

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR **OCD FiPS 2-Ep6F-10 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

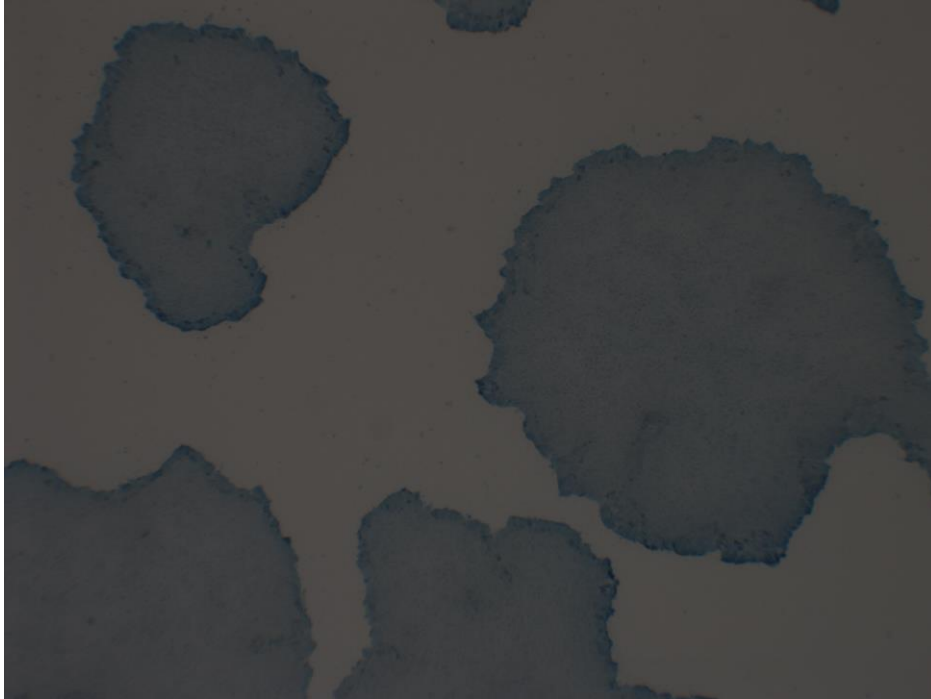
Anexo 5: Resultados microsatélites

Anexo 6: Ausencia de los transgenes de reprogramación

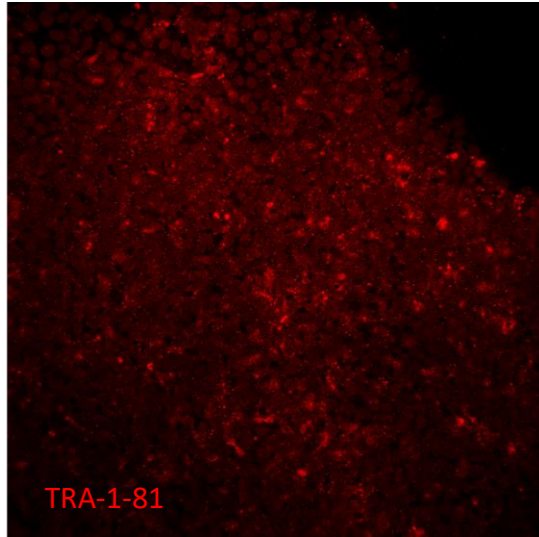
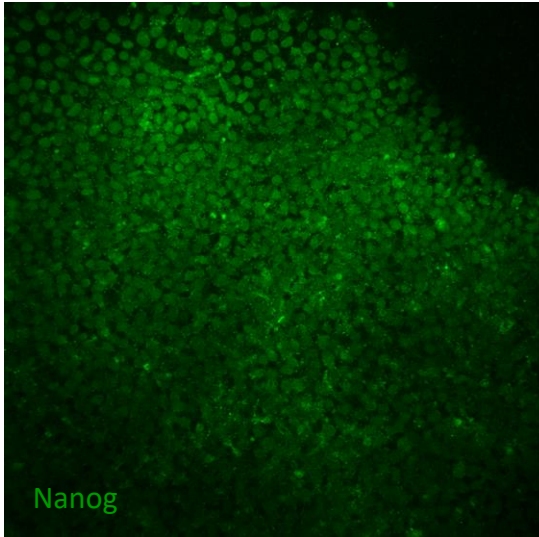
Anexo 7: Resultado test de micoplasma

Anexo 1

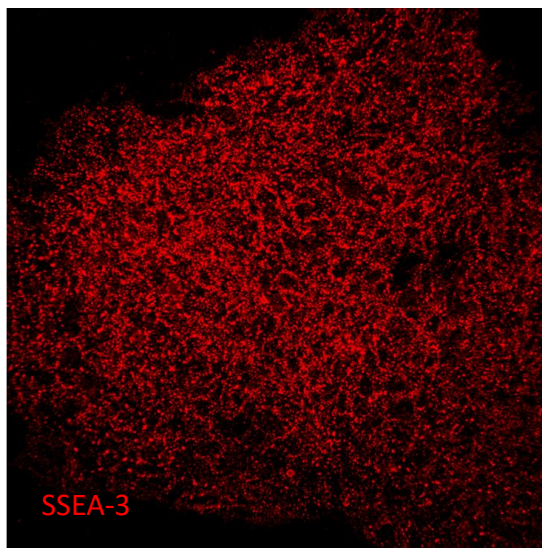
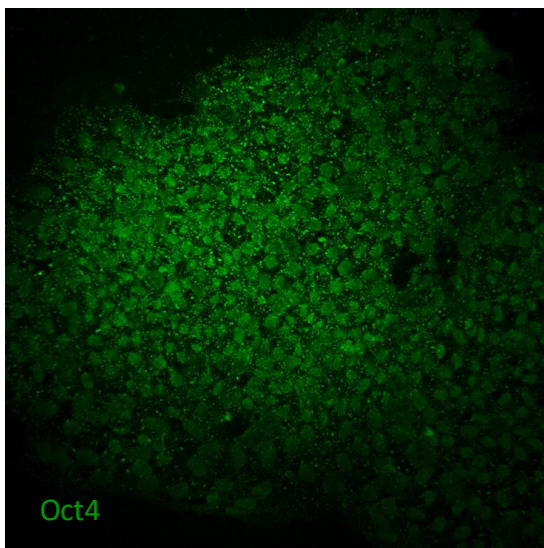
Fenotipo. Marcadores de pluripotencia



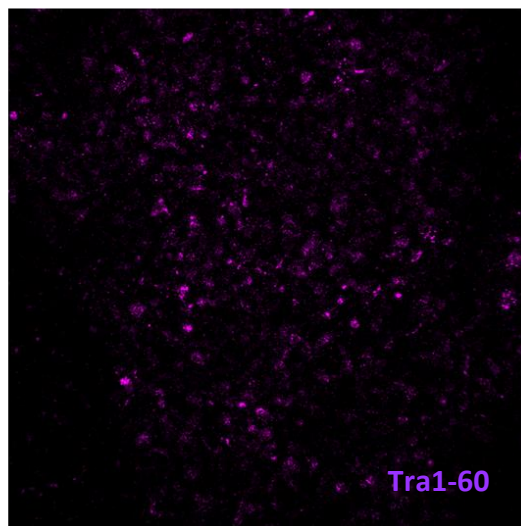
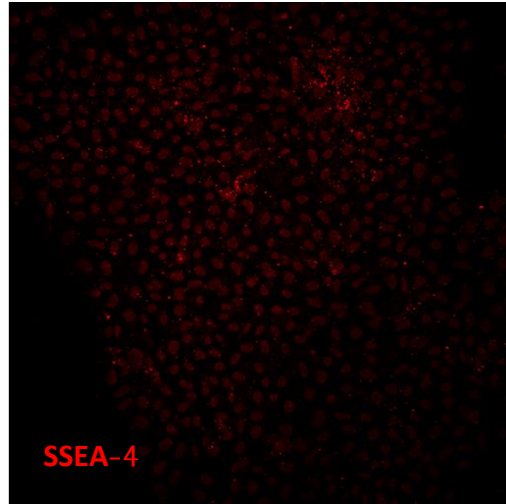
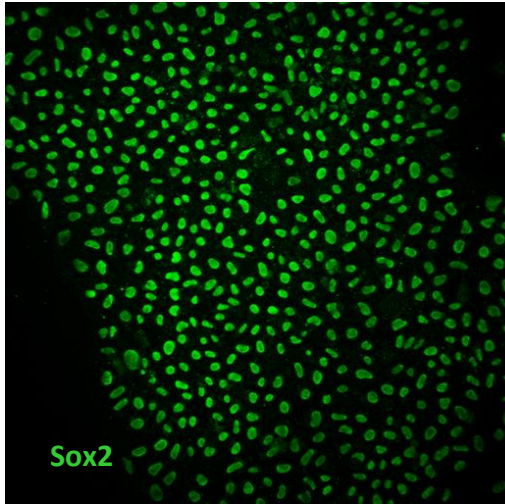
Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



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



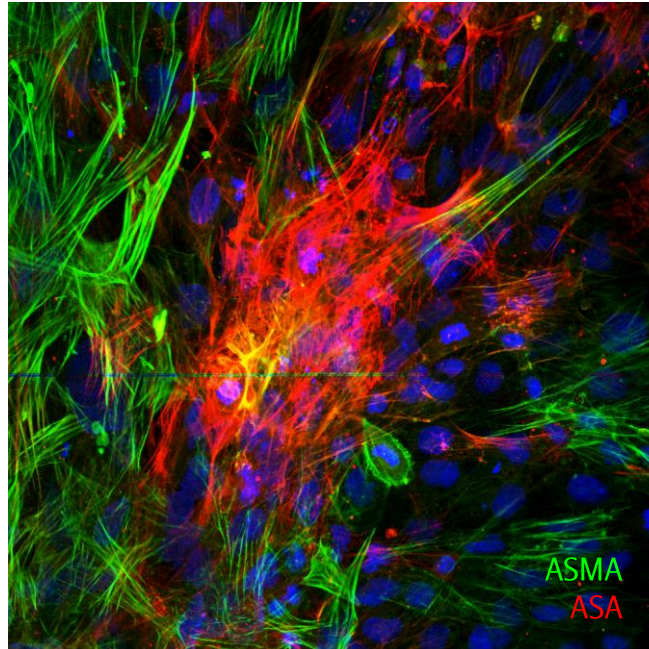
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia
Oct-4 y SSEA-3



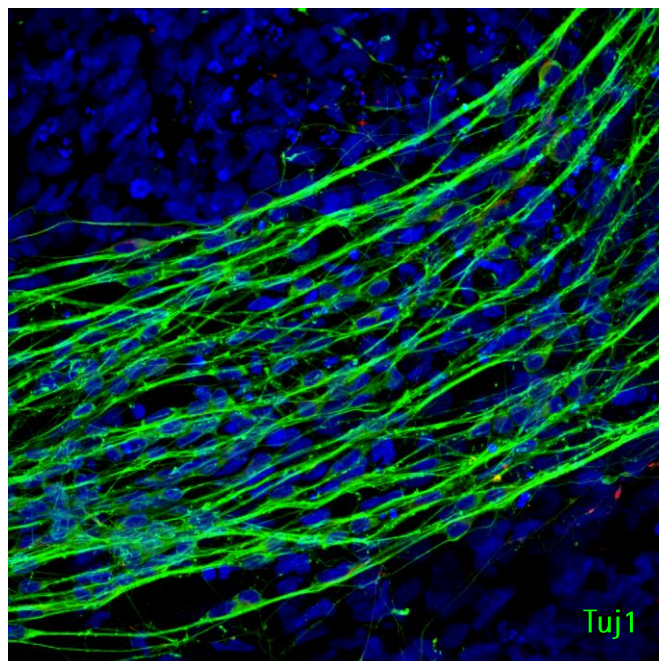
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

Anexo 2

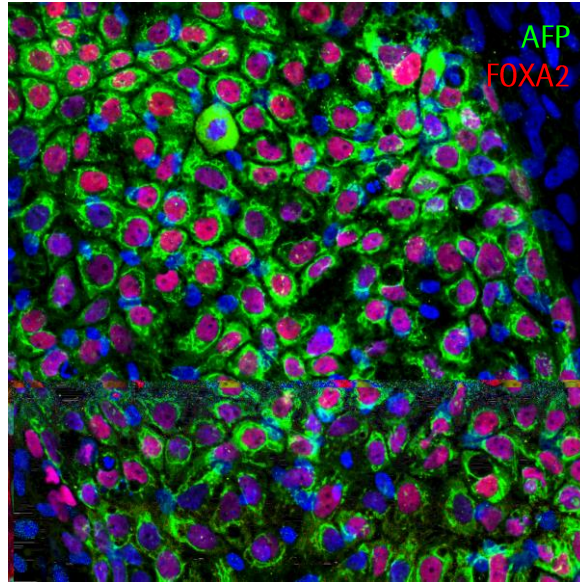
Diferenciación *in vitro*



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



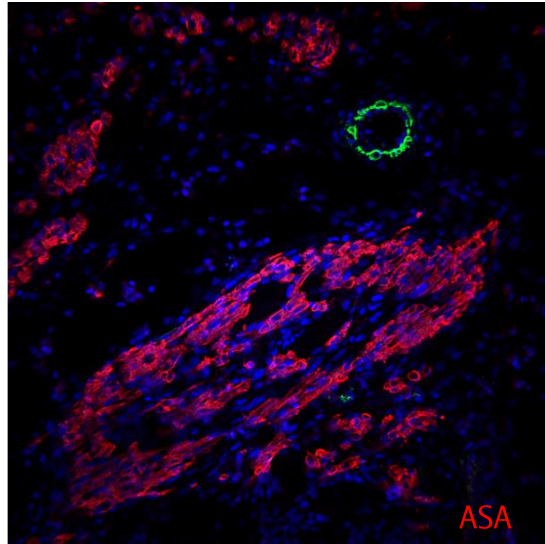
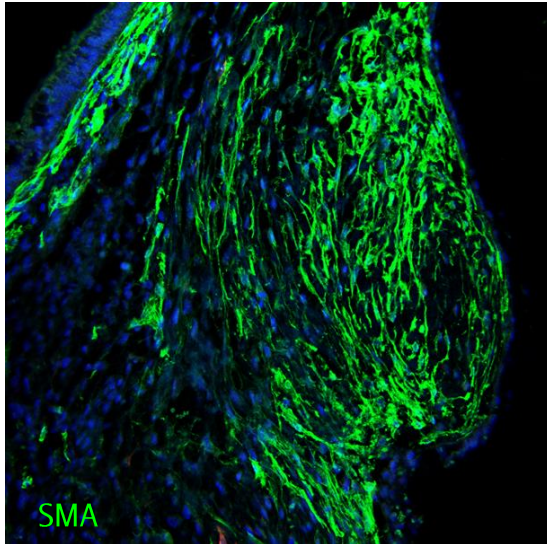
Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para **Tuj1**



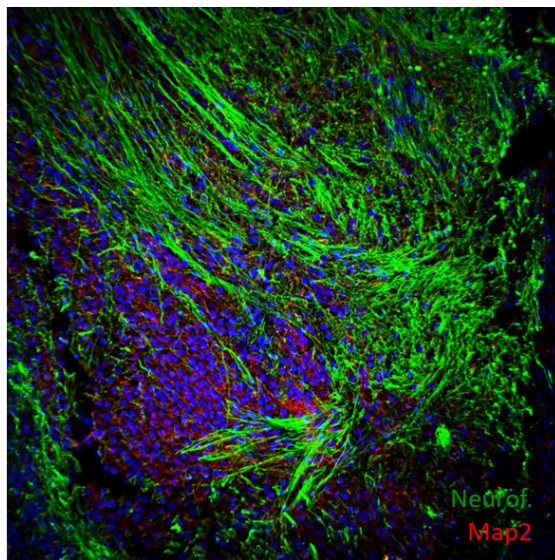
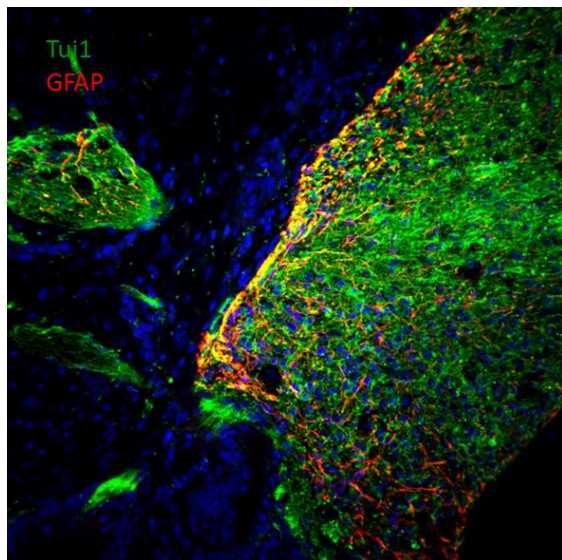
Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **AFP** y **FOXA2**

Anexo 3

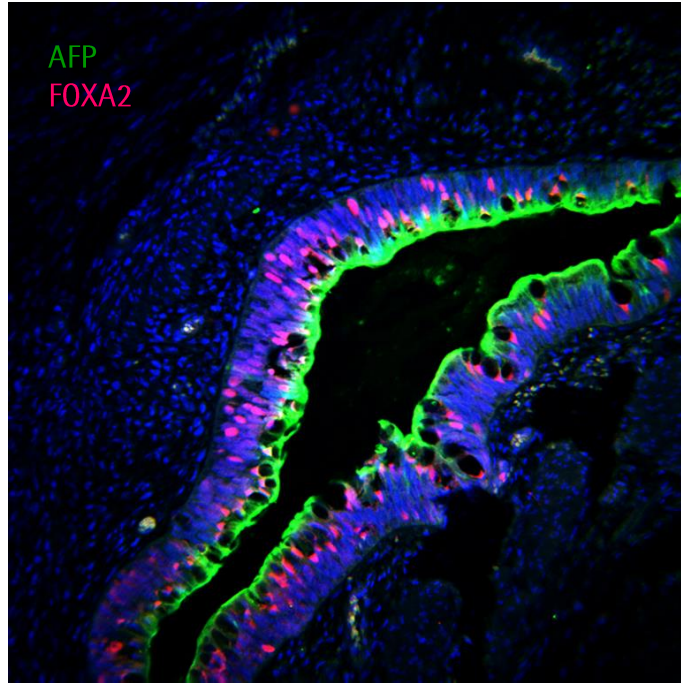
Diferenciación *in vivo*



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



Diferenciación *in vivo* a ectodermo: Células positivas para **TUJ1, GFAP, Neurofilamento y Map2.**



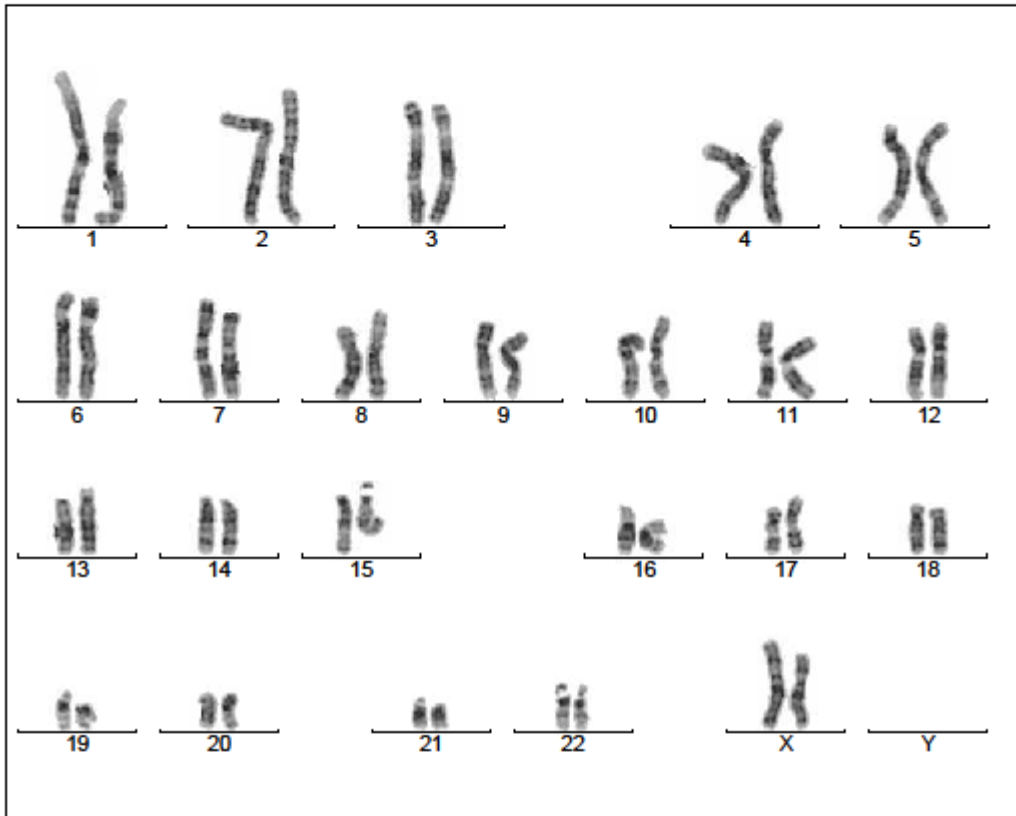
Diferenciación in vivo a endodermo: Células positivas para **AFP** y **FOXA2**

Anexo 4

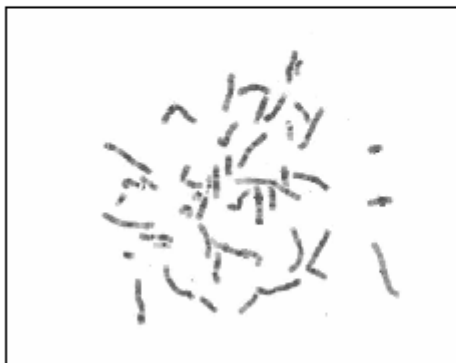
Cariotipo



Cytogenetic analysis



Av. Sàlvia, 164, 08035 Barcelona, Spain. C.I.F. B85300616 R.M. Encarnina, T. +34 93 400 7000, F. +34 93 400 7008, E. info@cmr.cat



Case name: 17442

Patient name: OCD FiPS2.Ep6F-10 p6

Specimen type: stem cells

Result: 46,XX

Este informe ha sido elaborado por el personal de la Unidad de Citogenética del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona. El análisis de los resultados de este estudio es responsabilidad exclusiva del paciente y su familia. El presente informe no debe ser utilizado para fines de diagnóstico, pronóstico o de selección de tratamientos. Este informe es propiedad de Ambar Biomédica. Octubre 2017. C/ Dr. Aiguader, 88. 08036 Barcelona, España.

Anexo 5

Resultado microsatélites



Los resultados obtenidos son estudiados mediante el programa informático GeneMapper[®] 3.2. De acuerdo con la información suministrada por Promega[®] sobre su kit de amplificación GenePrint[®] 10 System, estos son los datos correspondientes de los alelos existentes para cada uno de los diferentes loci STR (figura1):



Table 5. The GenePrint[®] 10 System Allelic Ladder Information.

STR Locus	Label	Size Range of Allelic Ladder Components ^{1,2} (bases)	Repeat Numbers of Allelic Ladder Components
TH01	FL	136–196	4–9, 9.3, 10–11, 13.3
D21S11	FL	203–259	24, 24.2, 25, 25.2, 26–28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36–38
D5S818	JOE	119–155	7–16
D13S317	JOE	176–208	7–15
D7S820	JOE	215–247	6–14 ³
D16S539	JOE	204–204	5, 6–15
CSF1PO	JOE	321–357	6–15
Amelogenin	TMR	106, 112	X, Y
vWA	TMR	125–171	10–22
TPOX	TMR	282–290	6–13

¹The length of each allele in the allelic ladder has been confirmed by sequence analysis.

²When using an internal lane standard, such as the Internal Lane Standard 600, the calculated sizes of allelic ladder components may differ from those listed. This occurs because different sequences in allelic ladder and ILS components may cause differences in migration. The dye label also affects migration of alleles.

³The La cells have a microvariant allele 13.3 at the D13S317 locus. This will appear as an off-ladder allele (see www.cmf.acf.gov/strbase/var_D13S317.html).

Figura 1. Información de la casa comercial Promega sobre la relación entre cada uno de los loci STR amplificados y las repeticiones (en rangos de tamaño y número) que pueden estar presentes en dichos productos de PCR.

RESULTADOS:

A continuación se indica el código de Biobanco para la muestra analizada y el código origen del ADN procesado de la línea celular:

Código Biobanco	Código origen de ADN
32180104002	OCD FiPS 2-Ep6F-10 p8

En la tabla siguiente se muestran los resultados correspondientes a las variantes alélicas para cada locus STR.

Código origen del ADN de la línea celular	Loci STR analizados									
	AMEL	CSF1PO	D13S317	D16S539	D21S11	D5S818	D7S820	TH01	TPOX	vWA
OCD FiPS 2-Ep6F-10 p8	X	11	11	12	29, 30	10, 12	10, 12	6, 9.3	8	15, 17

Granada, a 26 de Marzo de 2018

Laboratorio de Biología Molecular
 Biobanco del SSPA

RESULTADOS:

A continuación se indica el código de Biobanco para la muestra analizada y el código origen del ADN procesado de la línea celular:

Código Biobanco	Código origen de ADN
32180074002	OCD2F

En la tabla siguiente se muestran los resultados correspondientes a las variantes alélicas para cada locus STR.

Código origen del ADN de la línea celular	Loci STR analizados									
	AMEL	CSF1PO	D13S317	D16S539	D21S11	D5S818	D7S820	TH01	TPOX	vWA
OCD2F	X	11	11	12	29, 30	10, 12	10, 12	6, 9, 3	8	15, 17

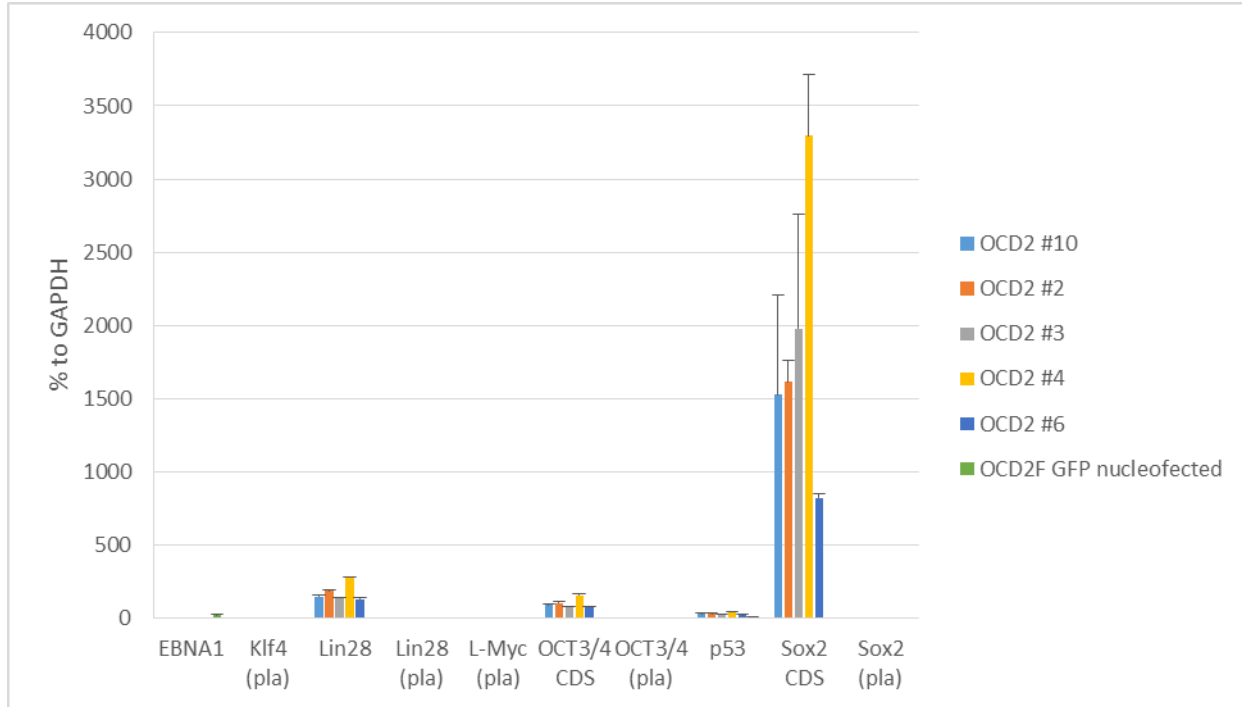
Granada, a 19 de Febrero de 2018

Laboratorio de Biología Molecular
Biobanco del SSPA

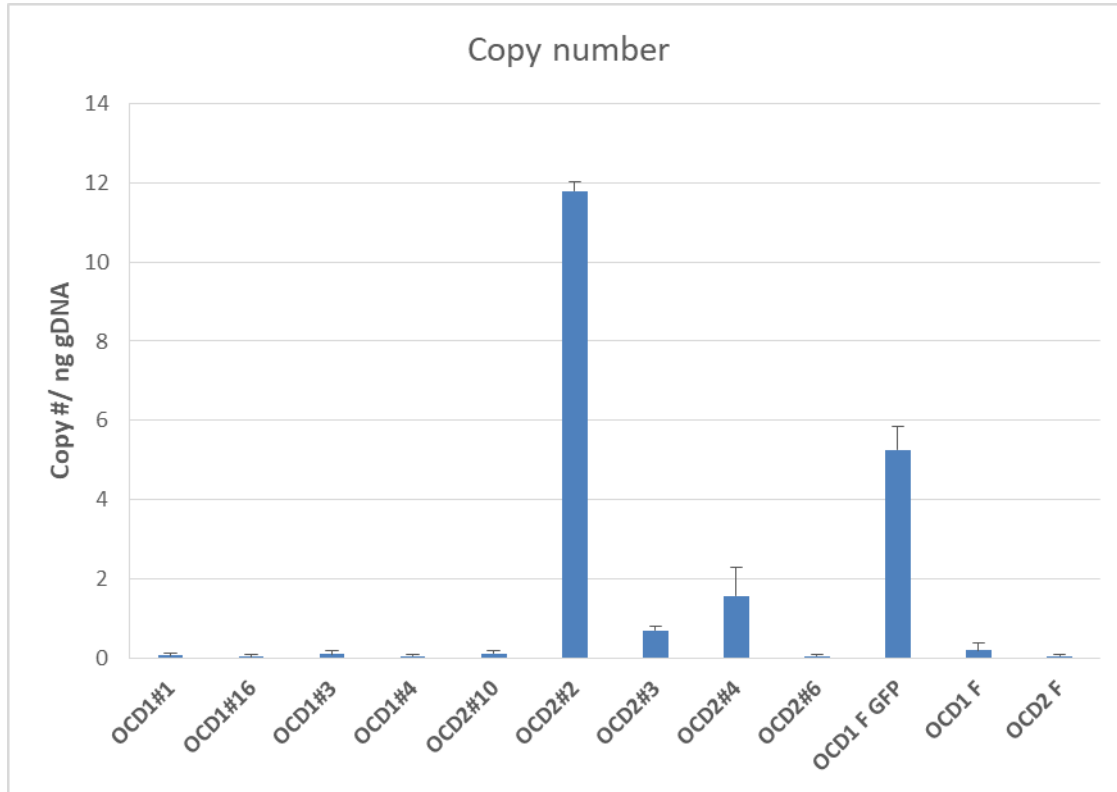
Análisis de microsatélites en la línea de hiPSC y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.

Anexo 6

Ausencia de los transgenes de reprogramación



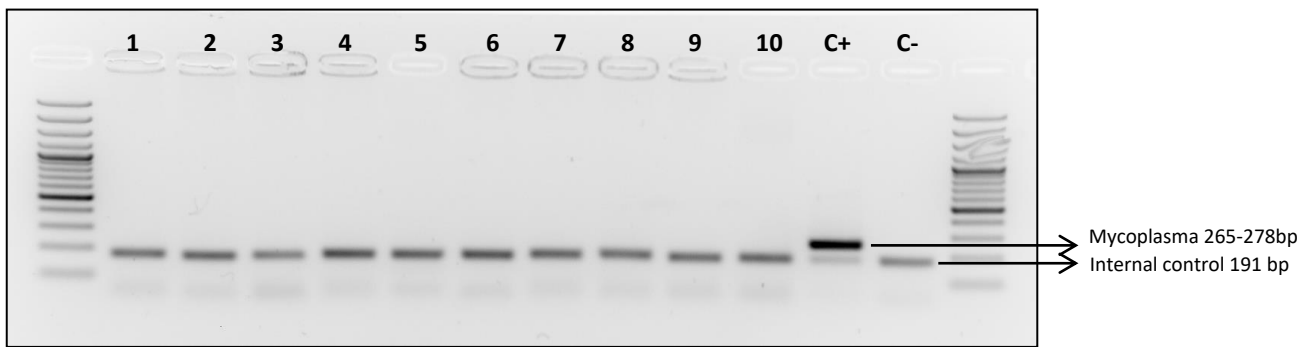
Niveles de expresión de mRNA de transgenes (pla) y marcadores de pluripotencia endógenos (CDS) en la línea **OCD FiPS2 –EP6F-10** (abreviada en la tabla como **OCD2#10**) y otros clones procedentes del mismo paciente.



QRT-PCR donde se muestra la ausencia de plásmidos episomales en la línea de iPSC (**OCD2#10** corresponde a la abreviación de **OCD FiPS2-Ep6F-10**) y en fibroblastos control no-nucleofectados (**OCD1F**) y la presencia de plásmidos en fibroblastos control GFP-nucleofectados 72h después de la nucleofección (**OCD2 F GFP**)

Anexo 7

Resultado test de micoplasma



2. OCD FiPS2-Ep6F-10 p5