

## **Validación del ensayo para determinar la identidad de la línea celular FRhL-2 (*Macaca mulatta*) por biología molecular**

Bottale, Alejandro Javier; Sen, Carina Noe; Mingo, Noelia; Maiza, Andrea Soledad; García, Jorge Braulio; Fabbri, Cintia; Brignone, Julia Marina; Riera, Laura Marisa. Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio I. Maiztegui”. INEVH-ANLIS

### **Introducción**

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 FRhL-2 (*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 fue realizar la puesta a punto y su posterior validación del test de identificación de la línea celular FRhL-2 (*Macaca mulatta*), certificadas en su identidad mediante técnicas de cariología y/o isoenzimas, por técnicas de biología molecular.

### **Desarrollo: Materiales y Métodos**

Para las pruebas de PCR se utilizaron lotes certificados de células FRhL-2 (*Macaca mulatta*) y L-929 (*Mus musculus*) como control.

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:

- Amplificación por PCR de segmentos del gen mitocondrial (COI) utilizando oligonucleótidos especie – específicos.
- 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*.
- 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**

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*). Se confirmó por secuenciación de dichos segmentos, a la especie *Macaca mulatta*, 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).

En el Ensayo 3, realizado para distintos lotes de la línea celular FRhL-2 (*Macaca mulatta*), certificados e identificados en especie por el método de isoenzimas y cariología, se observó la banda de 287pb característica de la especie celular FRhL-2, y no así para la PCR correspondiente a la otra línea celular utilizada como control. En todas estas PCR se usó el primer especie – específico para *Macaca mulatta* Mmul-F y Mmul-R. Por otro lado, y como control, utilizando los primers Mmus-F y Mmus-R específicos de especie para *Mus musculus*, sólo se observó la banda característica de 150pb en la PCR correspondiente, cuyo ADN pertenecía a la línea celular L-929, y no así para el resto de las PCR. El resultado de los controles, validaron los resultados obtenidos para la línea celular analizada.

### **Conclusión**

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