

ANEXO 1

Información genética de la línea HLA89-MiPS4F8. Haplotipo HLA.

Genetic information of the HLA89-MiPS4F8 line. HLA haplotype.

Haplotipo HLA A1 B8 Cw5 DR03 DQ02 DP4

ANEXO 2

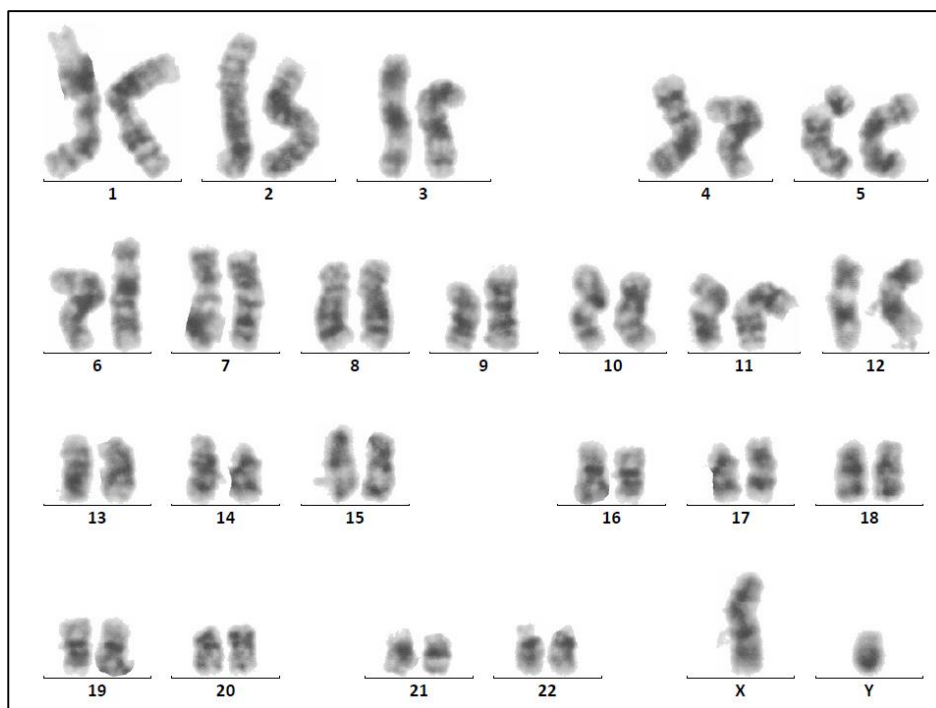
Cariotipo/bandeo G

Caryotype/ G-banding

Trabajo realizado por el Biobanco de SSPA, nodo de Granada.

Diagnóstico citogenético: Línea celular compatible con un cariotipo masculino normal.

*Results provided by SSPA Biobank of Granada. Cytogenetic diagnostic:
Cell line compatible with a normal male karyotype.*



Cariotipo: 46,XY

Diagnóstico citogenético: Línea celular compatible con cariotipo masculino normal.

ANEXO 3

Análisis STR

Fingerprint analysis

Trabajo realizado en el Biobanco del SSPA, nodo de Granada, a partir de muestras de ADN genómico de la línea celular HLA89-MiPS4F8 y de las células primarias de una muestra de sangre.

*Results provided by the SSPA Biobank of Granada from genomic DNA sample from both primary cells (blood) and **HLA89-MiPS4F8***

Código biobanco	Código origen del ADN de la línea celular	TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSP1PO	AMEL	vWA	TPOX
INVN02523A168ADNA002	HLA89 Blood	7	30	10, 11	10, 14	8, 11	11	7, 11	X, Y	14, 18	8, 9
INVN02523A169ADNA002	HLA89 IPS4F8	7	30	10, 11	10, 14	8, 11	11	7, 11	X, Y	14, 18	8, 9

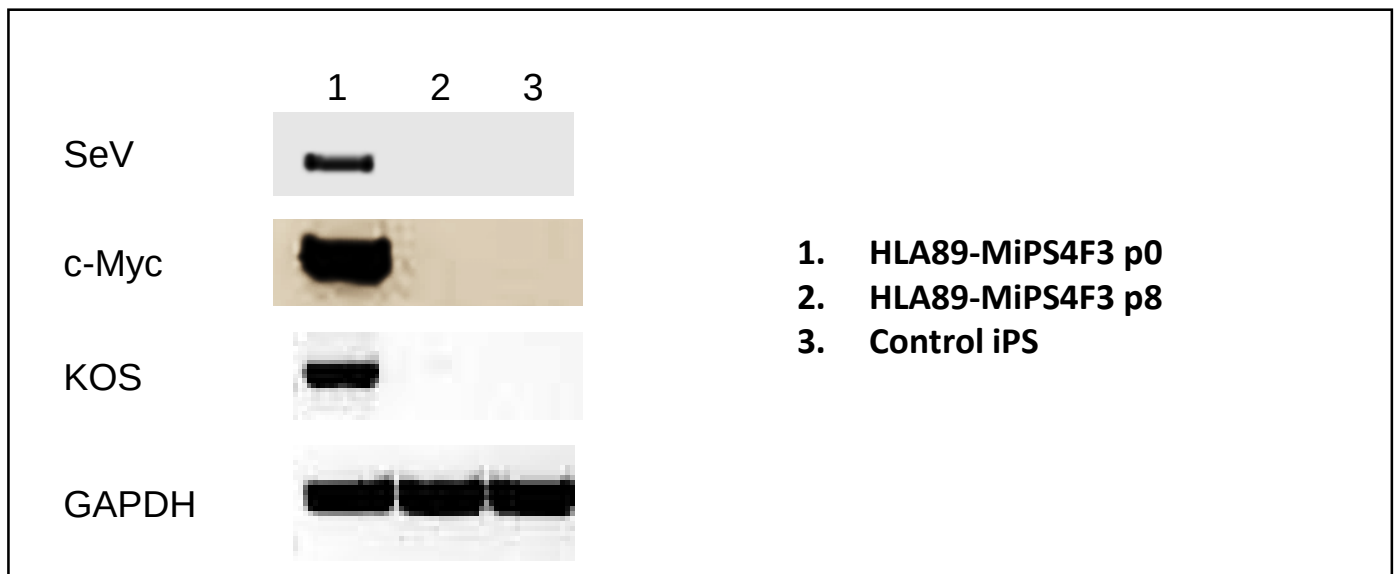
ANEXO 4

Análisis silenciamiento

Viral silencing analysis

rtPCR para detectar factores de reprogramación ectópicos y gen que codifica la cápsida del virus. Se muestra expresión de factores del virus en HLA89-MiPS4F8 en pase 0 (P0) como control positivo, y ausencia de expresión a pase 8 (P8). Como control negativo se muestran unas células iPS ya caracterizadas y sin expresión de factores del SeV.

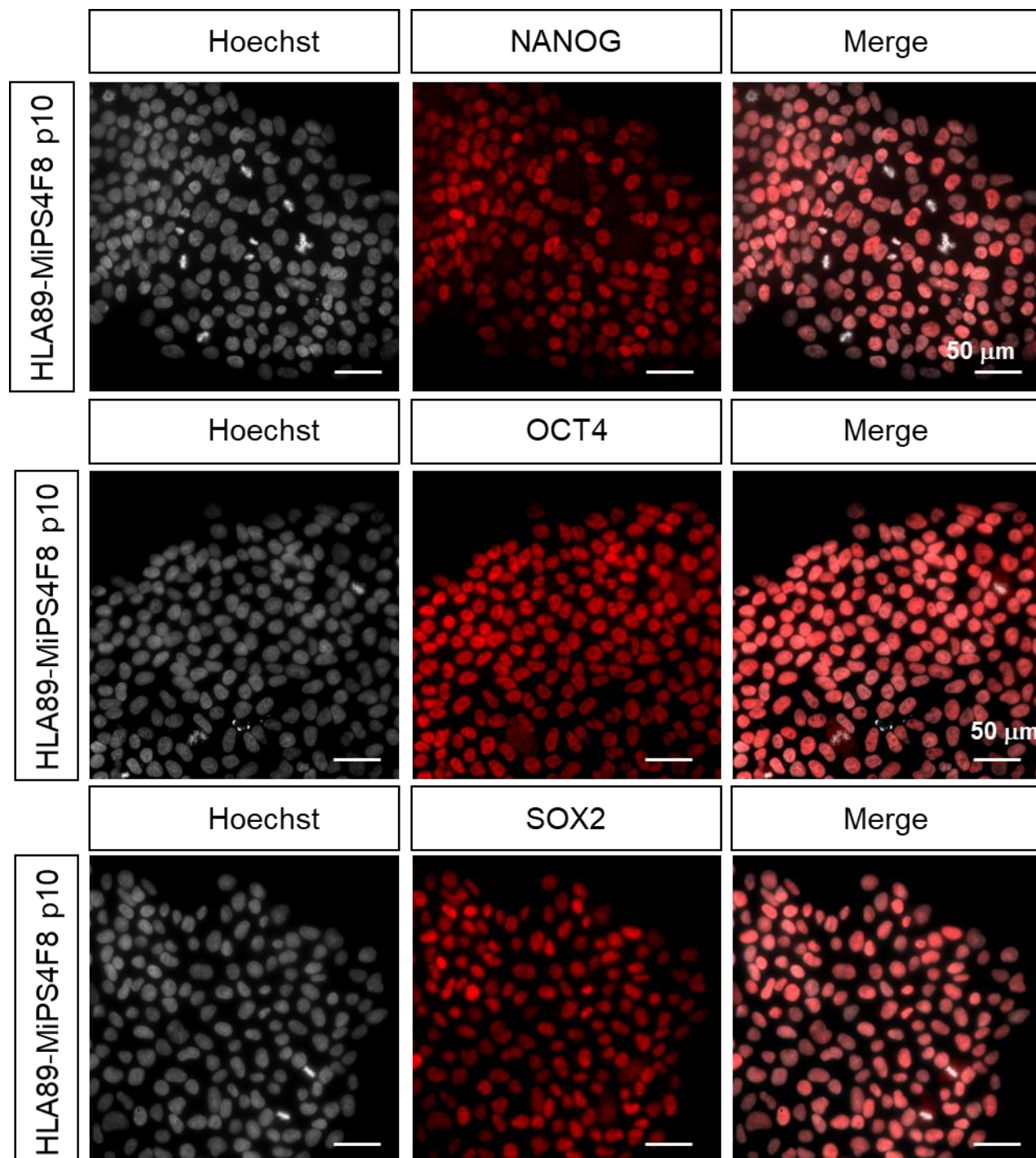
rtPCR performed to detect ectopic reprogramming factors and gene encoding the virus capsid. Expression of viral factors is shown in HLA89-MiPS4F8 at passage 0 (P0) as a positive control, and absence of expression at passage 8 (P8). As a negative control, iPS cells already characterized and without expression of SeV factors are shown.



ANEXO 5

Inmunofluorescencia para marcadores de pluripotencia de expresión nuclear.

Anticuerpo específico en rojo, ADN marcado con Hoechst, y merge para la co-localización de ambos marcadores. *Immunofluorescence for pluripotency markers of nuclear expression. Specific antibody in red, Hoescht-labeled DNA, merge for co-localization of both markers.*



50μM

Anticuerpos primarios:

- OCT4_cell signalling #2840S
- NANOG_cell signalling #4903S
- SOX2_cell signalling #3579P

Anticuerpo secundario:

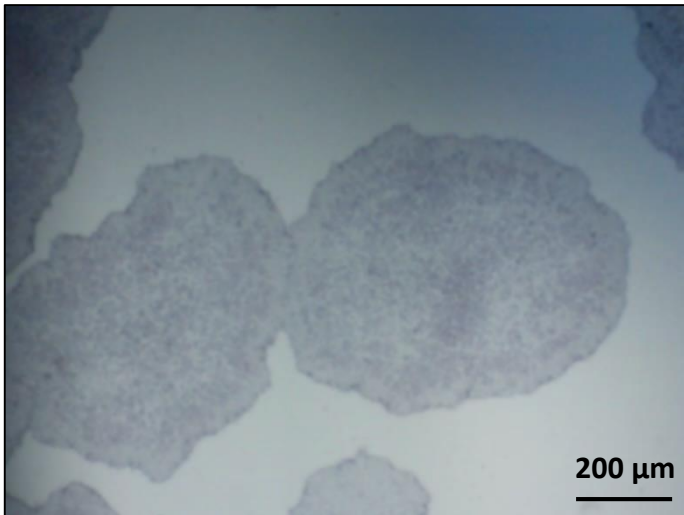
- * Alexafluor #A-32794 (donkey anti rabbit 555)

Microscopio Thunder Epifluorescence Microscope (Leica)

ANEXO 6

Evaluación de la pluripotencia de la línea por ensayo de fosfatasa alcalina

Alkaline phosphatase assay



Alkaline Phosphatase Staining

Cell Line: HLA89-MiPS4F8 p13, LN521

Fixation: 4%-Paraformaldehyde

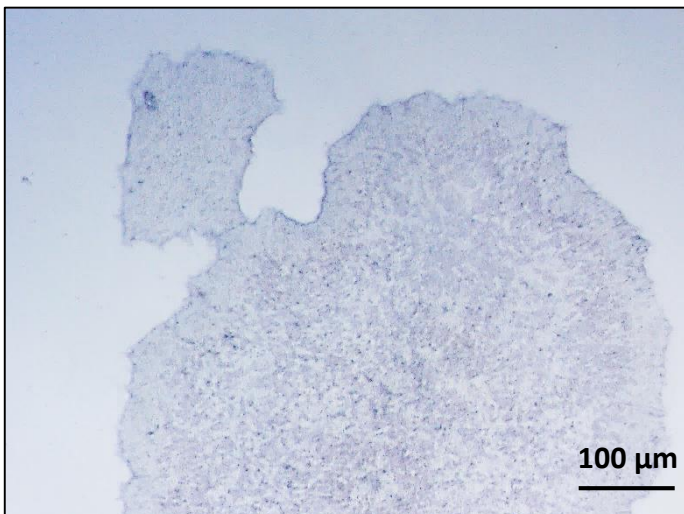
10 minutes at room temperature

Staining: BCIP-NBT Solution (Sigma #B5655)

40 minutes at room temperature

Optical microscope (Zeiss Axiovert 40 C)

2.5x magnification



Alkaline Phosphatase Staining

Cell Line: HLA89-MiPS4F8 p13, LN521

Fixation: 4%-Paraformaldehyde

10 minutes at room temperature

Staining: BCIP-NBT Solution (Sigma #B5655)

40 minutes at room temperature

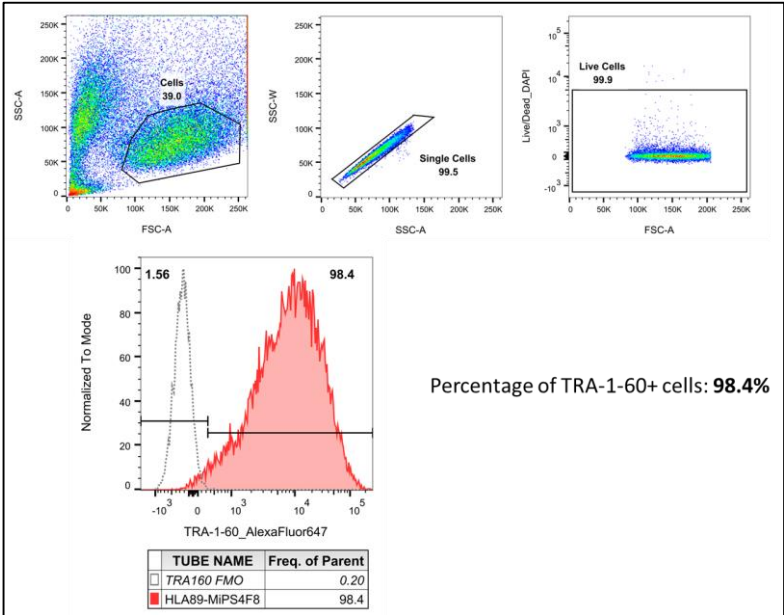
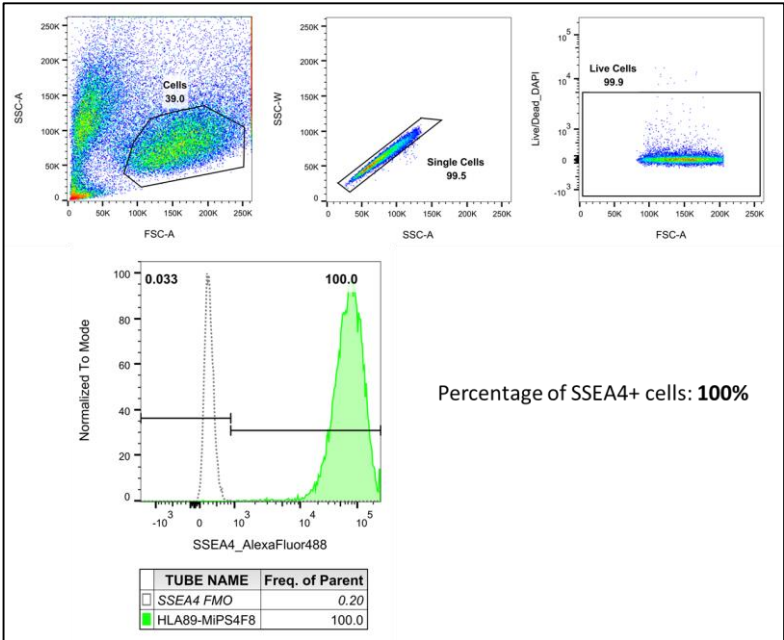
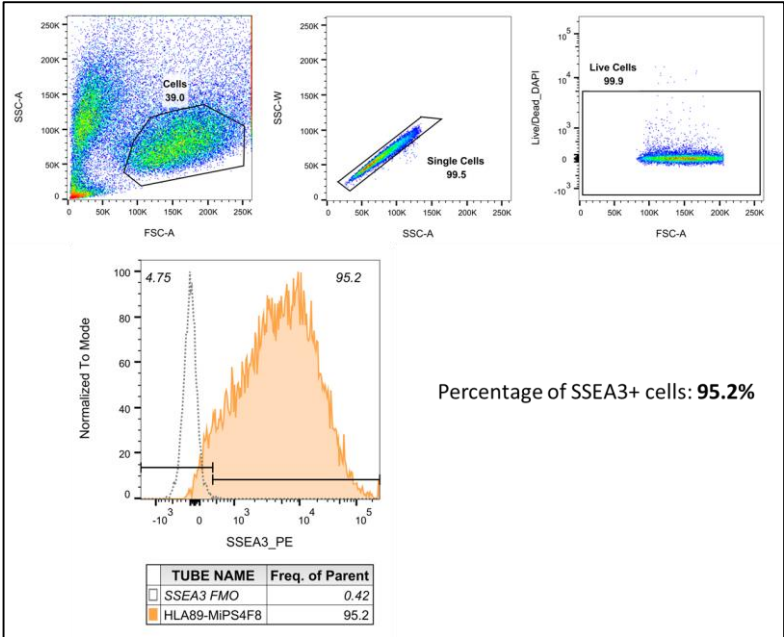
Optical microscope (Zeiss Axiovert 40 C),

5x magnification

ANEXO 7

Evaluación por citometría de flujo de marcadores de pluripotencia: SSEA3, SSEA4 y TRA-1-60

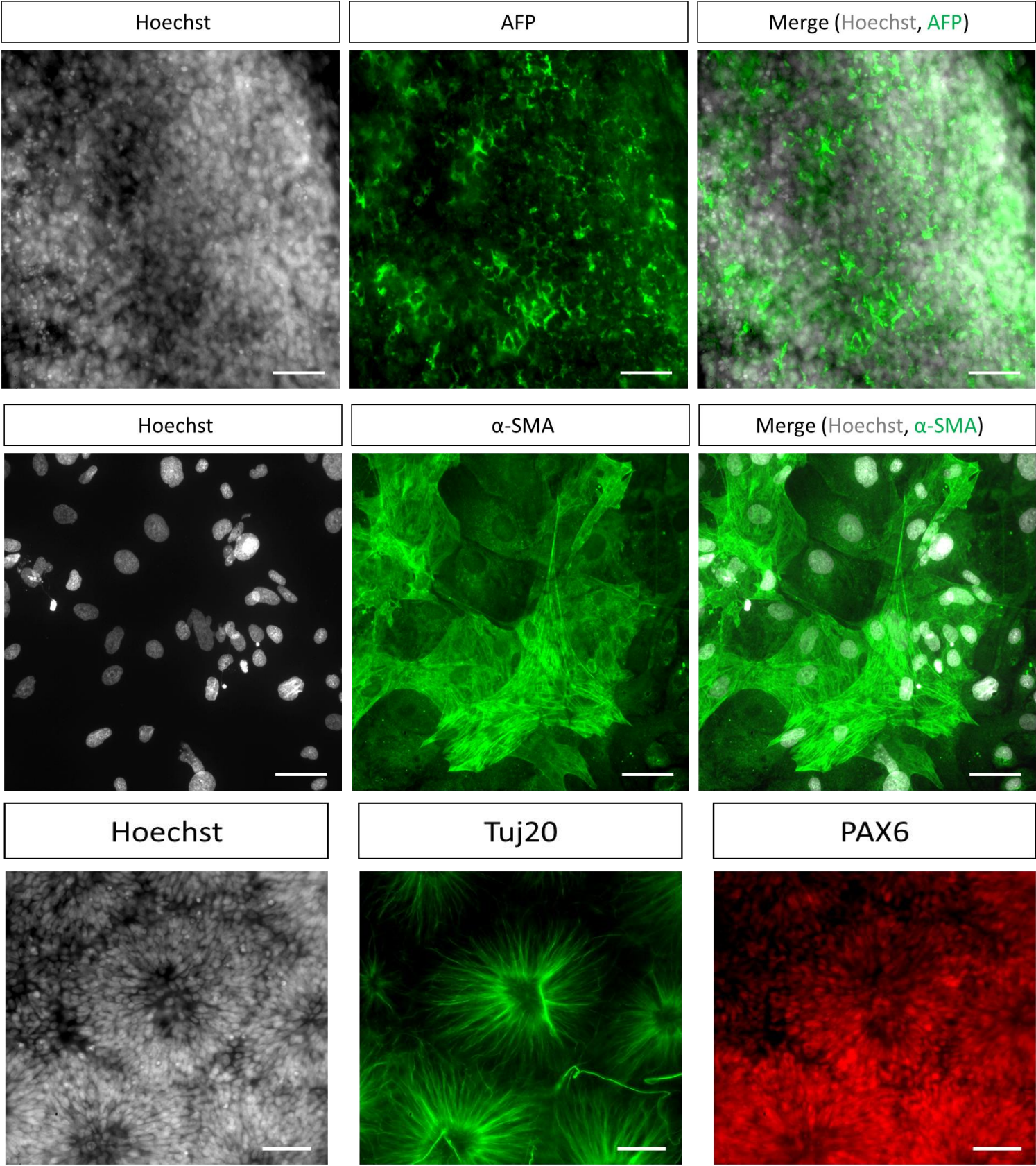
Flow cytometry evaluation of three pluripotency markers:SSEA3, SSEA4 y TRA-1-60



ANEXO 8

Diferenciación *in vitro*: inmunofluorescencia de marcadores de las tres capas embrionarias en cuerpos embrionarios: Endodermo, Alpha-fetoprotein (AFP); Ectodermo, PAX6 y TUJ20; Mesodermo, smooth muscle actin (SMA). Imágenes a 400X

In vitro differentiation: IF of markers of three germ layers in embryoid bodies: endoderm, AFP, Alpha-fetoprotein; Ectoderm, PAX6, TUJ20; Mesoderm, SMA, smooth muscle actin. Magnification 400x



ANEXO 9

Control Micoplasma

Detección de Micoplasma mediante Mycoalert Mycoplasma detection kit, Lonza.

Medidas de luminiscencia:

- **Ratio B/A>1= Micoplasma presente en el medio de cultivo**
- **Ratio B/A<1= No se detecta micoplasma**

Mycoplasma detection assay using Mycoalert Mycoplasma detection kit, Lonza.

Luminiscence data:

- *Ratio B/A>1= Mycoplasma detection in culture medium*
- *Ratio B/A<1= No Mycoplasma detection*

	Ratio B/A
HLA89-MiPS4F7 p15	0.325
Positive Control	27.850
Negative Control	0.151