

**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:** 28/12/2020

**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*
- Número de registro del proyecto** CEIC 2014/405; Comisión de Garantías para la Donación y utilización de células y tejidos humanos 335 282

**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> <i>Name of the iPS line:</i>	N1-FiPS4F#7
<b>Nº de registro en el Human Pluripotent Stem Cell Registry (1)</b>	
<b>Muestra original donada. Detallar tipo de célula, tejido de origen y localización anatómica de la muestra biológica de la que se obtiene la línea original. Si son células comerciales, detallar nombre, referencia y distribuidor comercial</b> <i>Original sample donated. Detail cell type, tissue of origin and anatomic location of the biological sample from which the original line is obtained. If cells are commercial, detail name, reference and trade distributor.</i>	Muestra original donada: biopsia de piel Tipo celular, tejido y localización: Fibroblastos dermales primarios  Original sample donated: Skin biopsy Cell type, tissue and location: Primary dermal fibroblasts
<b>Sexo y edad del donante.</b> <i>Sex and age of the donor</i>	Mujer 44 Woman 44
<b>¿El donante tiene alguna patología?</b> <i>Has the donor any pathological condition?</i>	<b>NO</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>SÍ</b> <input type="checkbox"/> (especificar) No                              Yes (specify)
<b>¿La patología es de origen genético?</b> <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	<b>NO</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>SÍ</b> <input type="checkbox"/> (especificar) No                              Yes (specify)

<b>Muestra biológica recibida</b> <i>Biological sample</i>	<b>Fresco</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>Crioconservado</b> <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i>
<b>Fecha de la donación de la muestra biológica</b> <i>Date of donation of the biological sample</i> 01/12/2015	<b>Fecha del uso o descongelación</b> ( <i>si congelado</i> ) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 01/12/2015
<b>Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario).</b> <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	Cultivo primario de fibroblastos aislados a partir de biopsia de piel de 3 mm de diámetro empleando la técnica de cultivo por explantes. Las biopsias de piel fueron procesadas inmediatamente después de su obtención. Las células aisladas se cultivaron en medio Dubelcco's Modified Eagles' Medium (DMEM, Lonza) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco) y 5% de penicilina/estreptomicina (Gibco) Primary fibroblasts culture, which were isolated from 3mm skin biopsies by using the explant culture technique. Skin biopsies were processed immediately after obtaining. Isolated cells were cultured in Dubelcco's Modified Eagle's medium (DMEM, Lonza), supplemented with 10% foetal bovine serum (Gibco) and 5% penicilin/estreptomycin (Gibco).
<b>Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de las células de origen</b> <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the original cells.</i>	Sí. Combinación de 10 STRs analizados de manera habitual a la hora de estudiar la huella genética.  Yes. Combination of 10 STRs usually analysed when studying genetic fingerprint.
<b>¿Hay disponibilidad de viales congelados de las células de origen? ¿En qué pase?</b> <i>Is there availability of frozen vials of original cells? At what passage?</i>	Sí, en pase 2, 3 y 5.  Yes, passages 2, 3 and 5.
<b>Método utilizado en la generación de la línea iPSc. (Integrativa/ No-integrativa) Especificar factores y plásmidos de reprogramación utilizados.</b> <i>Method used for the generation of iPSC line (Integrative / Non-integrative) Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>	Reprogramación no integrativa utilizando vectores derivados del virus Sendai (Cytotune-iPS Sendai reprogramming Kit, Gibco-ThermoFisher Scientific). Se utilizaron cuatro vectores portadores de los factores Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc respectivamente, los cuales se añadieron a las células en proporción 1:1:1:1, siguiendo las instrucciones del fabricante.  Non-integrating reprogramming with Sendai virus-derived vectors (Cytotune-iPS Sendai reprogramming Kit, Gibco-ThermoFisher Scientific). Four vectors carrying the factors Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc respectively were employed. Vectors were added to the cells in proportion 1:1:1:1, according to manufacturer's instructions.
<b>Condiciones de cultivo de la línea de iPSc generada. (si se describen en publicación, indicar referencia)</b> <i>iPS Culture conditions (if they are described in a publication, please indicate the reference)</i>	Las células iPS se cultivaron en placas adherentes de 6 pocillos (Corning) sobre células feeder (línea celular HFF-1 de ATCC irradiada a 75 Gy en un acelerador lineal Varian Unique), en medio de cultivo compuesto por 80% de DMEM-Knockout sin L-glutamina, 20% de suero knockout (knockout serum replacement), 1% de aminoácidos no esenciales (non-essential aminoacids, MEM-NEAA), 1% de GlutaMAX™ 100X, 1% de penicilina/estreptomicina, β-mercaptoetanol al 0,1mM y 100 µg/ml de factor de crecimiento fibroblástico (basic fibroblast growth factor, bFGF) (todo de Gibco). Todas las placas se prepararon con un coating de Matrigel® (Corning) previamente a la siembra de las células feeder. Los cambios de medio se realizaron diariamente. Las colonias de iPS se expandieron manualmente con ayuda de una micropipeta "stripper" (Origio MidAtlantic Devices) y sus puntas de capilar de 175 µm (Gynetics) mientras se visualizaban en un monitor de control digital Sight DS-L3 (Nikon) conectado a un estereomicroscopio SMZ-745T equipado con una cámara de fotomicrografía DS-FI2 (Nikon). La adaptación de las iPS al cultivo libre de feeders se realizó transfiriendo las colonias manualmente a placas de cultivo de 6 pocillos preparadas con un coating de laminina-521 (ThermoFisher Scientific) y medio de

	<p>cultivo StemFlex (ThermoFisher Scientific).</p> <p>iPS cells were cultured in adherent 6-well culture dishes (Corning) onto feeder cells (75 Gy-irradiated HFF-1 cell line from ATCC). Culture medium was composed by 80% DMEM Knockout without L-glutamine, 20% knockout serum replacement, 1% non-essential aminoacids, 1% GlutaMAX™ 100X, 1% Penicilin/Streptomycin, 0.1mM β-mercaptoethanol and 100 µg/ml basic fibroblast growth factor (all from Gibco). Culture dishes were coated with Matrigel® (Corning) before seeding feeder cells. Medium was changed daily. iPS cell-colonies were picked manually with a "stripper" micropipet (Origio MedAtlanticDevices) and its 175 µm tips (Gynetics), while visualized in a Sight DS-L3 digital control monitor (Nikon) coupled to a SMZ-745T stereomicroscope equipped with a DS-FI2 camera (Nikon). Feeder-free culture adaptation was performed manually tranfering iPS cells to 6 well laminin-521-coated culture dishes and StemFlex culture medium (ThermoFisher Scientific).</p>
<p><b>Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo (forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma; otros)</b>  <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></p>	<p>Las células iPS generadas presentan características morfológicas típicas de células madre embrionarias (colonias compactas y redondeadas, bordes definidos, elevada relación núcleo/citoplasma y nucleolos prominentes).</p> <p>The generated iPS cells present a typical embryonic stem cell colony morphology (compact and rounded colonies, defined borders, high ratio nucleus/cytoplasm and prominent nucleoli).</p>
<p><b>Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación)</b>  <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i></p>	<p>Congelación: Células criopreservadas en medio de congelación compuesto por 90% de suero bovino fetal y 10% de DMSO. Las colonias se cortan en pequeños fragmentos con ayuda de micropipeta "stripper", se recoge la suspensión celular y se centrifuga a 200 xg durante 5 min. Se retira el sobrenadante y el pellet se resuspende en 0,5 ml de medio de congelación a 4°C. El criovial se introduce en un contenedor de congelación (CoolCell) y se almacena a -80°C durante 24 horas y posteriormente se almacenan en un tanque de nitrógeno líquido.</p> <p>Descongelación: Los viales se retiran del tanque de nitrógeno líquido y se introducen en un baño de agua a 37°C hasta que el contenido se ha descongelado casi por completo. El contenido del criovial se resuspende en el medio de cultivo de células iPS descrito anteriormente y se centrifuga a 200 xg 3-5 min. El pellet celular se resuspende en 2 ml de medio de iPS suplementado con 10µM de Rock-Inhibitor Y27632 (ReproCell) y se siembra en las placas de cultivo.</p> <p>Freezing: Cells are cryopreserved in freezing medium composed by 90% foetal bovine serum and 10% DMSO. Colonies are cut in small pieces with a "stripper" micropipet. Cell suspension is collected and centrifuged at 200 xg for 5 min. Pelleted cells are resuspended in 0.5 ml of freezing medium at 4°C. Then, cryovials are introduced in a cooler container (CoolCell) and stored at -80°C for 24 hours and then transfered to a liquid nitrogen tank.</p> <p>Thawing: Cryovials are removed from liquid nitrogen and immersed in a 37°C water bath until only a small piece of frozen material remains. Cryovial contents is resuspended in the iPS culture medium described above and centrifuged at 200 xg for 3-5 min. Pelleted cells are then resuspended in 2 ml of iPS culture medium supplemented with 10µM Y-27632 Rock-Inhibitor (ReproCell) and plated into culture dishes.</p>
<p><b>Pase de la línea celular en el momento del banqueo/registro. (Máximo: Pase 15)</b>  <i>Passage at the time of the banking/registration (Max: Passage 15)</i></p>	<p>Sí, 1 vial en pase 12 y otro en pase 13</p> <p>Yes, 1 vial at passage 12 and another passage 13.</p>

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

## 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*

<p><b>Test de pluripotencia</b> <i>Pluripotency test</i></p>	<p><b>Método</b> <i>Method</i></p>		<p><b>Nº pase</b> <i>Passage n.</i></p>	<p><b>Resultado</b> <i>Results</i></p>	<p><b>Comentarios</b> <i>Comments</i></p>	
	Oct 4		RNA/protein	23/22	+	Annex 1
	Nanog		RNA/protein	23/25	+	Annex 1
	Sox 2		RNA/protein	23/22	+	Annex 1
	SSEA3		Protein	22	+	Annex 1
	SSEA4		Protein	22	+	Annex 1
	TRA-1-60		Protein	22	+	Annex 1
	TRA-1-81		Protein	25	+	Annex 1
	Fosfatasa. Alk		Protein	8	+	Annex 1
<p><b>Test de diferenciación in vitro</b> <i>In vitro differentiation test</i></p>	<p><b>Comentarios</b></p>	<p><b>Método</b> <i>Method</i></p>	<p><b>Marcador</b> <i>Marker</i></p>	<p><b>Nº pase</b> <i>Passage n</i></p>	<p><b>Resultado</b> <i>Results</i></p>	<p><i>Comments</i></p>
	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	Protein	TUJ1	63	+	Annex 2
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Protein	SMA	63	+	Annex 2
	Endoderm <i>Endoderm</i>	Protein	AFP	63	+	Annex 2
<p><b>Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i></b> <i>(espontánea/inducida)</i></p> <p><i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i></p>	<p>Formación inducida de cuerpos embrionarios o EBs mediante la técnica de "hanging drop" o gota colgante. Los EBs formados se recogieron y se sembraron en pocillos independientes de chamber-slides de 8 pocillos y se estimuló la diferenciación hacia cada una de las capas embrionarias utilizando medios de cultivo específicos durante tres semanas. Los medios de cultivo empleados fueron descritos previamente por Galera et al. Stem Cell Research 16 (2016) 63–66.</p> <p>Embryoid bodies (EBs) formation was induced by using the hanging drop technique. Formed EBs were independently transferred to 8 well-chamber slides and cultured in specific culture media for 3 weeks in order to stimulate their differentiation towards the three germ layers. Specific culture media were previously described by Galera et al. Stem Cell Research 16 (2016) 63-66.</p>					

<p><b>Test de diferenciación in vivo</b> <i>In vivo differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th><b>Método</b> <i>Method</i></th> <th><b>Marcador</b> <i>Marker</i></th> <th><b>Nº pase</b> <i>Passage n</i></th> <th><b>Resultado</b> <i>Results</i></th> <th><b>Comentarios</b> <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i></td> <td colspan="5">Not performed</td> </tr> <tr> <td><b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i></td> <td colspan="5">Not performed</td> </tr> <tr> <td><b>Endodermo</b> <i>Endoderm</i></td> <td colspan="5">Not performed</td> </tr> </tbody> </table>		<b>Método</b> <i>Method</i>	<b>Marcador</b> <i>Marker</i>	<b>Nº pase</b> <i>Passage n</i>	<b>Resultado</b> <i>Results</i>	<b>Comentarios</b> <i>Comments</i>	<b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i>	Not performed					<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>	Not performed					<b>Endodermo</b> <i>Endoderm</i>	Not performed				
	<b>Método</b> <i>Method</i>	<b>Marcador</b> <i>Marker</i>	<b>Nº pase</b> <i>Passage n</i>	<b>Resultado</b> <i>Results</i>	<b>Comentarios</b> <i>Comments</i>																				
<b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i>	Not performed																								
<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>	Not performed																								
<b>Endodermo</b> <i>Endoderm</i>	Not performed																								
<p><b>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i></b> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i></p>	<p>N/A</p>																								
<p><b>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica en el pase de banqueo)</b> <i>Karyotype (Specify karyotype formula in the passage in which it is banked)</i></p>	<p>Pase 22. 46, XX. Cariotipo normal observado mediante la técnica de bandeo G (Anexo 3). Passage 22. 46, XX. Normal Karyotype observed by G banding (Annex 3).</p>																								
<p><b>Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de la línea celular</b> <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the cell line</i></p>	<p>Se ha llevado a cabo análisis de la huella genética por análisis de microsatélites/STR. Se confirmó identidad (Anexo 4), The cell identity was confirmed by DNA fingerprinting assay (Annex 4).</p>																								
<p><b>Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular)</b> <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i></p>	<p>Los genes no se integran porque se ha utilizado una metodología NO integrative (virus Sendai). Genes do not integrate. A non-integrative methodology that involves the use of Sendai virus derived vectors has been used.</p>																								

<p><b>Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular)</b>  <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i></p>	<p>Se confirmó mediante qRT-PCR la eliminación de los vectores y factores de reprogramación exógenos (Anexo 5).</p> <p>The clearance of the vectors and the exogenous reprogramming factor genes was confirmed by qRT-PCR (Annex 5).</p>
<p><b>Confirmación del diagnóstico genotípico en las iPSC generadas a partir de muestras con mutación genética</b>  <i>Confirmation of genotypic diagnosis of the cell line generated from samples with genetic mutation</i></p>	<p>N/A</p>
<p><b>Test de micoplasma</b>  <b><i>Mycoplasma Test</i></b></p>	<p>Se comprobó que las células iPS estaban libres de micoplasma mediante amplificación por PCR y electroforesis en gel de agarosa (Anexo 6).</p> <p>Absence of mycoplasma contamination was checked by PCR and electrophoresis in agarose gel (Annex 6).</p>

### SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

*Section 3 Applicant Details*

<p><b>Investigador Principal:</b>  <i>Principal Investigator:</i>          Silvia María Díaz Prado</p>	<p><b>Dirección Postal:</b>  <i>Postal address:</i>          Edificio Anexo Hospital Teresa Herrera. As Xubias 84,          15006 A Coruña</p>
<p><b>Centro de Trabajo:</b>  <i>Institution:</i>          Universidad de A Coruña          Instituto Investigación Biomédica A Coruña - INIBIC.          Área Sanitaria A Coruña y Cee</p>	<p><b>Teléfono (phone):</b> 981 176 399/ 698 171 661</p> <p><b>Fax:</b> 981 176 398</p> <p><b>E-mail:</b> silvia.ma.diaz.prado@sergas.es          s.diaz1@udc.es</p>

## **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

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>  José Manuel Flores Arias.   <p style="text-align: right;">Fecha/ Date:</p> 28/12/2020	<b>Firma del Investigador Principal</b> <i>Signature of the Principal Investigator</i>  SILVIA MARÍA DÍAZ PRADO   <p style="text-align: right;">Fecha /Date</p> 28/12/2020
<b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b> <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> José Manuel Flores Arias. Gerente del Servicio Gallego de Salud.	
<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal Address:</i>  Gerencia Servicio Gallego de Salud Edificio Administrativo de San Lázaro s/n 15703 Santiago de Compostela	<b>Teléfono /Telephone:</b> 881 542813  <b>Fax:</b>  <b>E-mail:</b> Xerencia.Sergas@sergas.es

### (1) Instrucciones para la realización del registro de líneas hESC y hiPSC generadas en España en el Human Pluripotent Stem Cell Registry

Entre en la página web: <https://hpscereg.eu/>

Cree su perfil rellenando el formulario on-line Sign up form. Después de hacer click en Sign up, recibirá el mensaje de confirmación de los datos y se le enviará el correo electrónico de confirmación.

Registro de líneas:

- Register Cell Line> Create a standard cell line name> Generator Institution: Assign an existing institution: Introducir: Spanish Stem Cell Bank
- hPSCreg Team <hpscereg-info@charite.de> le confirmará la asignación de Spanish Stem Cell Bank a su perfil por correo electrónico. En este momento su estado en Dashboard (My institutions) de Applicant cambiará a Registrant para esta institución.
- Volver a Generator Institution> seleccionar en el desplegable Spanish Stem Cell Bank.
- El nombre provisional (Provisional name) debe de empezar por ES.
- En Alternative names introduzca el nombre de la línea con el que se deposita en el BNLC, según las indicaciones:
- [http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-el-instituto/fd-organizacion/fd-estructura-directiva/fd-subdireccion-general-investigacion-terapia-celular-medicina-regenerativa/fd-centros-unidades/fd-banco-nacional-lineas-celulares/Nomenclatura\\_iPS\\_BNLC\\_2015.pdf](http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-el-instituto/fd-organizacion/fd-estructura-directiva/fd-subdireccion-general-investigacion-terapia-celular-medicina-regenerativa/fd-centros-unidades/fd-banco-nacional-lineas-celulares/Nomenclatura_iPS_BNLC_2015.pdf)