

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA
CELULAR **CF PBiPS1-Sv4F-17** 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

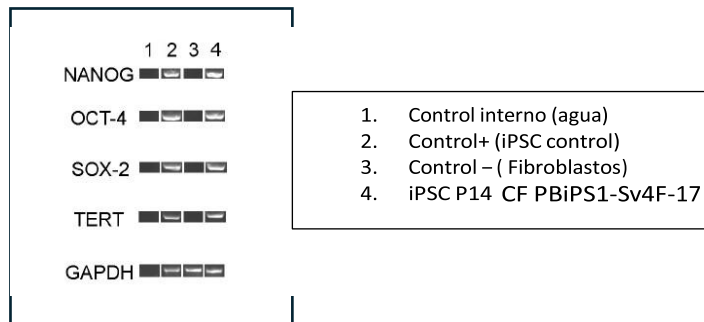
ANEXO 6: TEST DE MICOPLASMA

ANEXO 1: TEST DE PLURIPOTENCIA

- **RT-PCR:**

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 "Housekeeping".

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.



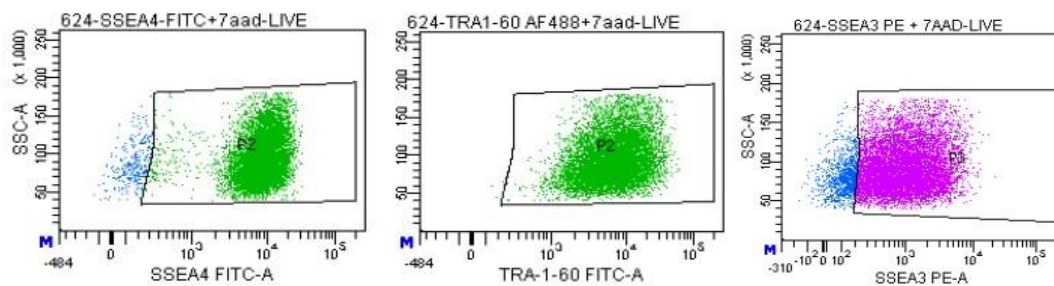
La línea celular presentó expresión de los genes específicos de pluripotencia en el **pase 14**. Estos genes no mostraron expresión en la línea celular de fibroblastos que se usaron como control negativo.

*The cell line showed expression of specific pluripotency genes in **passage 14**. These genes showed no expression in the fibroblast cell line used as a negative control.*

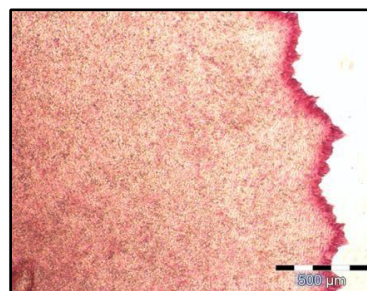
- **CITOMETRIA:**

Los marcadores de pluripotencia SSEA4, Tra-1-60 y SSEA3 y se determinaron mediante citometría de flujo en **Pase 14**.

*The pluripotency markers SSEA4, Tra-1-60 y SSEA3 were determined by flow cytometry in **passage 14**.*



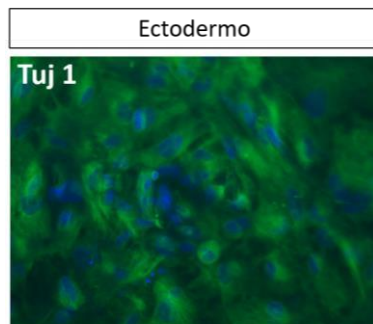
- **FOSFATASA ALCALINA:**



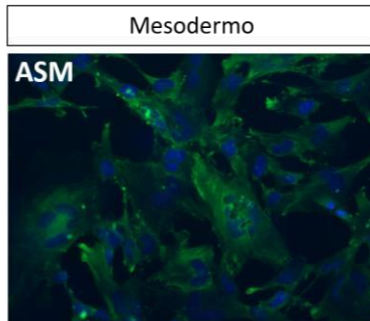
Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes generada en **Pase 16**.
Alkaline phosphatase activity of the generated pluripotent cell line in **16 Passage**.

ANEXO 2: TEST DE DIFERENCIACIÓN IN VITRO

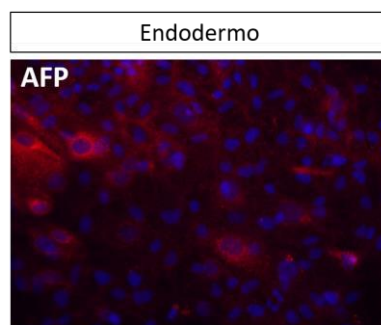
- Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Positiva para TUJ1 (beta tubulina III), **Pase 16**.
In vitro differentiation to ectoderm: Positive for TUJ1 (beta tubulin III), 16 passage.



- Diferenciación *in vitro* a mesodermo: Positiva para ASM (alfa-actina de musculo liso) **Pase 16**.
In vitro differentiation to mesoderm: Positive for ASM (alpha-smooth muscle actin) 16 passage.



- Diferenciación *in vitro* a endodermo: Positiva para AFP (alfa-fetoproteína) **Pase 16**.
In vitro differentiation to endoderm: Positive for AFP (alpha-fetoprotein) 16 passage.



ANEXO 3: CARIOTIPO

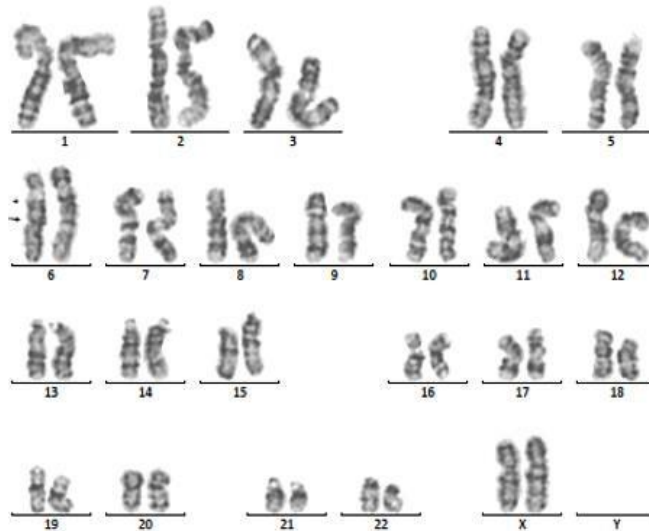
Código de origen: CF PBiPS1-Sv4F-17
Petición de servicio: S2500323

P16 CLON 17 Tipo de muestra:

iPSCs

Técnica: Bandas G

RESULTADOS ANÁLISIS CITOGÉNICO



Cariotipo: 46,XX,inv(6)(p12q21)

Diagnóstico citogenético: Línea celular femenina que presenta un cariotipo 46,XX con una inversión pericéntrica que afecta al cromosoma 6 entre las banda 6p12 y la banda 6q21.

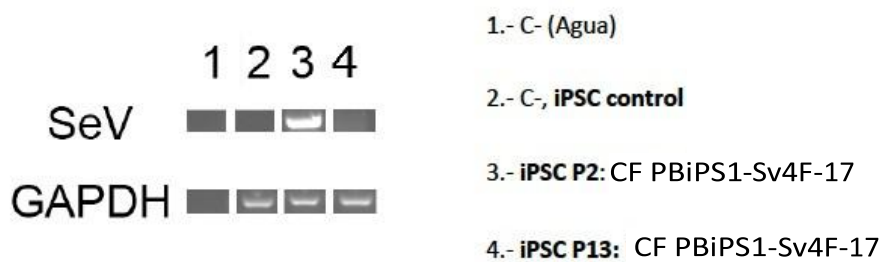
ANEXO 4: HUELLA GENÉTICA POR ANÁLISIS DE STR

	PBMCS ORIGEN	CF PBiPS1-Sv4F-17
D8S1179	12, 15	12, 15
D21S11	29, 31	29, 31
D7S820	12, 14	12, 14
CSP1PO	10, 12	10, 12
D3S1358	15, 18	15, 18
TH01	8, 9.3	8, 9.3
D13S317	8, 11	8, 11
D16S539	10, 12	10, 12
D2S1338	19, 24	19, 24
D19S433	13, 14	13, 14
vWA	14, 17	14, 17
TPOX	8, 9	8, 9
D18S51	10	10
AMEL	X, X	X, X
D5S818	11, 13	11, 13
FGA	21, 24	21, 24

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.



Silencing of exogenous factors

La línea iPSC, confirmó el silenciamiento en el **Pase13**, que muestra un resultado positivo en pases previos P2. Una iPSC establecida se usó como control negativo.

*The iPSC line confirmed silencing at **Passage13**, showing a positive result in previous passages, P2. An established iPSC line was used as the negative 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. Determinación realizada a **pase 16**

*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. Determination performed at **passage 16**.*

Muestra	Amplificación micoplasma	Amplificación control interno
Control -	-	+
Control +	+	+
CF PBiPS1-Sv4F-17	-	+