

Padronização da técnica de eletroforese de isoenzimas para certificação de linhagens celulares

Standardization of isoenzymes electrophoresis technique for cell lines certification

RIALA6/1347

Ana Cristina Scarparo de MIRANDA, Cláudia Regina GONÇALVES, Tamiko Ichikawa IKEDA, Aurea Silveira CRUZ*

*Endereço para correspondência: Núcleo de Cultura de Células, Centro de Procedimentos Interdisciplinares, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, prédio da Virologia, 2º andar, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-902, e-mail: auracruz@ial.sp.gov.br

Recebido: 05.10.2010 – Aceito para publicação: 03.03.2011

RESUMO

A comprovação da espécie de origem é um dos itens da certificação de linhagens celulares, que pode ser feita por meio de técnica de eletroforese de isoenzimas. Com o objetivo de padronizar essa técnica, o grupo de estudo do Núcleo de Cultura de Células do IAL utilizou extratos celulares de diferentes espécies animais, que foram submetidos à eletroforese horizontal ou vertical em géis de poliacrilamida ou agarose, 100 V e 4 °C. A revelação das bandas para a enzima glicose 6-fosfato desidrogenase foi realizada com o auxílio de sais de tetrazólio. Observou-se a presença de uma única banda para cada linhagem celular testada, com os padrões de migração esperados para as diferentes espécies utilizadas, com exceção da linhagem bovina MDBK, que não apresentou uma das bandas, provavelmente em função de menor expressão dessa enzima. Após a avaliação dos resultados obtidos com os diferentes sistemas de eletroforese e géis testados, optou-se pelo uso de eletroforese horizontal em géis de agarose a 2%. A padronização e a implantação dessa técnica permitirão que o laboratório forneça linhagens celulares com o devido controle de qualidade.

Palavras-chave. isoenzimas, linhagens celulares, caracterização celular, contaminação cruzada.

ABSTRACT

The evidence of the species origin has been a crucial characteristic for cell line certification, which can be performed by isoenzymes electrophoresis. Aiming at standardizing the isoenzyme electrophoresis technique at the Cell Culture Nucleus of IAL, cell extracts from different animal species were investigated on horizontal or vertical electrophoresis using polyacrylamide or agarose gels, 100 V at 4°C. The glucose-6-phosphate dehydrogenase staining was carried out using tetrazolium salts. A single band for each tested cell line was detected, with the expected migration pattern for the different animal species used, excepting the bovine cell line MDBK which did not show one of the bands, probably due to low enzyme expression. After analyzing the results from different electrophoretic systems and gels testing, the horizontal electrophoresis with 2% agarose gels showed the best performance. This technique standardization and implementation will turn the laboratory be feasible in providing cell line with high quality control.

Keywords. isoenzymes, cell line, cellular characterization, cross contamination.

INTRODUÇÃO

As técnicas de culturas celulares permitiram grande avanço no desenvolvimento científico de várias áreas, mas a ocorrência de contaminação cruzada entre diferentes linhagens pode invalidar todo o resultado dos estudos que utilizam essas células. Os primeiros relatos de contaminação cruzada ocorreram nas décadas de 60-70 e estimativas recentes sugerem que 20 a 36% das linhagens celulares disponíveis possam estar contaminadas com outras¹⁻², o que vem sendo confirmado em diversas publicações³⁻⁵. Com o intuito de evitar esse problema, recomenda-se que os laboratórios utilizem apenas linhagens celulares certificadas, adquiridas de bancos de células reconhecidos que se responsabilizam pela caracterização das células¹⁻².

Um dos itens da certificação celular é a comprovação da espécie de origem da linhagem, que pode ser feita pela análise de isoenzimas por eletroforese. Essa técnica inicialmente era feita em géis de amido⁶⁻⁸, depois substituídos por um kit comercial (*Authentikit™ system*, Innovative Chemistry)⁹, o qual vem sendo utilizado por bancos de células internacionais¹⁰. No entanto, sua aquisição é difícil e os custos são altos, inviabilizando seu uso na rotina do laboratório.

O objetivo deste trabalho é a padronização e implantação da técnica de eletroforese de isoenzimas, utilizando géis de agarose ou poli(acrilamida), para a certificação das linhagens pertencentes ao acervo do Núcleo de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz, as quais são fornecidas a diversos laboratórios do país, tanto para uso em pesquisa como no diagnóstico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagens celulares

Foram utilizadas as linhagens celulares: NCTC clone 929 (tecido conjuntivo de camundongo, ATCC CCL-1), HeLa (carcinoma de cervix humana, ATCC CCL-2), RD (rabdiosarcoma embrionário humano, ATCC CCL-136), SIRC (córnea de coelho, ATCC CCL-60) e MDBK (rim bovino, ATCC CCL-22).

Essas células foram mantidas em estufa a 37 °C, na ausência de antibióticos. As linhagens celulares NCTC clone 929, HeLa e MDBK foram cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle em solução salina balanceada de Earle, 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 1 mM de piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino (SFB); as linhagens RD e SIRC foram cultivadas em partes iguais

de meio mínimo essencial de Eagle em solução salina balanceada de Earle e meio L-15, com 15% de SFB.

Preparo dos extratos celulares

Cada linhagem celular foi cultivada em garrafas de 25 ou 75 cm² por 2 a 8 dias. Com a monocamada formada, as células foram tripsinizadas, ressuspensas em volume conhecido de meio de cultura e a concentração ajustada para obter 1-3 x 10⁷ células. Esta suspensão celular foi centrifugada a 150 x g por 5 min a 8 °C e o sedimento lavado por 2 vezes com PBS (Solução Fosfatada Tamponada) gelada, seguido de centrifugação como descrito acima. As células foram ressuspensas em 200 µL de tampão de extração (2% de Triton X-100 em 50 mM de Tris e 1 mM de EDTA, pH 7,5 ± 0,1) e deixadas em gelo durante 20-30 min para lise. O extrato foi centrifugado a 1.900 x g por 5 min a 8 °C, aliqüotado e armazenado em freezer -70 °C até o uso (protocolo adaptado de *Laboratory Procedures for Animal and Human Cell Lines*¹¹).

Eletroforese da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD)

Os extratos celulares com solução de azul de bromofenol 0,015%/glicerol 2,5% (1-5 µL) foram submetidos à eletroforese em sistema horizontal LCV 7x8 (Loccus do Brasil), em géis de agarose ou poli(acrilamida). Géis de agarose (Ultrapure™ Agarose, Invitrogen) foram preparados nas concentrações 1 ou 2% em tampão Tris (Invitrogen) 0,375 M, pH 8,8 ± 0,1. Géis de poli(acrilamida) foram preparados nas concentrações 5 ou 7,5% (razão de acrilamida:bis-acrilamida 38,4:1) em tampão Tris 0,375 M, pH 8,8 ± 0,1, persulfato de amônio 0,06% e N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina 0,07% (TEMED). Neste caso, para obter uma polimerização uniforme foi utilizada uma placa de acrílico sobre o gel, deixando apenas a região do pente descoberta, que foi fechada pela adição de uma camada de água para isolar do contato com ar. O tampão de corrida utilizado foi Tris 25 mM/glicina (Invitrogen) 192 mM, pH 8,3 ± 0,1. As eletroforeses foram realizadas a 100 V e 4 °C, por 1:40 h (agarose) ou 2:30 h (poli(acrilamida)), com a adição de 1 mL de β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (β-NADP, Sigma Chemical Co.) 10 mg/mL ao tampão de corrida, no lado do cátodo.

Após a corrida, os géis foram incubados por cerca de 10 ou 30 min (agarose ou poli(acrilamida), respectivamente) a 37 °C no escuro, em solução

reveladora contendo glicose 6-fosfato 2,5 mM (Sigma Chem. Co.), Tris 0,05 M pH 7,5 ± 0,1, MgCl₂.6H₂O 0,01 M, β-NADP 0,5 mM, MTT (3-(4'-5'-dimetiltiazol-2-yl)-2,4-difeniltetrazólio brometo, Sigma Chem. Co.) 0,1 mg/mL e PMS (fenazine metossulfato, Sardi) 0,04 mg/mL (protocolo modificado de Hay et al.⁸). Ao final, os géis foram lavados em água destilada e os resultados registrados por fotografia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eletroforese de isoenzimas permite a identificação da espécie de origem das linhagens celulares através da comparação do padrão de migração das bandas obtidas em relação às células utilizadas como padrão e controle do ensaio, NCTC clone 929 e HeLa, respectivamente⁸. Para a enzima G6PD, a maioria das espécies apresenta apenas uma isoforma⁶⁻⁸. Uma exceção é a espécie humana, com duas isoformas, A e B, sendo que o tipo A migra mais rapidamente e está presente nas células HeLa¹².

Nossos resultados, utilizando géis horizontais de agarose ou poliacrilamida, mostraram a presença de uma banda em cada linhagem celular avaliada, que foi mais nítida nas maiores concentrações dos géis ensaiados (Figura 1). O padrão de migração foi o esperado para cada espécie (Figura 1). A única exceção foi a linhagem MDBK, de rim bovino, que apresentou apenas uma banda (Figura 1), enquanto vários autores mostraram a presença de duas bandas para esta espécie, ambas posicionadas acima da obtida na linhagem HeLa⁶⁻⁸. Mesmo após repetir a extração, aumentando a concentração de células e o volume de amostra aplicada, o resultado permaneceu o mesmo. Dados semelhantes foram encontrados com a mesma linhagem celular por outro grupo brasileiro¹³. Talvez a outra isoforma tenha menor expressão e, por isso, não foi detectada nessa linhagem, um fator que pode complicar a análise de isoenzimas⁸. Para evitar isso, a utilização de ao menos 3-4 enzimas diferentes é recomendada na literatura^{9,14}. Além da MDBK, nas células RD foi necessário ajustar o volume do extrato aplicado ao gel para que as bandas pudessem ser detectadas com intensidade próxima à obtida nas demais, sugerindo que as linhagens RD e MDBK possam apresentar uma menor expressão de G6PD (Figura 1).

Diversas variações na metodologia foram avaliadas para a padronização da técnica em nosso laboratório. No preparo dos extratos celulares foram

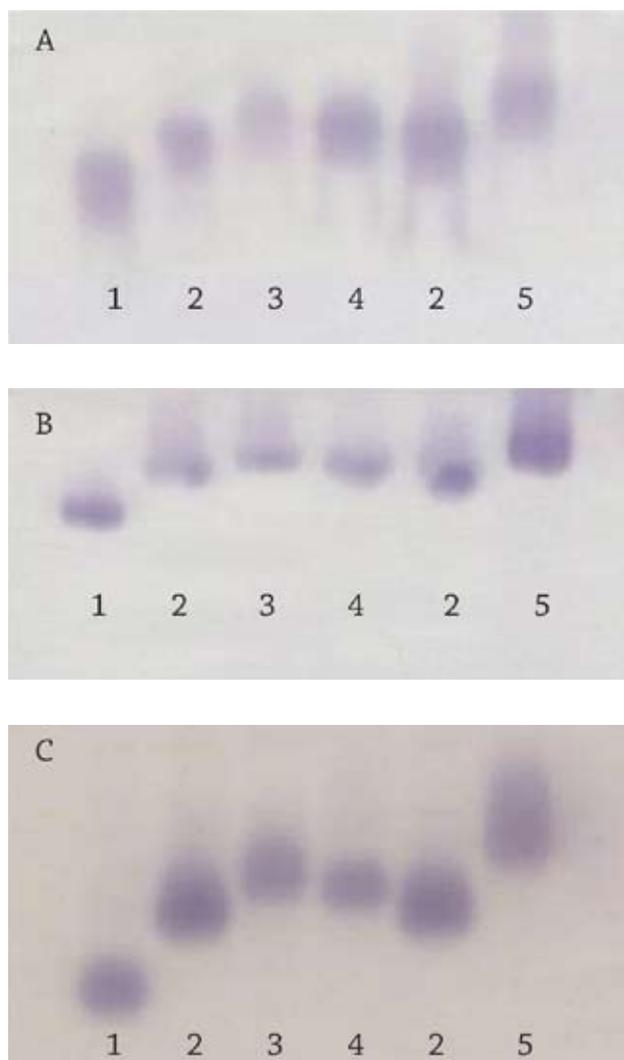


Figura 1. Resultados da eletroforese horizontal para G6PD em diversas linhagens celulares, em géis de poliacrilamida 5% (1A), 7,5% (1B) ou agarose 2% (1C) em tampão Tris 25 mM/ glicina 192 mM. Linhagens celulares: NCTC clone 929 (1), HeLa (2), RD (3), SIRC (4) e MDBK (5)

utilizados outros dois protocolos, de rompimento das células por congelamento e descongelamento^{8,13}, para os quais foram obtidos resultados semelhantes. Analisamos, também, eletroforese vertical com gel de poliacrilamida nas concentrações 5, 7,5, 10 e 12% e observamos que as linhagens celulares mantinham as diferenças de migração esperadas entre as diversas espécies, porém cada banda apresentou-se subdividida em 3, muito próximas umas das outras e bem definidas (Figura 2A). Para esta observação não foi encontrado nenhum relato na literatura. Com géis verticais de agarose 1 ou 2% foi identificada uma única banda para cada espécie, mas todas tinham a mesma distância de migração (Figura 2B). Outra variação foi a

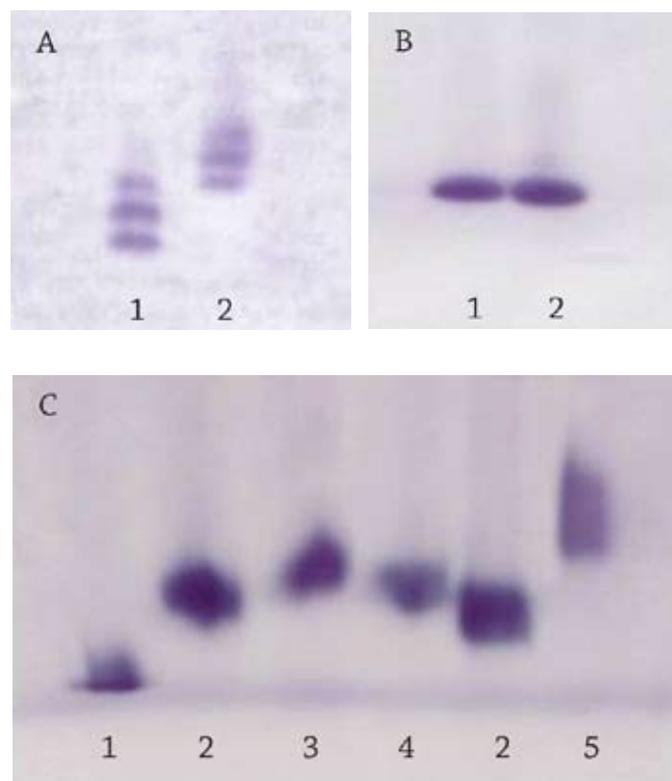


Figura 2. Resultados da eletroforese vertical para G6PD em diversas linhagens celulares, em géis de poliacrilamida 7,5% (2A), agarose 2% (2B) ou agarose 2% com glicerol 30% (2C) em tampão Tris 25 mM/glicina 192 mM. Linhagens celulares: NCTC clone 929 (1), HeLa (2), RD (3), SIRC (4) e MDBK (5)

adição de glicerol 15 ou 30% aos géis de agarose (protocolo modificado de Warren et al.¹⁵), permitindo identificar uma única banda para a G6PD em cada linhagem, as quais apresentaram o padrão de migração esperado para as espécies testadas (Figura 2C). Nessas condições, porém, as bandas obtidas foram menos definidas que nos ensaios feitos em sistema horizontal, um efeito aparentemente causado pela presença do glicerol.

Após observar os resultados obtidos e dada a maior praticidade na confecção e manipulação dos géis de agarose no sistema horizontal, pela rápida revelação das bandas e por não utilizar produtos tóxicos, optou-se pela utilização desse gel na rotina do laboratório. Essa técnica permitirá o maior controle de qualidade das nossas linhagens celulares, de acordo com os requisitos técnicos e científicos internacionais¹⁻².

REFERÊNCIAS

1. Masters JR, Thomson JA, Daly-Burns B, Reid YA, Dirks WG, Packer P et al. Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *PNAS*. 2001; 98 (14): 8012-7.
2. Nardone RM. Eradication of cross-contaminated cell lines: a call for action. *Cell Biol Toxicol*. 2007; 23 (6): 367-72.
3. American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup ASN-0002. Cell line misidentification: the beginning of the end. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10 (6): 441-8.
4. Barallon R, Bauer SR, Butler J, Capes-Davis A, Dirks WG, Elmore E et al. Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues. *In: Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2010; 46(9): 727-32.
5. Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RAF et al. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer* 2010; 127: 1-8.
6. Montes de Oca F, Macy ML, Shannon JE. Isoenzyme characterization of animal cell cultures. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1969; 132: 462-9.
7. O'Brien SJ, Shannon JE, Gail MH. A molecular approach to the identification and individualization of human and animal cells in culture: isozyme and allozyme genetic signatures. *In Vitro*. 1981; 16 (2): 119-35.
8. Hay RJ, Caputo J, Macy M. ATCC quality control methods for cell lines. 2nd ed. Rockville: American Type Culture Collection; 1992.
9. Nims RW, Shoemaker AP, Bauernschub MA, Rec LJ, Harbell JW. Sensitivity of isoenzyme analysis for the detection of interspecies cell line cross-contamination. *In: Vitro Cell Dev Biol - Animal* 1998; 34 (1): 35-9.
10. Nims RW, Herbstritt CJ. Cell line authentication using isoenzyme analysis. Strategies for accurate speciation and case studies for the detection of cell line cross-contamination using a commercial kit. *BioPharm Internacional* 2005; 12 (6). Disponível em: [<http://biopharminternational.findpharma.com/biopharm/article/articleDetail.jsp?id=166541&pageID=4>]
11. Laboratory Procedures for Animal and Human cell lines. Reference n° AHC/1998/3/3.1/2.2. Disponível em: [http://www.cabri.org/guidelines/animal/AHC_9833122.html]
12. Gartler SM. Apparent HeLa cell contamination of human heteroploid cell lines. *Nature*. 1968; 217 (5130): 750-1.
13. Fernandes MJB, Simoni IC. Caracterização de linhagens celulares: I- Identificação de espécies por análise isoenzimática. *Arq Inst Biol*. 1995; 62 (1/2): 59-63.
14. Stacey GN, Hoelzl H, Stephenson JR, Doyle A. Authentication of animal cell cultures by direct visualization of repetitive DNA, aldolase gene PCR and isoenzyme analysis. *Biologicals* 1997; 25: 75-85.
15. Warren CD, Krzesinski PR, Greaser ML. Vertical agarose gel electrophoresis and electroblotting of high-molecular-weight proteins. *Electrophoresis*. 2003; 24: 1695-702.