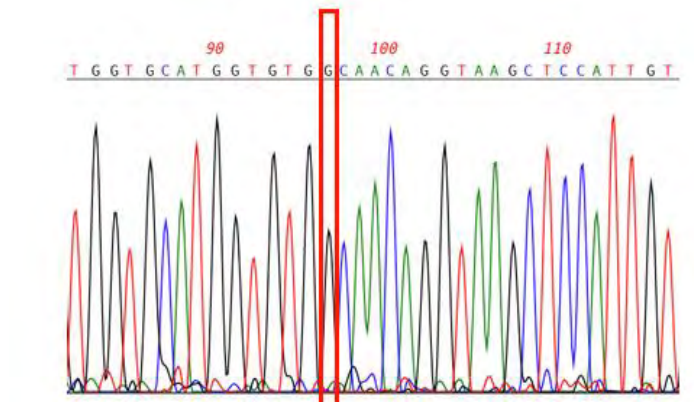
### **Genotipación de la línea**

## A53T mutation in PD

FFF 031 FiPS 4F#1

WT exon 3 for SNCA:

AGATTGAGATTTTAAATTAGTTGTATTGAAACTAGCTAATCAGCAATTTAAGGCT  
AGCTTGAGACTTATGTCTTGAATTTGTTTTGTAGGCTCCAAAACCAAGGAGGGAGT  
GGTGCATGGTGTGCAACAGGTAAGCTCATTGTGCTTATATCCAAAGATGATATT  
TAAAGTATCTAGTGAT

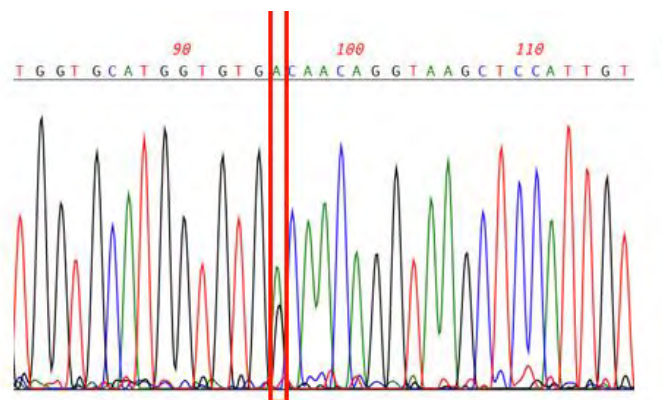


Samples:

Sequencing result iPS\_031:

TGAATAGGCCTATGGCAATTTAAGGCTAGCTTGAGACTTATGTCTTGAATTTGTTTT  
TGTAGGCTCCAAAACCAAGGAGGGAGTGGTGCATGGTGTGCAACAGGTAAGCTCC  
ATTGTGCTTATATCCAAAGATGATATTTAAAGTATCTAGTGATA

Mutation detected in heterozygosis:



## **Anexo 8**

### **Test de mycoplasma**

## MYCOPLASMA TEST

3



1. [PD] FiPS031-4F-1
2. CT -
3. CT +