

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA
CELULAR **Ctrl FiPS1-Sv4F-25** EN EL BANCO
NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES

ANEXOS

Anexo 1: Test de pluripotencia.

Anexo 2: Test de diferenciación in vitro.

Anexo 3: Cariotipo.

Anexo 4: Huella genética por análisis de STR.

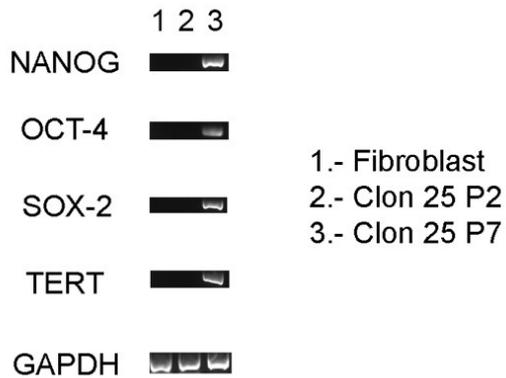
Anexo 5: Test de silenciamiento.

Anexo 6: Test de micoplasma.

Anexo 1. Test de pluripotencia

La caracterización de la pluripotencia de la línea iPSC se llevó a cabo mediante el análisis por PCR de los marcadores OCT4, NANOG, SOX2 y TERT. GAPDH se utilizó como control "House-keeping".

The characterization of the pluripotency of the iPSC line was carried out by PCR for the OCT4, NANOG, SOX2 and TERT markers. GAPDH was used as control House-keeping.

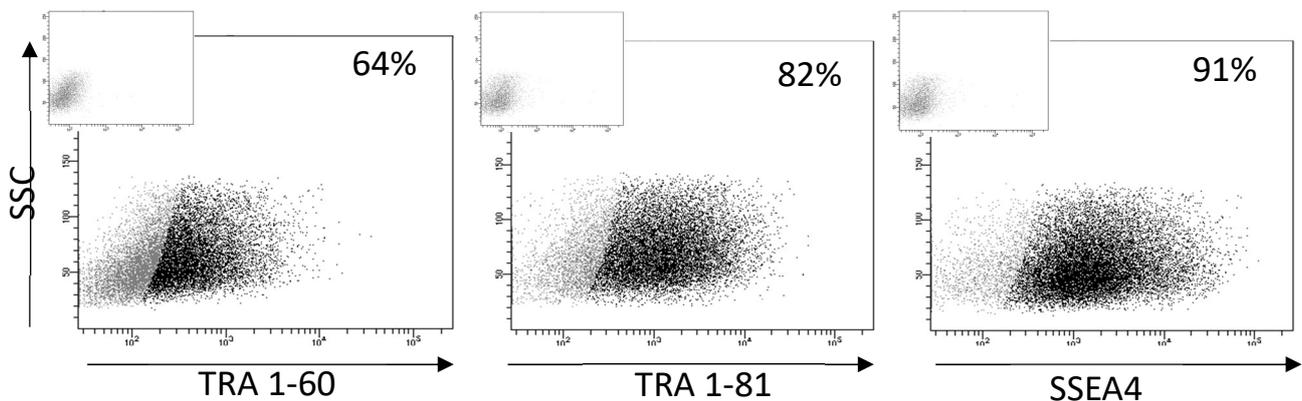


La línea iPSC, clon 25, presentó expresión de los genes específicos de pluripotencia en el P7. Estos genes no mostraron expresión en pases previos ni en la línea de fibroblastos que se usó como control negativo.

The clone 25 iPSC line presented expression of the specific pluripotency markers at P7. These genes did not show expression in previous passages nor in the fibroblast line used as a negative control.

Los marcadores de pluripotencia Tra1-60, Tra1-81 y SSEA4 se determinaron mediante citometría de flujo.

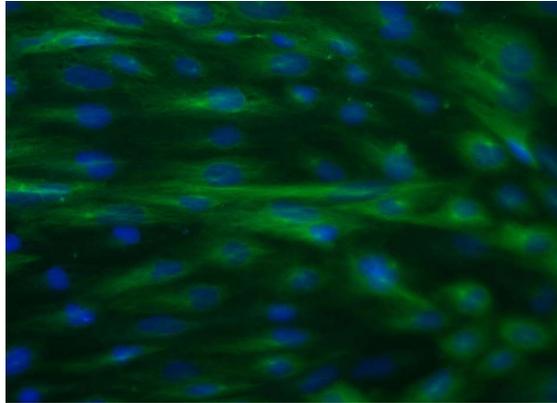
The pluripotency markers Tra1-60, Tra1-81 and SSEA4 were determined by flow cytometry.



Anexo 2. Test de diferenciación in vitro

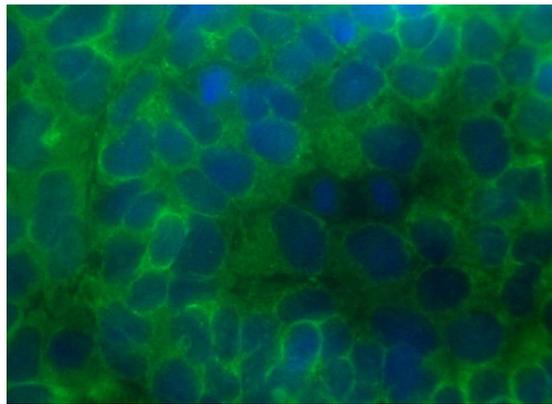
Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Positiva para **TUJ1** (beta tubulina III)

In vitro differentiation to ectoderm: Positive for TUJ1 (beta tubulin III)



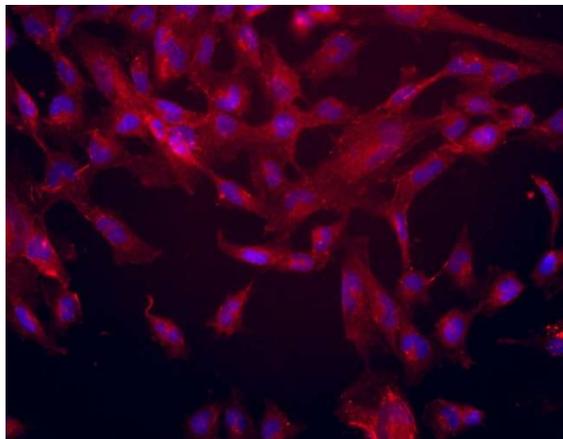
Diferenciación *in vitro* a mesodermo: Positiva para **ASM** (alfa-actina de musculo liso)

In vitro differentiation to mesoderm: Positive for ASM (alpha-smooth muscle actin)



Diferenciación *in vitro* a endodermo: Positiva para **AFP** (alfa-fetoproteína)

In vitro differentiation to endoderm: Positive for AFP (alpha-fetoprotein)

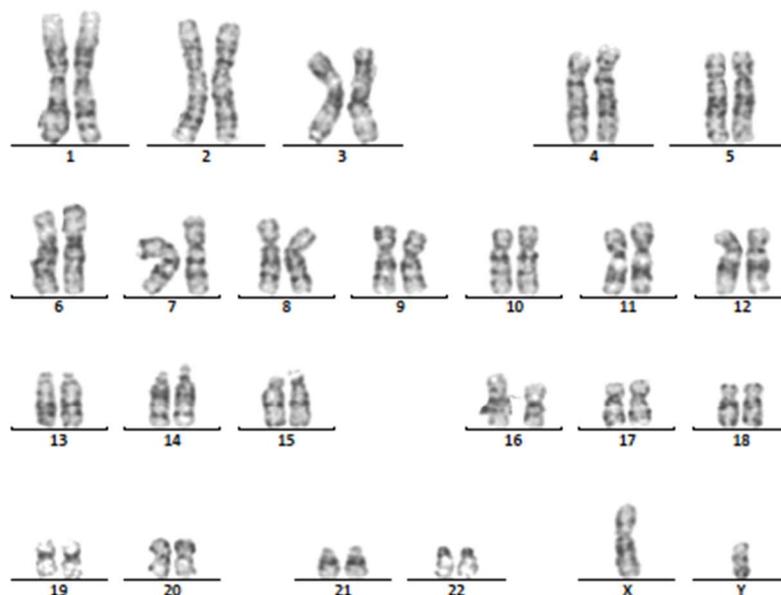


Anexo 3. Cariotipo

Código de Biobanco: clon 25
Código de origen: CT FiPS1-Sv4F-25
Petición de servicio:

Fecha de entrada: 18/03/22
Tipo de muestra: iPSC
Técnica: Bandas G

RESULTADOS ANÁLISIS CITOGENÉTICO



Cariotipo: 46,XY

Diagnóstico citogenético: Línea celular compatible con cariotipo masculino normal

Comentarios cariotipo: El resultado del estudio está limitado por la sensibilidad de la técnica.

Anexo 4. Huella genética por análisis de STR

Línea hiPSC Ctrl FiPS1-Sv4F-25

Línea celular	Ctrl FiPS1-Sv4F-25
D8S1179	10, 14
D21S11	28, 29
D7S820	11, 12
CSP1PO	10, 12
D3S1358	15, 16
TH01	6, 9.3
D13S317	11, 12
D16S539	11
D2S1338	20, 25
D19S433	13, 16
vWA	15, 17
TPOX	8, 11
D18S51	15, 16
AMEL	X, Y
D5S818	12
FGA	21, 22

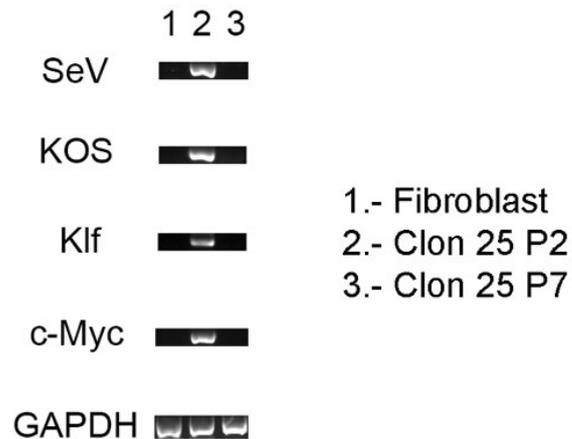
Fibroblastos BBSSPA-H-HAF-S#3

Línea celular	BBSSPA-H-HAF-S#3
D8S1179	10, 14
D21S11	28, 29
D7S820	11, 12
CSP1PO	10, 12
D3S1358	15, 16
TH01	6, 9.3
D13S317	11, 12
D16S539	11
D2S1338	20, 25
D19S433	13, 16
vWA	15, 17
TPOX	8, 11
D18S51	15, 16
AMEL	X, Y
D5S818	12
FGA	21, 22

Anexo 5. Test de silenciamiento

La confirmación del silenciamiento de los factores de reprogramación exógenos del virus Sendai se llevó a cabo mediante el análisis por PCR de los marcadores Klf4, KOS2, C-Myc y SeV. GAPDH se utilizó como control "House-keeping".

Confirmation of the silencing of the exogenous reprogramming factors of the Sendai virus was carried out by PCR analysis of the Klf4, KOS2, C-Myc and SeV markers. GAPDH was used as "house-keeping" control.



La línea iPSC, clon 25, confirmó el silenciamiento en el P7, que muestra un resultado positivo en pases previos. La línea de fibroblastos se usó como control negativo.

The clone 25 iPSC line confirmed its silencing at P7, which was positive in previous passages. The fibroblast line was used as negative control.

Anexo 6. Test de micoplasma

PROCESAMIENTO REALIZADO

La detección de *mycoplasma* se realizó con el kit Venor GeM qEP (Minerva Biolabs). La detección se realiza mediante la amplificación específica del gen codificante para el ARNr 16S del *mycoplasma*. El kit incluye un control interno de amplificación.

RESULTADOS

En la tabla resumen se muestran los resultados obtenidos para la PCR.

<u>Muestra</u>	<u>Amplificación mycoplasma</u>	<u>Amplificación control interno</u>
C25	-	+
Control -	-	+
Control +	+	+