

Base de datos “miSat15-STRCellProfiling”: una nueva herramienta para la autenticación de líneas celulares humanas

Álvaro Hernández-Vicente¹, César Flores Flores², Antonia Bernabeu Esclapez³, María José Jiménez Ruiz⁴, Tania López Martínez¹, María José López Andreo², María Azucena López Muñoz³, Antonio Maurandi-López⁵

Plataformas de ¹Apoyo Estadístico, ²Biología Molecular y ³Cultivo de Tejidos del IMIB; ⁴Bioidentity S.L.; ⁵Facultad de Educación, Universidad de Murcia



Antecedentes

Los casos de contaminación cruzada entre líneas celulares son comunes en investigación. Recientes artículos han constatado que hasta el 20 % de las publicaciones con células humanas se han realizado con líneas erróneamente identificadas, lo que ha implicado la revocación de artículos ya publicados. Esta situación ha llevado a las revistas de alto impacto a solicitar a los investigadores la verificación de la identidad de la línea celular utilizada (autenticación) siguiendo los criterios del *American National Standard Institute (ANSI)*

Métodos

Las plataformas **IMIB de Cultivo de Tejidos, Biología Molecular y Apoyo Estadístico**, en colaboración con la empresa **Bioidentity S.L.** han puesto a punto la técnica de Autenticación de Líneas Celulares Humanas mediante el análisis de los 8 marcadores genéticos de tipo STR (*Short Tandem Repeats*) plus amelogenina recomendados por ANSI en su documento "Authentication of human cell lines: Standardization of STR profiling"(ANSI/ATCC ASN-0002-2011). Además, en un intento de resolver casos dudosos que no se ajustan a las recomendaciones generales se han analizado 7 loci STR adicionales. Con los resultados obtenidos se ha elaborado una base de datos propia denominada “miSat15-STRCellProfiling”.

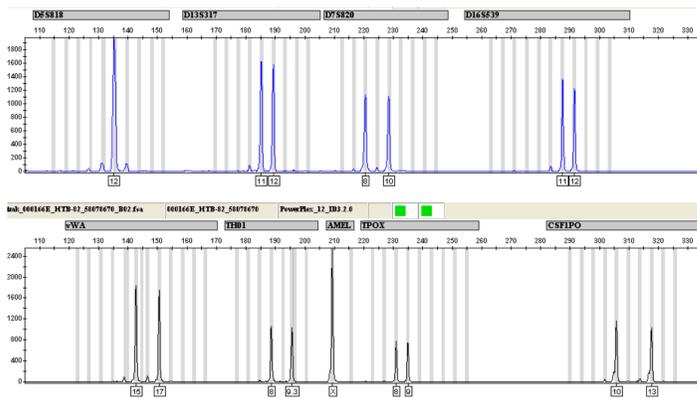


Fig. 2: Electroferograma obtenido en un analizador genético en el que se muestran los 8 marcadores STR empleados en autenticación estándar (tomado del documento de referencia)

Resultados

Se han analizado 86 líneas celulares, de las cuales 32 provinieron de la plataforma de Cultivo de Tejidos, 10 de departamentos de la Universidad de Murcia y 44 de otros cinco centros de investigación públicos de Murcia, Alicante y Valencia. Del total analizado, se puede asegurar que al menos un 8.1 % corresponde a líneas identificadas erróneamente por el investigador y un 1.2% a contaminaciones cruzadas.

Centro	Nº líneas analizadas	Nº líneas correctamente autenticadas	Misidentified	Cross-contaminated
Plataforma de Cultivo de Tejidos-IMIB	32	32	0	0
Departamentos UM	10	10	0	0
Otros	44	36	7	1
Total	86 (100%)	78 (90.7%)	7 (8.1%)	1 (1.2%)

Fig. 3: Número de líneas celulares analizadas hasta la fecha

Locus designation	Chromosome location	Alleles included in Identifier® Plus Allelic Ladder	Dye label
D8S1179	8	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	6-FAM™
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38	
D7S820	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
D3S1358	3p	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	VIC™
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3	
D13S317	13q22-31	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
D16S539	16q24-qter	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
D2S1338	2q35-37.1	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28	
D19S433	19q12-13.1	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2	NED™
vWA	12p12-pter	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	
TPOX	2p23-2per	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y	PET®
D5S818	5q21-31	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2	

Fig. 1: Tabla con los 15 marcadores utilizados en nuestro estudio, que se amplificaron con el kit AmpFISTR Identifier Plus de Applied Biosystems

Conclusiones

Las 32 líneas celulares provenientes de la plataforma de Cultivos de Tejidos del IMIB superaron el test de autenticación, es decir, se verificó su procedencia correcta. Estos datos son especialmente reveladores, ya que se trata de una unidad que observa con gran exactitud las *Good Cell Culture Practices*. Ello permite concluir que hay una correlación clara entre la observancia de tales prácticas y la ausencia de identificaciones erróneas o contaminaciones cruzadas en las líneas celulares empleadas en investigación.

Además de poner de relieve la importancia de incorporar la autenticación en la práctica rutinaria de cultivos celulares, este trabajo pretende llamar la atención sobre la conveniencia de incrementar el número de marcadores STR para resolver casos dudosos. Por ello, se han incorporado otros 7 marcadores STR en los análisis de autenticación, empleando para ello el kit *AmpFISTR Identifier Plus PCR Amplification* de *Applied Biosystems*, que incorpora los 15 loci STR además de la amelogenina.

Sin embargo, la mayoría de las actuales bases de datos públicas (ATCC, DSMZ, NCBI) utilizadas como referencia en autenticación no incorporan la información de los 7 loci adicionales. Para resolver este inconveniente, se ha elaborado una base de datos propia, que surge con el doble propósito de contener la información relativa a todos los marcadores STR, y de hacerla pública para que toda la comunidad científica pueda beneficiarse de ella.

Con el objetivo de que el usuario pueda buscar (a partir de 8 o 15 STR) en nuestra base de datos las líneas relacionadas con una dada, se ha implementado el algoritmo de comparación descrito en ANSI/ ATCC ASN-0002-2011 en una aplicación web Shiny denominada “miSat15-STRCellProfiling”.

App Shiny: <http://gauss.inf.um.es:8080/miSat15/>

Fig. 4: Detalle del resultado de una búsqueda con la App Shiny

Fig. 5: Detalle del resultado de una búsqueda con la App Shiny