

ANEXOS: NEDAMSS

NEDM-FiPS1-SV4F-1

Anexo 1: Test de pluripotencia.

Anexo 2: Test de diferenciación in vitro.

Anexo 3: Cariotipo.

Anexo 4: Huella genética por análisis de STR.

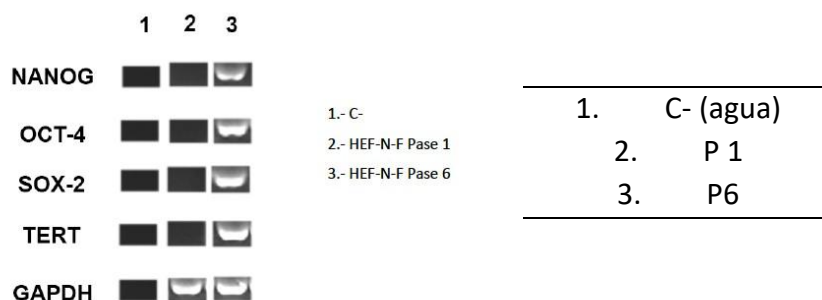
Anexo 5: Test de silenciamiento.

Anexo 6: Test de micoplasma.

Anexo 1. Test de pluripotencia

La caracterización de la pluripotencia de la línea iPSC generada 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 generated iPSC line was carried out by PCR analysis of the OCT4, NANOG, SOX2 and TERT markers. GAPDH was used as control Housekeeping.

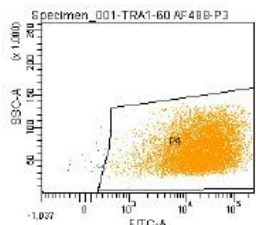


La línea celular presentó expresión de los genes específicos de pluripotencia en el P6. Estos genes no mostraron expresión en pases previos.

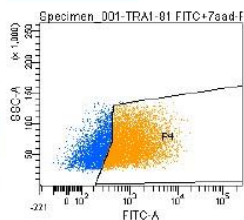
The cell line showed expression of the specific pluripotency genes in passage 6. These genes did not show expression in previous passages.

Los marcadores de pluripotencia Tra-1-60, Tra-1-81, y SSEA4 se determinaron mediante citometría de flujo.

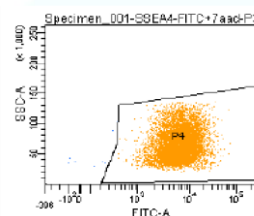
The pluripotency markers Tra-1-60, Tra-1-81 y SSEA4 were determined by flow cytometry.



TRA-1-60: 99,6%



TRA-1.81: 66,3%

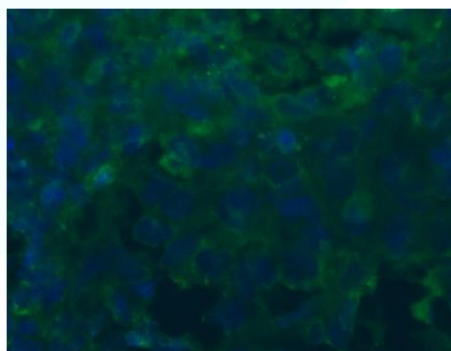


SSEA4: 99,9%

Anexo 2. Test de diferenciación in vitro.

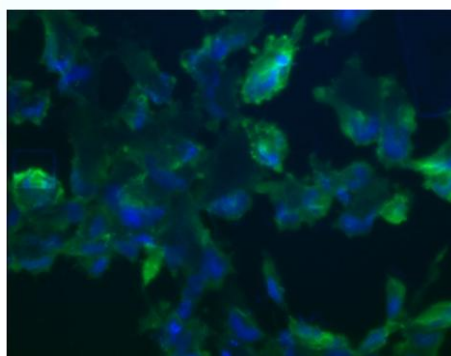
Diferenciación in vitro a mesodermo: Positiva para ASM (alfa-actina de musculo liso)

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



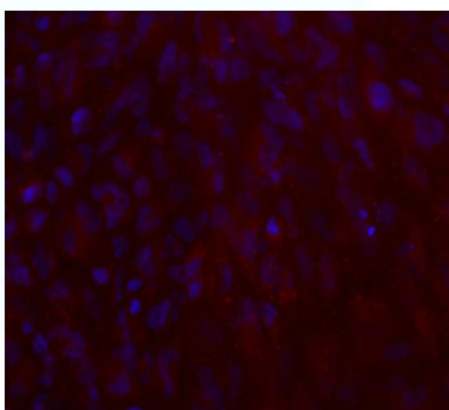
Diferenciación in vitro a ectodermo: Positiva para TUJ1 (beta tubulina III)

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



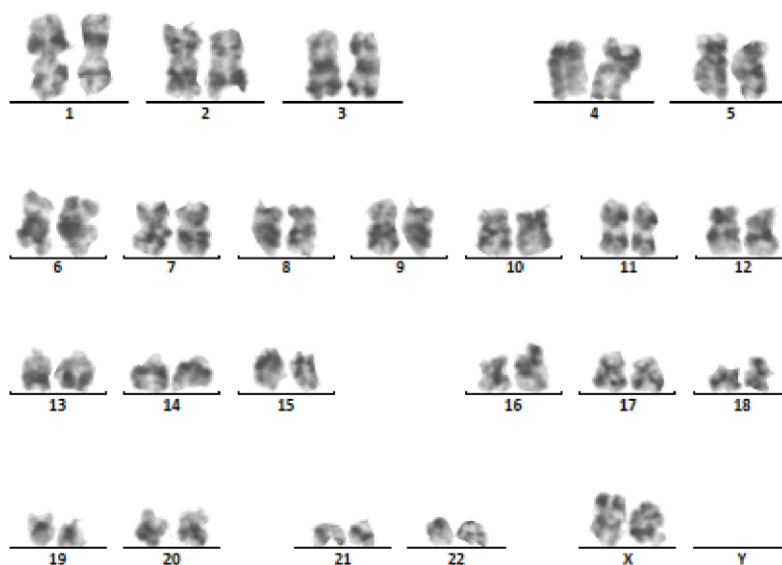
Diferenciación in vitro a endodermo: Positiva para AFP (alfa-fetoproteína)

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



Anexo 3. Cariotipo

RESULTADOS ANÁLISIS CITOGÉNÉTICO



Cariotipo: 46,XX

Diagnóstico citogenético: Línea celular compatible con cariotipo femenino normal.

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

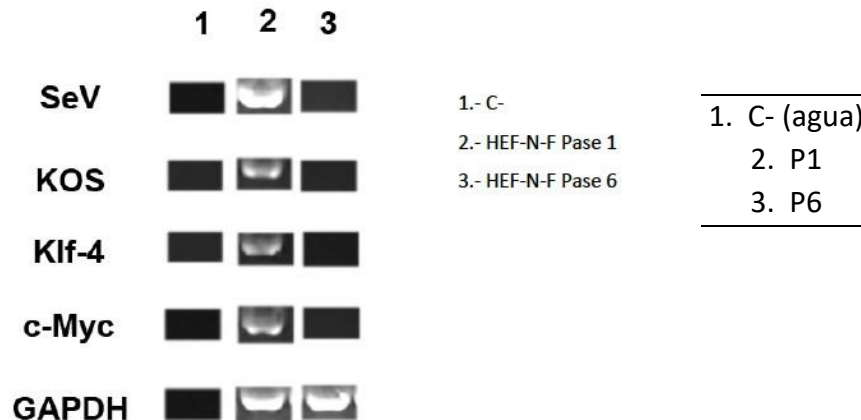
Anexo 4. Huella Genética por análisis de STR

Código origen del ADN de la línea celular	LÍNEA REPROGRAMADA	FIBROBLASTOS ORIGEN DONANTE CON MUTACIÓN IRF2BPL
D8S1179	14	14
D21S11	29, 31	29, 31
D7S820	8, 9	8, 9
CSP1PO	10, 11	10, 11
D3S1358	14	14
TH01	8, 9.3	8, 9.3
D13S317	10,12	10,12
D16S539	9, 12	9, 12
D2S1338	17, 23	17, 23
D19S433	13, 14	13, 14
vWA	17, 18	17, 18
TPOX	9, 11	9, 11
D18S51	13	13
AMEL	X, X	X, X
D5S818	11, 12	11, 12
FGA	23	23

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*.

The 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.



Anexo 6. Test de micoplasma

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

Mycoplasma detection was performed using the Venor GeM qEP kit (Minerva Biolabs) by specific amplification of the gene encoding the 16S rRNA of mycoplasma. The kit includes an internal amplification control.

MUESTRA	AMPLIFICACIÓN MYCOPLASMA	AMPLIFICACIÓN CONTROL INTERNO
Control -	-	+
Control +	+	+
NEDM-FiPS1-SV4F-1	-	+