

PROPUESTA DE LOS REQUISITOS MÍNIMOS NECESARIOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS PLURIPOTENTES Y SU REGISTRO EN EL BNLC

Siguiendo las pautas establecidas en la “International Stem Cell Banking Initiative” del 2010 (1), y guiados por nuestra propia experiencia, se presenta la propuesta de los requisitos mínimos necesarios para caracterizar células humanas pluripotentes y su posterior registro en el BNLC, basado en la bibliografía actual (2).

1- Test de pluripotencia.

- a. Test de fosfatasa alcalina
- b. Test de detección de marcadores de pluripotencia, mediante inmunocitoquímica/microscopía o inmunocitoquímica/ citometría de flujo.
 - i. Marcadores mínimos: Se informará de al menos 5 de los siguientes marcadores:

Oct4, Nanog, Sox2, SSEA3, SSEA4, Tra-1-60, Tra-1-81.

2- Test de Diferenciación

Se presentarán resultados del potencial de diferenciación. Serán válidos para cumplir este requisito tanto resultados *in vitro* como *in vivo*. Se recomienda minimizar en posible el uso de animales de experimentación y el malestar animal derivado de la metodología a utilizar.

2.1 Test de diferenciación *in vitro* (EBs).

- a. Detección de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) en los *embryoid bodies* generados en placas de cultivo, mediante inmunocitoquímica. Mínimo un marcador por capa germinal

2.2 Test de diferenciación *in vivo* (teratomas).

Detección de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) en teratomas generados en ratones, mediante inmunohistoquímica sobre secciones del teratoma. Como mínimo un marcador por capa.

3- Cariotipo. Convencional por bandas G.

Cariotipo de las células en el momento de banqueo.

4- Identificación celular. Estudio de la huella genética mediante análisis de microsátélites/STR (*DNA fingerprinting*) realizado en la línea original y en la línea

generada. Se recomienda utilizar estos 9 marcadores: TH01, D21S11, D5S828, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, vWA y TPOX. La combinación de los nueve marcadores utilizados produce un perfil de alelos con una probabilidad de coincidencia por azar de 1 en 2×10^9 . Se usa además un marcador para identificar el sexo de la muestra (AMEL) y uno adicional específico de ratón para detectar la presencia de secuencias de este animal, que indicaría la presencia de contaminación a partir de células feeder.

- 4- Confirmación de diagnóstico genotípico. Solo en aquellas líneas que presentan una mutación genética causante de la enfermedad del paciente donante.
- 5- Test de integración/silenciamiento. Incluso en reprogramaciones no-integrativas, es necesario comprobar el silenciamiento. Mediante PCR.
- 6- Test micoplasma.
- 7- Pase que se entrega para registro y banqueo: Máximo, pase 15.

REFERENCIAS:

- (1)- Crook, J.M., Hei, D. & Stacey, G. International Stem Cell Banking Initiative: raising standards to bank on. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **46**, 169–172 (2010).
- (2)- Martí et al. Characterization of pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, **8** (2): 223-253, (2013).