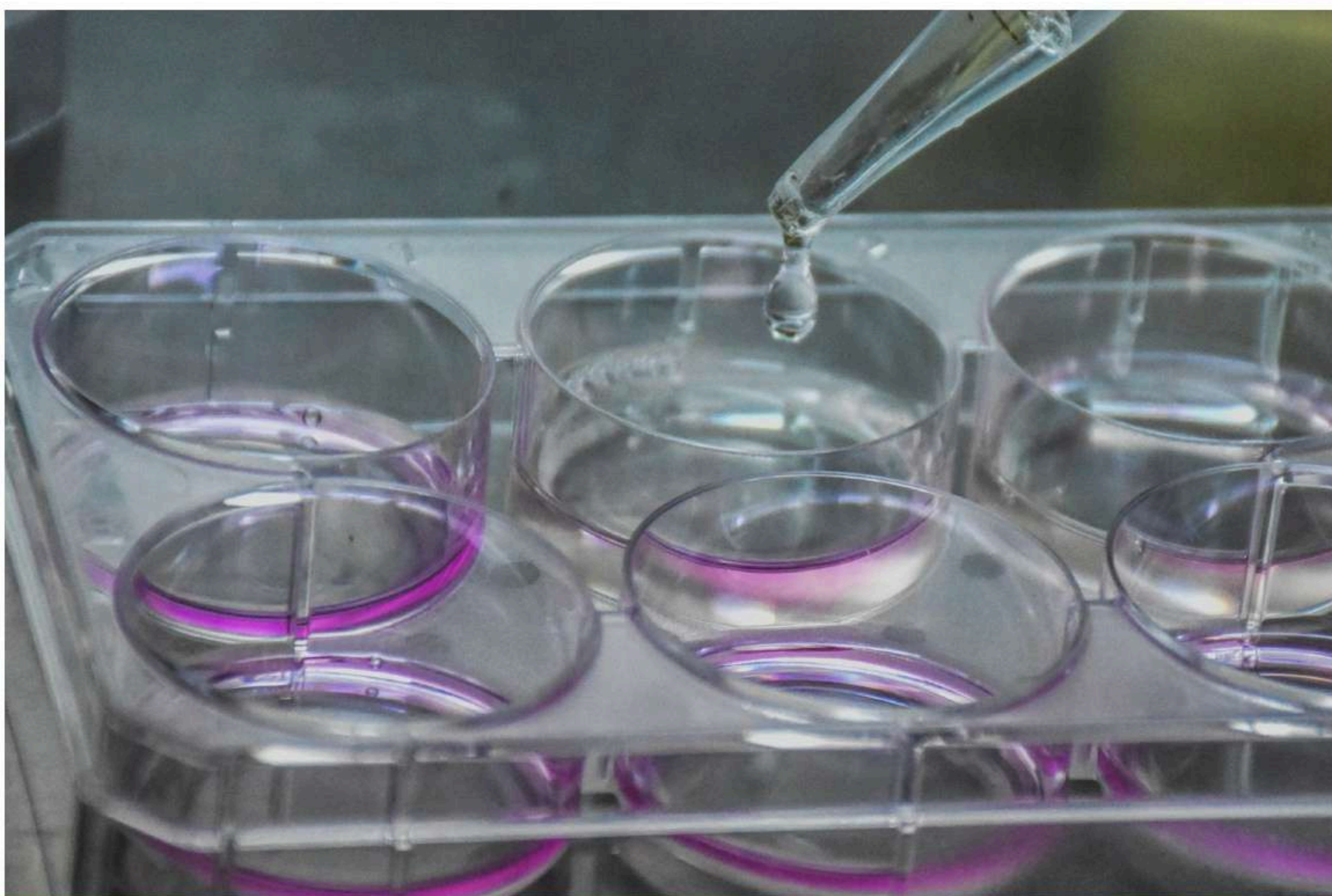




Verificación de la identidad de la línea celular FRhL-2 (*Macaca mulatta*) por biología molecular

Bottale, Alejandro Javier; Sen, Carina Noe; Mingo, Noelia; Maiza, Andrea Soledad; Céccoli, Constanza; Fossa, Sebastián Edgardo; García, Jorge Braulio; Fabbri, Cintia; Brignone, Julia Marina; Riera, Laura Marisa.

Resumen

La planta de producción del INEVH, fabrica la vacuna a virus vivo atenuado Candid#1 que previene la fiebre hemorrágica argentina (FHA), cuyo sustrato para la replicación viral es la línea celular Fetal Rhesus Lung – 2 (FRhL-2) de Macaca mulatta.

Las líneas celulares utilizadas en investigación, desarrollo y producción requieren controles de calidad periódicos ya que al ser modelos vivos pueden sufrir cambios a lo largo del tiempo.

El objetivo del presente trabajo fue realizar la puesta a punto y su posterior validación del ensayo de identificación de la línea celular FRhL-2 por técnicas de biología molecular, utilizando células certificadas inicialmente en su identidad mediante técnicas de cariólogía y/o isoenzimas.

El método por biología molecular seleccionado, utiliza la técnica de PCR monoplex con oligonucleótidos especie – específicos para amplificar los segmentos del gen mitocondrial que codifica para la subunidad I de la enzima Citocromo C Oxidasa (COI) y así obtener por electroforesis en gel de agarosa las bandas características de referencia de 287pb según Cooper y col. (2007).

Se realizaron 3 ensayos de amplificación por PCR de los segmentos del gen mitocondrial (COI). Tanto en el ensayo 1 de puesta a punto

como en el ensayo 2, se obtuvieron bandas de 287pb correspondientes a FRhL-2 (Macaca mulatta), confirmado por secuenciación de dichos segmentos.

En el Ensayo 3, realizado para distintos lotes de la línea celular FRhL-2, se observó la banda de 287pb característica de la especie celular FRhL-2 en todos los casos y diferenciándose de las células de ratón Mus musculus utilizadas como control, cuya banda característica es de 150pb según Cooper y col. (2007).

El presente método de identificación por biología molecular se consideró validado y apto para la verificación de especie de la línea celular FRhL-2 (Macaca mulatta).

Palabras clave: Autenticación, Macaca mulatta.

Introducción

Las líneas celulares utilizadas en investigación, desarrollo y producción requieren controles de calidad periódicos ya que al ser modelos vivos pueden sufrir cambios a lo largo del tiempo.

En el proceso de aseguramiento de la calidad de líneas celulares hay varios aspectos que deben ser considerados como: evaluación de las características de crecimiento, condiciones óptimas de cultivo y morfología; detección de contaminaciones, ya sean éstas físicas, químicas y biológicas; autenticación

y caracterización de cada línea celular y elaboración de las hojas de certificación con los resultados obtenidos.

Los bancos de células deben autenticarse mediante un método de identificación aprobado por la autoridad regulatoria nacional cuando son utilizados para la producción de biológicos de uso en humanos.

La utilización de modelos celulares mal identificados o contaminados anula los resultados obtenidos en cualquier procedimiento debido a que la línea celular deja de ser un modelo de estudio válido. Existen múltiples antecedentes de investigaciones invalidadas, para las cuales la pérdida de recursos como tiempo y dinero podría haberse evitado asegurando por los métodos adecuados la idoneidad del material de trabajo.

Siempre que sea posible, se deben utilizar métodos de prueba de identidad que proporcionen una identificación específica de la línea celular, a fin de confirmar que no se ha producido ningún cambio o contaminación cruzada importante de los cultivos durante el establecimiento del banco y la producción de células.

Históricamente se han utilizado diversas técnicas complementarias para la identificación de especies, entre ellas el perfil de isoenzimas y el análisis cromosómico.

El perfil de isoenzimas para verificación de especies presenta algunas limitaciones, es un método de baja sensibilidad, por lo cual los posibles contaminantes deben estar en una concentración elevada para ser detectados; no permite asegurar identidad del individuo ya que la detección de contaminación intraespecie presenta dificultades técnicas y además no se encuentra adecuadamente desarrollado para todas las especies.

Por otro lado, la cariólogía es una técnica especializada, que requiere recursos altamente formados para su correcta realización.

Las características fenotípicas de la línea celular, morfología y expresión génica, pueden utilizarse como métodos complementarios bajo ciertas circunstancias, pero al ser fuertemente influenciados por el medio de cultivo no son suficientes para asegurar la identidad.

La genómica aplicada en estudios taxonómicos utiliza la diversidad de las secuencias de ADN para identificar organismos.

La utilización del gen mitocondrial Citocromo

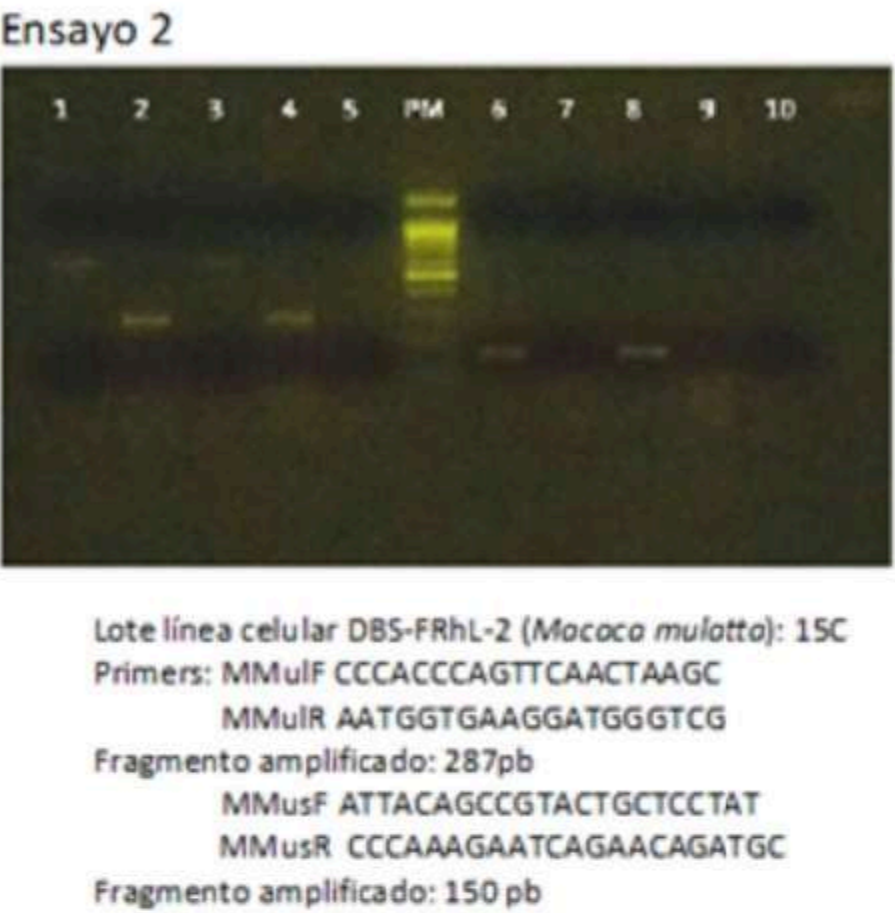
Fotografía 1. Resultado Electroforesis

Ensayo 1



Lote línea celular DBS-FRhl-2 (Macaca mulatta): 15C
Primers: MMulF CCCACCCAGTTCAACTAAGC
MMulR AATGGTGAAGGATGGGTCG
Fragmento amplificado: 287pb
Primers: MMusF ATTACAGCCGTACTGCTCTAT
MMusR CCCAAAGAATCAGAACAGATGC
Fragmento amplificado: 150 pb

Fotografía 2. Resultado Electroforesis



C Oxidasa I (COI) como procedimiento rutinario de identificación de especies se cita en las normas internacionales ANSI ASN 0003 (DNA barcodes).

La planta de producción del INEVH, fabrica la vacuna a virus vivo atenuado Candid#1 que previene la fiebre hemorrágica argentina (FHA), cuyo sustrato celular para la replicación viral es la línea celular Fetal Rhesus Lung - 2 (FRHL-2) proveniente de fibroblastos de pulmón fetal de mono Rhesus (*Macaca mulatta*). El INEVH emplea un sistema de bancos de dos niveles, Semilla Maestra y Semilla de Trabajo, tanto para los cultivos celulares

como para las semillas virales utilizadas para la producción, siguiendo los requisitos y lineamientos de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) entre otros.

El interés del estudio estuvo centrado en la puesta a punto y posterior validación del ensayo de identificación por técnicas de biología molecular de las líneas celulares que se encuentran en el INEVH, particularmente la línea celular utilizada como sustrato para la fabricación de la vacuna Candid #1, FRHL-2 (*Macaca Mulatta*) certificadas inicialmente

en su identidad mediante técnicas de cariólogía e isoenzimas.

Materiales y Métodos

Para las pruebas de PCR se procesaron varios lotes de células FRHL-2 (*Macaca mulatta*):

- Lote # 2 - Fecha elaboración 1998
- Lote # 8 - Fecha elaboración 2013
- Lote # 13C - Fecha elaboración 2015
- Lote # 14C - Fecha elaboración 2016
- Lote # 15C - Fecha elaboración 2016
- Lote # 17C - Fecha elaboración 2017

y la línea celular de fibroblastos de ratón *Mus musculus* (L-929) como control, certificados e identificados previamente por cariólogía y/o isoenzimas.

El método por biología molecular utiliza la técnica de PCR monoplex con oligonucleótidos especie – específicos para amplificar los segmentos del gen mitocondrial que codifica para la subunidad I de la enzima Citocromo C Oxidasa (COI) y así obtener por electroforesis en gel de agarosa, las bandas características de referencia según Cooper y col. (2007).

La metodología requirió de las siguientes etapas:

- Extracción del ADN total de células en cultivo, utilizando el kit DNeasyBlood and Tissue de Qiagen con columnas de sílica gel. El material de partida fueron células en cultivo, en número no mayor a 5×10^6 células para evitar saturación de la columna.
- Amplificación por PCR de segmentos del gen mitocondrial (COI) utilizando oligonucleótidos especie – específicos.

Primers:
MMuIF CCCACCCAGTTCAACTAAGC
MMuIR AATGGTGAAGGATGGGTCG

Fragmento amplificado: 287pb

Primers:
MMusF ATTACAGCCGTACTGCTCCTAT
MMusR CCCAAAGAATCAGAACAGATGC

Fragmento amplificado: 150pb

- Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos, para verificación de la banda electroforética característica para la línea celular.
- Secuenciación de dichos segmentos para confirmar la especie *Macaca mulatta* y *Mus*

Fotografía 3. Resultado Electroforesis

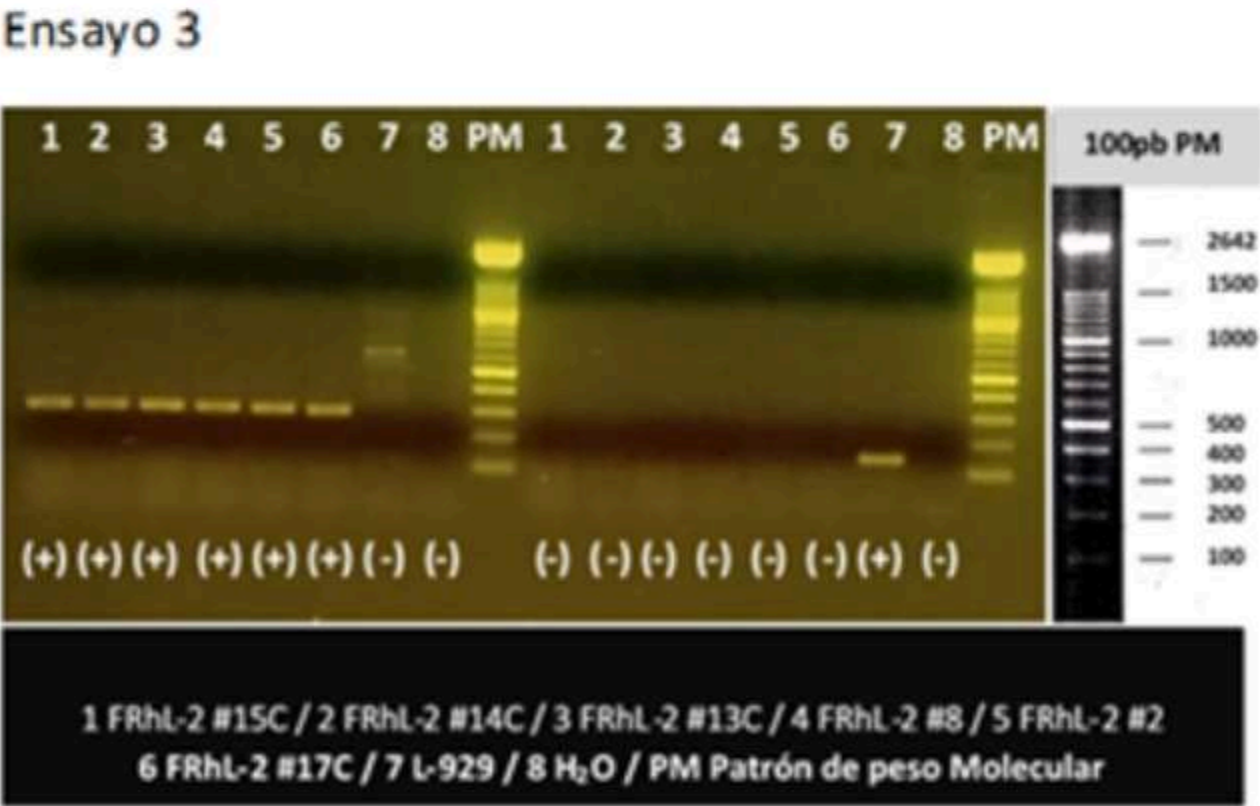


Tabla 1. Resultados de secuenciación de los oligonucleótidos amplificados por PCR en los ensayos 1 y 2.

Línea celular a verificar	Oligonucleótidos empleados para secuenciar	Sentido	Nº secuencia	Resultado
L929	LCO-1490	Directo	5727	Mus musculus 100%
	HCO-2198	Reverso	5728	Mus musculus 100%
	MmusR	Reverso	5731	Mus musculus 98,8%
Fhrl-2	LCO-1490	Directo	5729	Macaca mulatta 100%
	HCO-2198	Reverso	5730	Macaca mulatta 99,8%
	MmulR	Reverso	5732	Macaca mulatta 99,8%

musculus con secuenciador capilar, tecnología Sanger. Equipo Avant 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

- Comparación de las secuencias obtenidas con las depositadas en la base de datos no redundante del banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Resultados

En primera instancia se realizaron dos ensayos para la puesta a punto de la técnica utilizando en ambos casos sólo células FRhL-2 (Macaca mulatta) del Lote #15C y células L929 (Mus musculus) como control.

Se realizó la amplificación por PCR de los segmentos del gen mitocondrial que codifica para la subunidad I de la enzima Citocromo C Oxidasa, utilizando oligonucleótidos especie – específicos según Cooper et al. (2007) y su posterior electroforesis en gel de agarosa para obtener las correspondientes bandas.

En el ensayo 1 de puesta a punto de la técnica se obtuvieron bandas de 287pb correspondientes a FRhL-2 Macaca mulatta en posición 2 y 150pb correspondientes a Mus musculus en posición 4. Fotografía 1. En el ensayo 2 se obtuvieron bandas de 287pb en posiciones 2 y 4 correspondientes a FRhL-2 Macaca mulatta y bandas en posiciones 6 y 8 de 150pb correspondientes a Mus musculus, Fotografía 2.

Se confirmó por secuenciación de dichos segmentos obtenidos en ambos ensayos, a la especie Macaca mulatta y Mus musculus, comparando las secuencias obtenidas con las depositadas en la base de datos no redundante del banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante la utilización de la aplicación BLASTn (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Los resultados obtenidos de las secuencias se pueden observar en la Tabla 1.

El Ensayo 3 fue realizado utilizando los 6 lotes de la línea celular FRhL-2 Macaca mulatta antes mencionados y células L929 de Mus musculus como control, ambas líneas certificadas e identificadas en especie por el método de cariología y/o isoenzimas.

Se observó en las primeras 6 posiciones de la electroforesis correspondiente a las PCR, la banda de 287pb característica de la especie celular FRhL-2 (Macaca mulatta), y no así en la posición 7 correspondiente a otra línea celular de especie diferente, L929 (Mus musculus) utilizada como control. En todas estas PCR se usó la primers especie – específico para Macaca mulatta, Mmul-F y Mmul-R.

Por otro lado, utilizando los primers Mmus-F y Mmus-R específicos de especie para Mus musculus, sólo se observa la banda característica de 150pb en la posición 7, cuyo ADN

pertenece a la línea celular L-929 de ratón, y no así en las posiciones de 1 a 6, donde se encontraba el ADN corresponde a la línea celular FRhL-2 de Macaca mulatta. El resto de las posiciones utilizadas como controles, validan los resultados obtenidos para los lotes de la línea celular analizada, Fotografía 3.

El objetivo de la autenticación es confirmar o verificar la identidad de una línea celular, demostrando que deriva de la especie y el donante correctos. Idealmente, el método de prueba debería distinguir entre diferentes especies y diferentes individuos dentro de esa especie, aunque esto dependerá de la tecnología disponible en el campo de las pruebas de autenticación, por lo tanto, es posible que la autenticación no conduzca en todos los casos a una identificación inequívoca de las células de un origen específico.

Cuando no es posible una identificación inequívoca, la verificación de especies mediante métodos como la amplificación por PCR del gen mitocondrial Citocromo C Oxidasa I (COI) se utiliza como la mejor alternativa actualmente disponible. La aplicación de este método para la autenticación de la identidad de la línea celular FRhL-2 (Macaca mulatta) obtuvo un resultado satisfactorio que pudo ser documentado y validado, contribuyendo al aseguramiento de la calidad de un insumo crítico para la producción.

La aplicación de este método para la autenticación de la identidad de la línea celular FRhL-2 (Macaca mulatta) obtuvo un resultado satisfactorio.

Referencias

• Cooper, J. K., Sykes, G., King, S., Cottrill, K., Ivanova, N. V., Haner, R., & Ikonomi, P. (2007). Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 43(10), 344-351.

• Hebert, P.D.; Cywinska, A.; Ball, S.L.; deWaard, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. Proc Biol Sci 270 (1512):313–321; 2003a.

• Hebert, P.D.; Ratnasingham, S.; deWaard, J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc Biol Sci 270 Suppl 1:S96–9; 2003b.

• Korch, C. T.; Schweppe, R. E. (2023). Institutional Best Laboratory Practices for Cell Line and Tissue Sample Authentication to Ensure Valid, Reproducible and Robust Research. https://iclac.org/wp-content/uploads/ICLAC-Institutional-Best-Lab-Practices-Cell-Line-Authentication_COM-BO-2023.pdf

• Guidance for Industry Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research [February 2010]

• Annex 3, Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell Banks. Replacement of Annex 1 of WHO Technical Report Series, No. 878

• 21 CFR 610.18 - <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-F/part-610/subpart-B/section-610.18>