



ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR **LS PBiPS-I86-Sv4F-8** EN EL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES

ANEXOS

Anexo 1: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

Anexo 2: Diferenciación *in vitro*

Anexo 3: Cariotipo

Anexo 4: Resultados microsatélites

Anexo 5: Ausencia de los transgenes de reprogramación

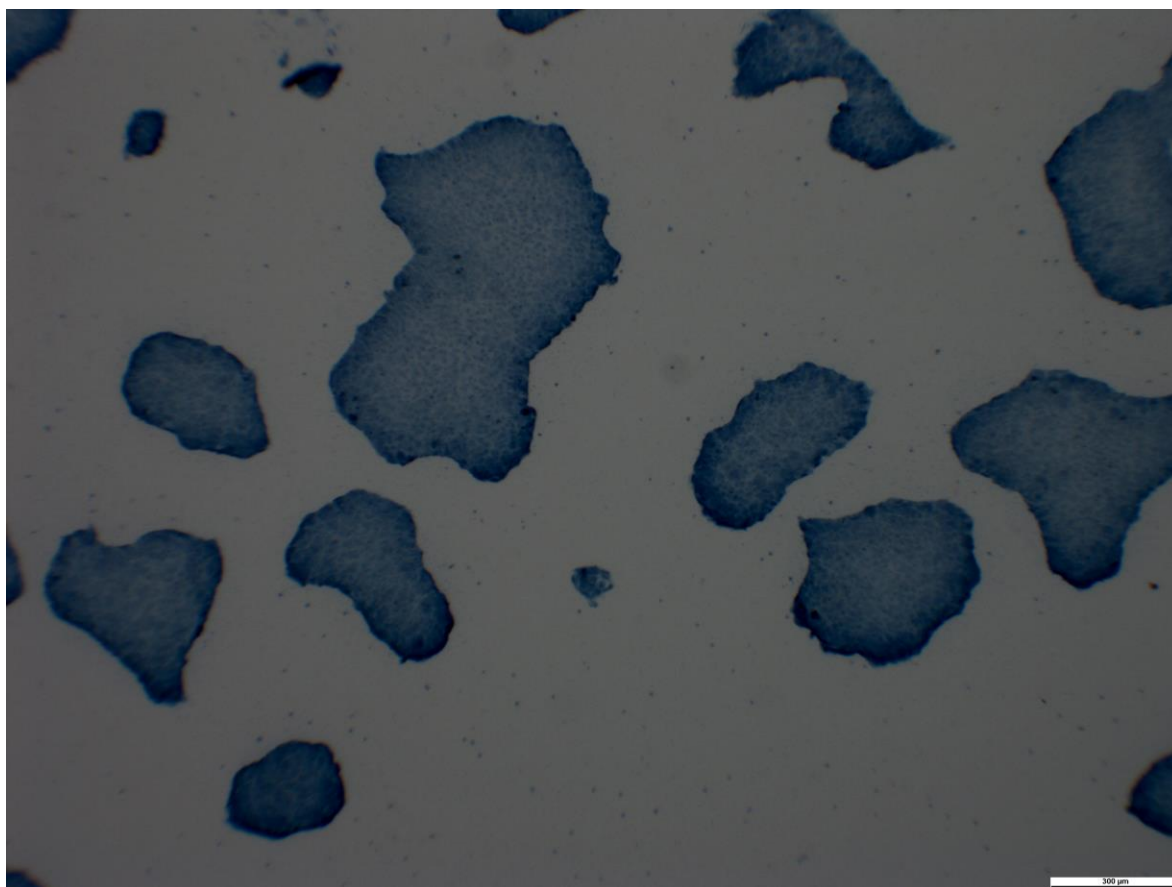
Anexo 6: Comprobación de la presencia de la epimetilación

Anexo 7: Resultado test de micoplasma

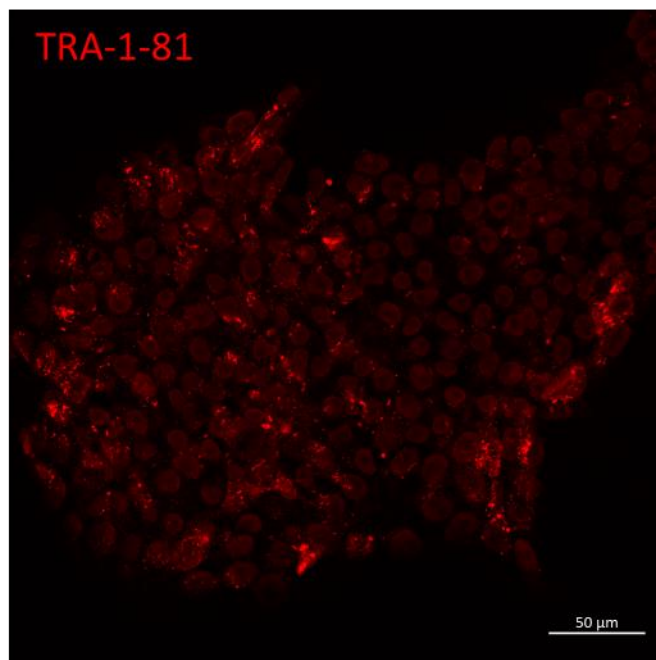
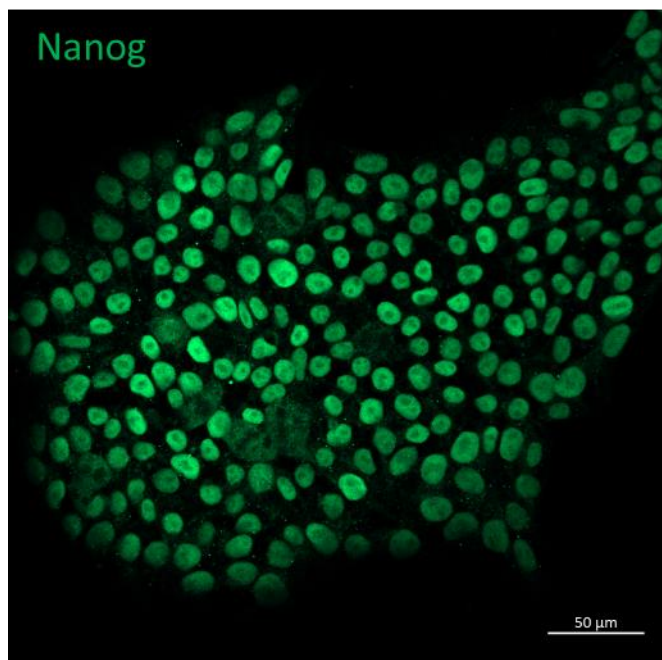


Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

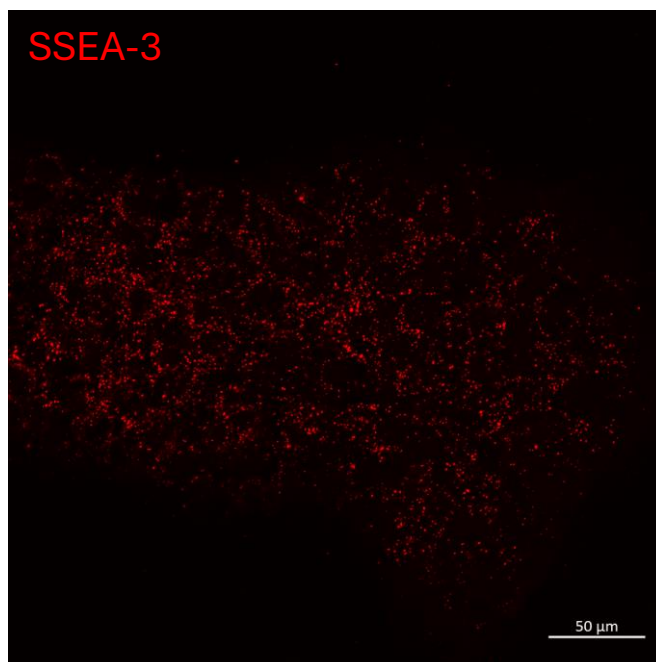
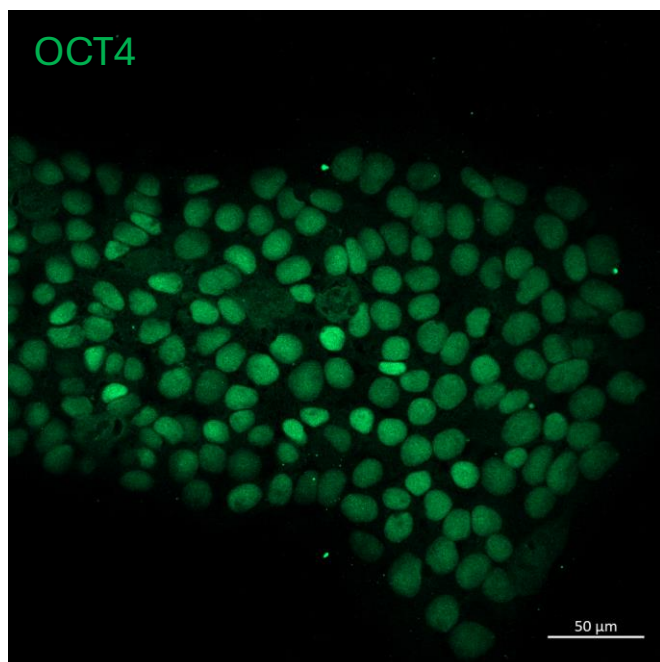


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



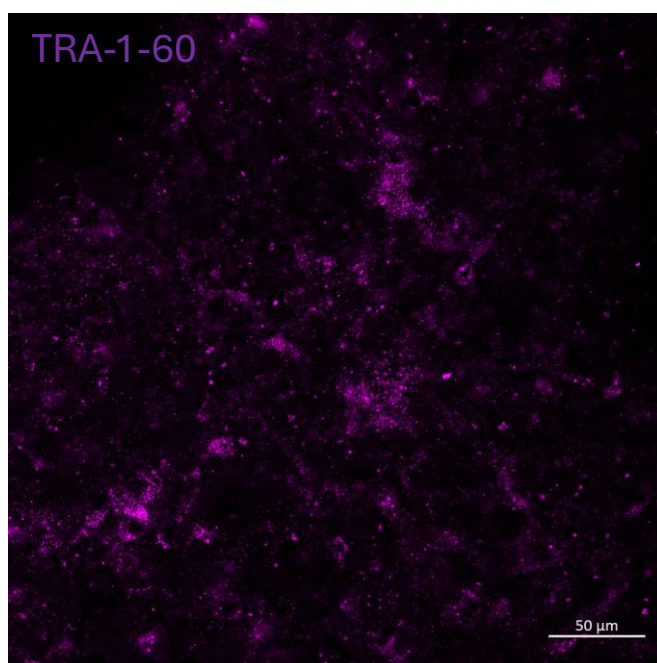
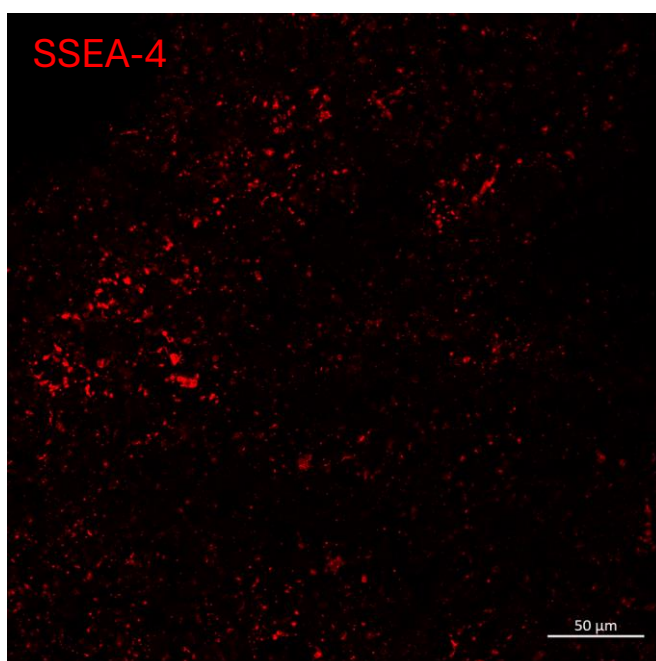
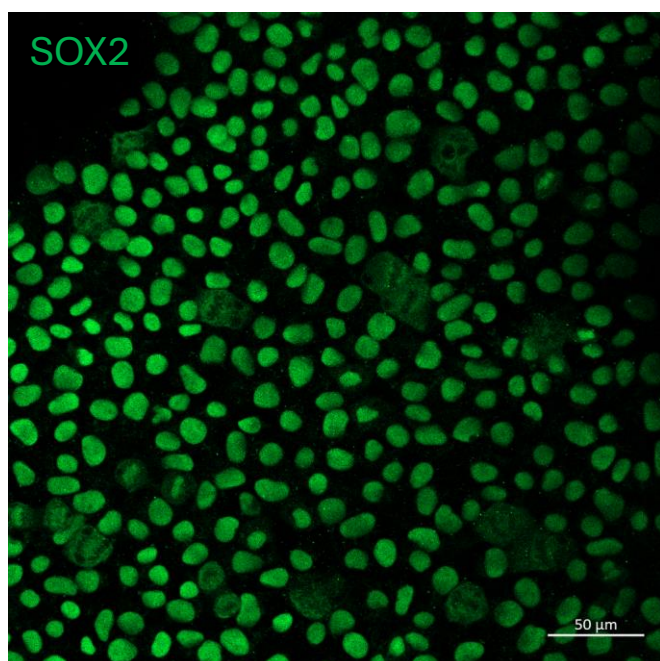
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3



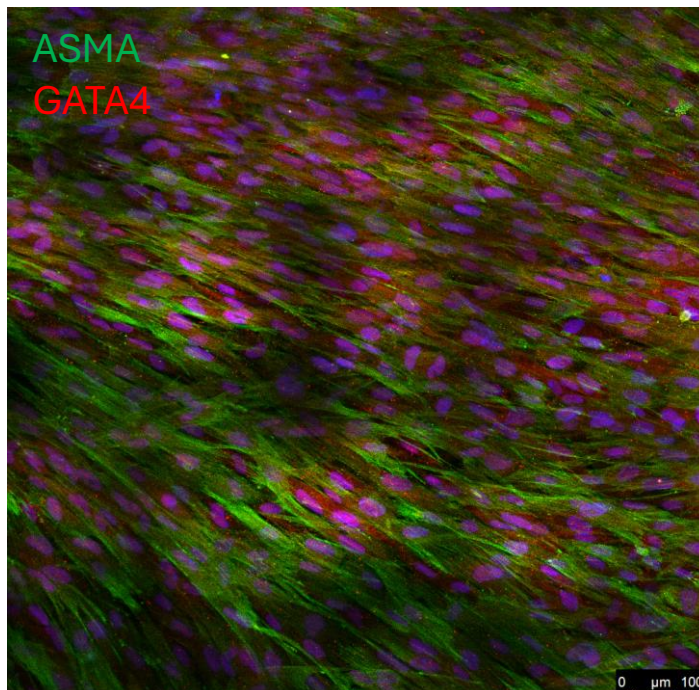
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

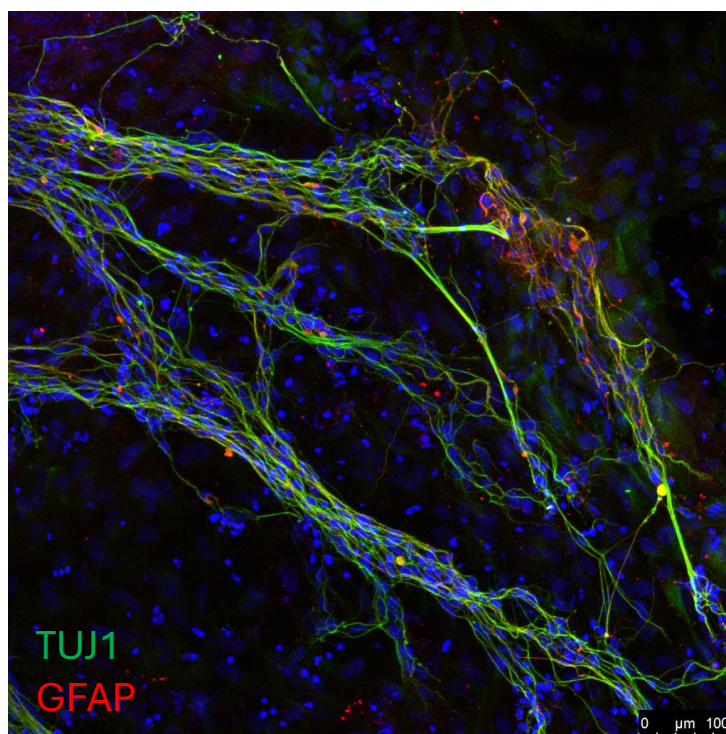


Anexo 2

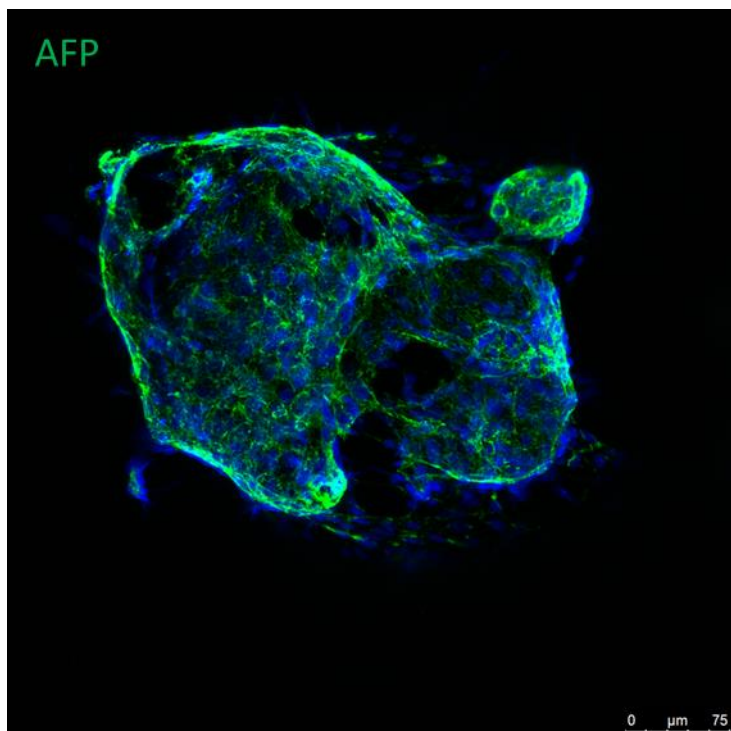
Diferenciación *in vitro*



Diferenciación *in vitro* a mesodermo: Células positivas para **ASMA y GATA4**



Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para **Tuj1 y GFAP**



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



Anexo 3

Cariotipo

CYTOGENETICS STUDY

Case name: 42060726

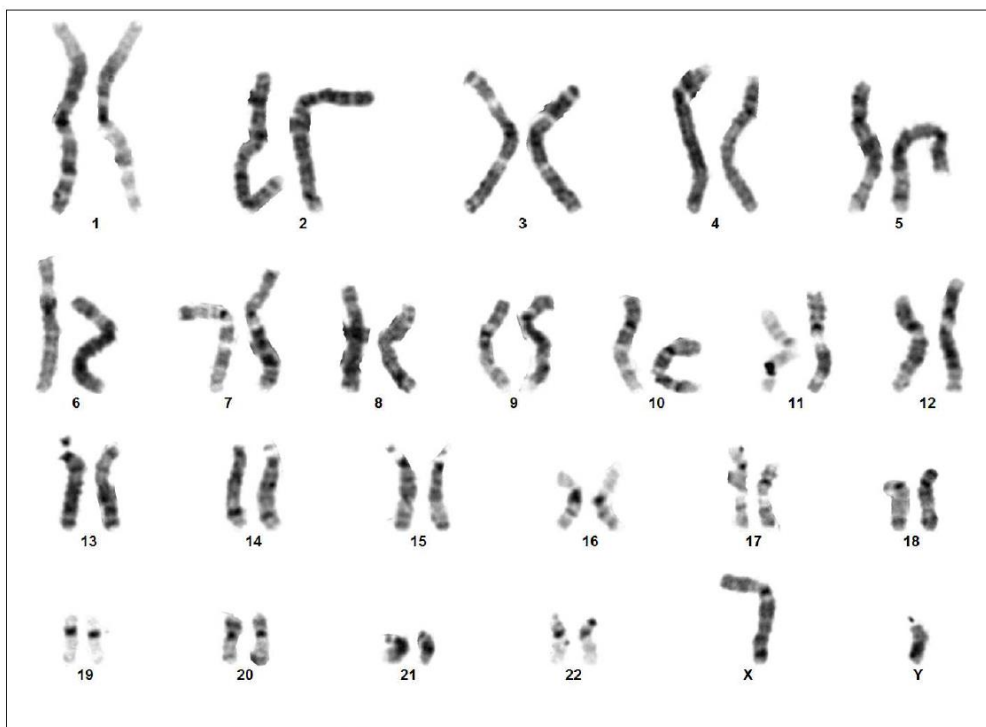
Name: LS PBiPS-I86-99-Sv4F-8 p14

NHC: CT0863

Department: IDIBELL

Date: 8/22/2024

Sample: CM



Case: 42060726 Slide: 2 Cell: 4F

Result: 46,XY



Anexo 4

Resultado microsatélites

ESTUDI DE MICROSATÈL·LITS (STRs)

Mostra:	Identificació	ID Ambar	Tipus de mostra
LS PBIPS-I-86_SV4F-8 P15		1335138	Extracte DNA

Descripció de l'estudi

L'estudi de consisteix en l'anàlisi de microsatèl·lits o "short tandem repeats" (STR) de DNA procedent determinades línies cel·lulars. El procediment seguit ha estat el següent:

- . PCR - Amplificació de 15 regions de DNA (STR- short tandem repeats) amb els Kit de Genotipat AmpFLSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit. La combinació d'aquestes 15 regions constitueix el perfil genètic (impressió digital genètica)
- . Electroforesi capil·lar – Lectura del perfil genètic de la mostra.
- . Software d'anàlisi – Assignació del perfil genètic.

Resultats

Marcadors Genètics	Localització cromosòmica	Al·lels mostra	
		1335138	
D8S1179	8	12	14
D21S11	21q11.2-q21	27	29
D7S820	7q11.21-22	8	10
CSF1PO	5q33.3-34	11	11
D3S1358	3p	15	17
TH01	11p15.5	6	8
D13S317	13q22-31	11	14
D16S539	16q24-qter	9	13
D2S1338	2q35-37.1	17	25
D19S433	19q12-13.1	12	13
VWA	12p12-pter	16	16
TPOX	2p23-2per	8	10
D18S51	18q21.3	17	22
D5S818	5q21-31	12	12
FGA	4q28	20	23
AMELOGENINA*	X: p22.1-22.3- Y: p11.2	X	Y

*Amelogenina: Resultat al·lel relatiu al sexe cromosòmic: XX (sexe femení); XY (sexe masculí)

L'Hospitalet del Llobregat, 05/11/2024



Dr. J.V.Martinez Mas
Director de Laboratorio

ESTUDI DE MICROSATÈL·LITS (STRs)

Mostra:	Identificació	ID Ambar	Tipus de mostra
	PERIPHERAL BLOOD, F-0050-99 / I-0086-99	1335113	Extracte DNA

Descripció de l'estudi

L'estudi de consisteix en l'anàlisi de microsatèl·lits o "short tandem repeats" (STR) de DNA procedent determinades línies cel·lulars. El procediment seguit ha estat el següent:

- . PCR - Amplificació de 15 regions de DNA (STR- short tandem repeats) amb els Kit de Genotipat AmpFLSTR® Identifier® Plus PCR Amplification Kit. La combinació d'aquestes 15 regions constitueix el perfil genètic (impressió digital genètica)
- . Electroforesi capil·lar – Lectura del perfil genètic de la mostra.
- . Software d'anàlisi – Assignació del perfil genètic.

Resultats

Marcadors Genètics	Localització cromosòmica	Al·lels mostra 1335113	
D8S1179	8	12	14
D21S11	21q11.2-q21	27	29
D7S820	7q11.21-22	8	10
CSF1PO	5q33.3-34	11	11
D3S1358	3p	15	17
TH01	11p15.5	6	8
D13S317	13q22-31	11	14
D16S539	16q24-qter	9	13
D2S1338	2q35-37.1	17	25
D19S433	19q12-13.1	12	13
VWA	12p12-pter	16	16
TPOX	2p23-2per	8	10
D18S51	18q21.3	17	22
D5S818	5q21-31	12	12
FGA	4q28	20	23
AMELOGENINA*	X: p22.1-22.3- Y: p11.2	X	Y

*Amelogenina: Resultat al·lel relatiu al sexe cromosòmic: XX (sexe femení); XY (sexe masculí)

L'Hospitalet del Llobregat, 09/05/2024



Dr. J.V.Martinez Mas
Director de Laboratorio

Análisis de microsatélites en la línea de iPSC y en las células de sangre periférica de las que procede.

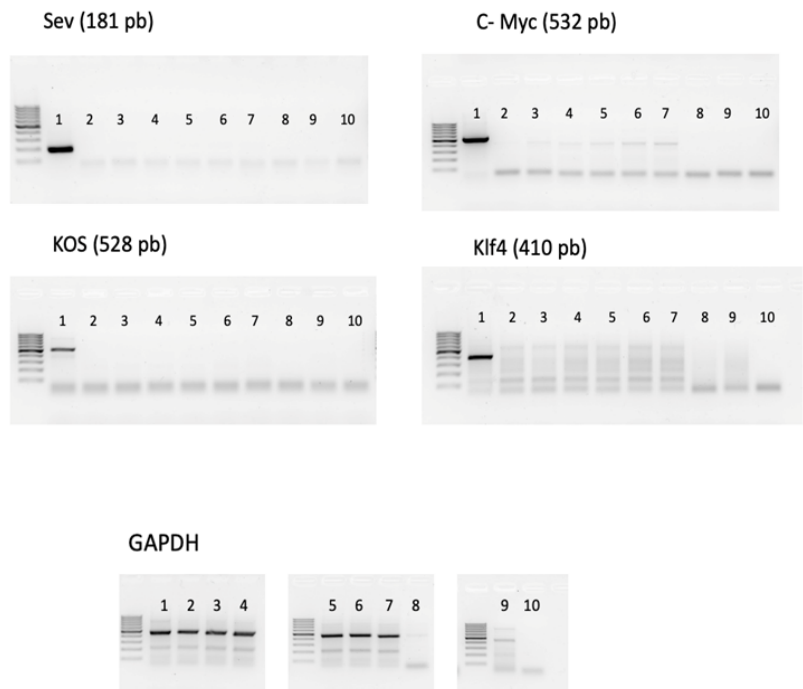
Anexo 5

Ausencia de los transgenes de reprogramación

RT-PCR SENDAI 2.0

08/07/2024

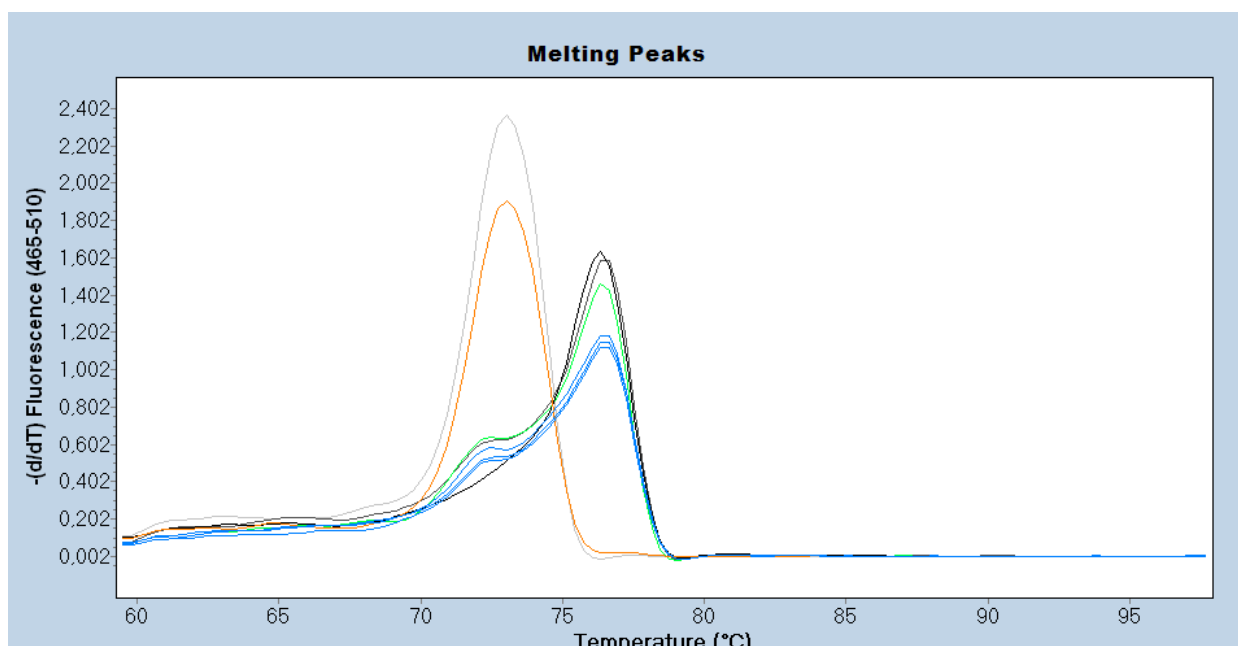
1. POSITIVE CONTROL
2. ATTR-CM PBiPS4 Sv4F-13, p9
3. LS PBiPS-I-86 Sv4F-1, p13
4. LS PBiPS-I-86 Sv4F-8, p12
5. LS PBiPS-I-86 Sv4F-12, p12
6. LS PBiPS-I-86 Sv4F-14, p11
7. LS PBiPS-I-86 Sv4F-17, p11
8. Sample NO RT
9. NEGATIVE CONTROL
10. H₂O



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

Anexo 6

Comprobación de la presencia de la epimetilación



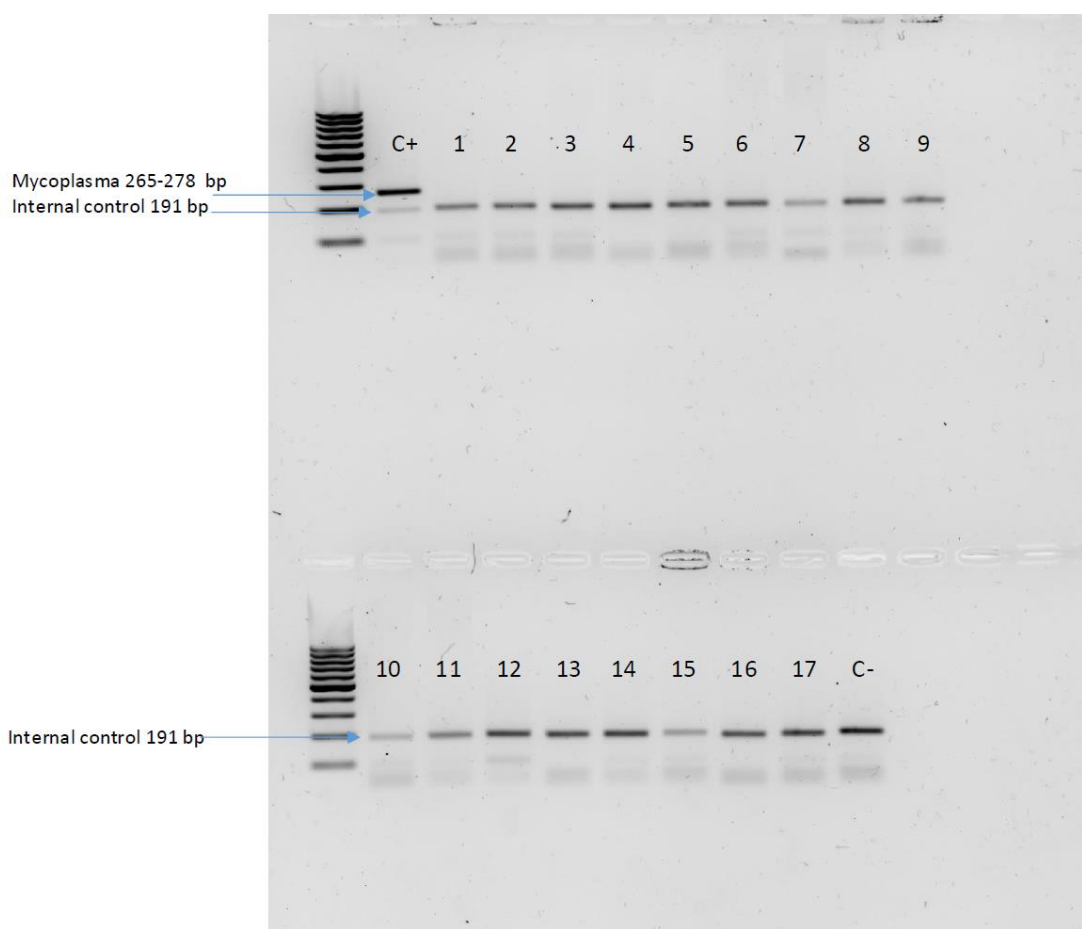
Niveles de metilación en el promotor de MLH1 en la línea LS PBiPS-I86-Sv4F-8 analizados mediante real-time MS-MCA tras tratar el DNA con bisulfito. La temperatura de fusión de los productos de PCR se analizó tras la amplificación. Los productos no metilados se disocian a una temperatura menor (pico de la izquierda) mientras que los productos metilados se disocian a una mayor temperatura (pico de la derecha). Se incluyen estándares de metilación (100%, 50% y 0%) preparados como diluciones seriadas de DNA hipermetilado bialélicamente procedente de células RKO con DNA no metilado procedente de linfocitos no portadores de la metilación para la cuantificación aproximada de los niveles de metilación. Se incluyen además un control positivo (verde, linfocitos con 50% metilación) y un control negativo (naranja, linfocitos no portadores de metilación). Estos resultados confirman los niveles descritos previamente en el paciente (PMID 30283143).



Anexo 7

Resultado test de micoplasma

Mycoplasma test (VenorGeM Classic kit) 02/10/2024



5. LS PBiPS-I-86-Sv4F-8 p14