

ARTIGO

<https://doi.org/10.22239/2317-269x.01083>

A importância do controle de qualidade de culturas utilizadas em ensaios biológicos e no desenvolvimento de pesquisas na área de saúde

The importance of quality control of cultures used in biological assays and in research development in the health area

RESUMO

Aurea Valadares
Folgueras-Flatschart

Bruno Cosme Gomes

Fernanda Leve

Leonardo da Cunha Boldrini*

Introdução: Avanços na pesquisa científica baseiam-se nas descobertas previamente publicadas. Entretanto, há preocupação com a falta de reprodutibilidade nas pesquisas biológicas das áreas básica e pré-clínica, em função da repercussão na saúde da população. Como células cultivadas in vitro constituem a base para muitos estudos toxicológicos e terapêuticos, a preocupação com a qualidade destas torna-se primordial. Com relação aos contaminantes microbiológicos, embora bactérias e fungos sejam facilmente reconhecidos, vírus e micoplasmas são invisíveis na microscopia óptica. Outro problema delicado seriam os resultados gerados com células com identidade modificada. **Objetivo:** Discutir as principais metodologias para a garantia da qualidade de células utilizadas em ensaios in vitro e demonstrar como algumas coleções mundiais estão estruturadas para tratar esta questão. **Método:** Levantamento da literatura científica nas bases de dados PubMed e Scielo e na página da web de diferentes coleções biológicas até dezembro de 2017. **Resultados:** Recomenda-se a aplicação das seguintes técnicas para detecção de contaminantes em cultivos celulares: 1) vírus: o PCR e o isolamento viral; 2) micoplasmas: o PCR, a bioluminescência e a coloração das células com fluoróforo com afinidade ao DNA; 3) identidade de células humanas: o STR; 4) identidade de células não humanas: o Barcode. **Conclusões:** Considerando todo o investimento aplicado em pesquisa científica em âmbito mundial, o desenvolvimento de novas metodologias alternativas ao uso de animais e o consenso crítico do conceito de qualidade, conclui-se que qualquer laboratório deve garantir o controle de pureza e autenticidade de suas linhagens.

PALAVRAS-CHAVE: Linhagens Celulares; Pureza; Autenticidade; Reprodutibilidade

ABSTRACT

Introduction: Advances in scientific research are based on previously published findings. However, there is concern about the lack of reproducibility in the biological researches in basic and pre-clinical areas, due to the repercussion on the population's health. Because in vitro cultured cells are the basis for many toxicological and therapeutic studies, concern about their quality becomes paramount. Regarding microbiological contaminants, although bacteria and fungi are easily recognized, viruses and mycoplasmas are invisible under light microscopy. Another delicate issue would be the results generated with cells with modified identity. **Objective:** To discuss the main methodologies for assuring the quality of cells used in in vitro assays and to demonstrate how some world collections are structured to address this issue. **Method:** The scientific literature in the PubMed and Scielo databases and the webpage of different biological collections until December 2017. **Results:** It is recommended to apply the following techniques to detect contaminants in cell cultures: 1) virus: PCR and viral isolation; 2) mycoplasmas: PCR, bioluminescence and staining of cells with DNA affinity fluorophore; 3) human cell identity: the STR; 4) non-human cell identity: the Barcode. **Conclusions:** Considering all the investment applied in scientific research worldwide, the development of new methodologies alternatives to the use of animals and the critical consensus of the concept of quality, it is concluded that any laboratory should guarantee the control of purity and authenticity of its lineages.

Instituto Nacional de Metrologia,
Qualidade e Tecnologia (Inmetro),
Duque de Caxias, RJ, Brasil

* E-mail: lcboldrini@inmetro.gov.br

Recebido: 05 nov 2017

Aprovado: 15 jan 2018

KEYWORDS: Cell Lines; Purity; Authenticity; Reproducibility



INTRODUÇÃO

Os avanços na pesquisa baseiam-se na reprodutibilidade de dados e nas descobertas previamente publicadas. Por este motivo, há crescente preocupação com a falta de reprodutibilidade na pesquisa em geral, mais especialmente na biológica básica e pré-clínica, em função da repercussão na saúde da população. Na área de ciências da vida, temos como um dos mais importantes contribuintes para a falta de reprodutibilidade o uso de linhagens celulares isoladas de diferentes fontes humanas identificadas incorretamente (contaminação cruzada intra e interespécies) ou contaminadas por microrganismos como os micoplasmas^{1,2}. A falta de reprodutibilidade afeta um importante ponto da experimentação científica, pois, se experimentos não podem ser reproduzidos, eles não são úteis de forma alguma, implicando, no final, em desperdício de tempo e dinheiro.

O cultivo de células vem se desenvolvendo exponencialmente desde o século XIX a ponto de, na atualidade, células cultivadas *in vitro* servirem como ferramentas terapêuticas^{3,4,5}, modelos para estudo dos mais variados fenômenos e processos biológicos^{6,7,8,9} e estudos toxicológicos^{10,11,12,13,14}, entre outras aplicações. Ainda no contexto de cultivo celular e suas aplicações, é inegável a contribuição dos estudos *in vitro* na ciência regulatória, para a avaliação e registro de produtos. Estes estudos devem atender elevados critérios de qualidade visando a obtenção de resultados confiáveis e com reprodutibilidade aceitável.

Uma pesquisa recente realizada pelo grupo *Nature*¹⁵ revelou atitudes contraditórias dos pesquisadores em relação à falta de reprodutibilidade, pois, embora mais da metade dos cientistas concordem com este problema, apenas cerca de 30% reconhecem que esta se deva a dados errados. De fato, muitos consideram que os fatores mais importantes para a falta de reprodutibilidade são a competição e pressão para publicar, seguidos por pobre análise estatística e desenho experimental, entre outros fatores. Apenas um terço dos respondentes informaram estratégias para melhorar a reprodutibilidade (repetindo o estudo ou solicitando a outra pessoa para fazê-lo).

Por exemplo, na área da Biologia do Câncer, a iniciativa chamada *Reproducibility Project: Cancer Biology* (<https://elifesciences.org/collections/9b1e83d1/reproducibility-project-cancer-biology> - verificado em 24/10/2017), liderada pelo *Center for Open Science* (<http://centerforopenscience.org/> - verificado em 24/10/2017) e *Science Exchange* (<https://www.scienceexchange.com/> - verificado em 24/10/2017), visa replicar de forma independente os resultados selecionados de uma série de artigos de alto nível no campo da Biologia do Câncer. Antes da coleta de dados do estudo a ser replicado, o desenho experimental e os protocolos são revisados por pares e publicados; em seguida, os resultados são publicados como *Replication Study*.

A despeito desta estratégia ser interessante, pode-se buscar, inicialmente, a prevenção de falhas nos estudos *in vitro* atentando-se para dois importantes fatores: a autenticidade das células utilizadas no estudo e a ausência de contaminação microbiológica. Em outras palavras, é preciso implementar

rotinas para o controle de qualidade de linhagens celulares utilizadas na pesquisa científica¹⁶. Recentemente demonstrou-se que as fontes mais comuns de erro no laboratório que levaram a retratações são a contaminação (microbiológica e identificação incorreta) e os erros analíticos¹⁷. Assim, o objetivo desta revisão é apresentar o estado da arte quanto ao impacto de contaminantes microbiológicos e da autenticidade de células na pesquisa na área da saúde.

MÉTODO

Este estudo, elaborado como uma revisão integrativa, foi conduzido segundo metodologia descrita previamente¹⁸, pelo levantamento de artigos científicos entre 03 de julho e 30 de outubro de 2017, com o objetivo de tratar dos principais aspectos da qualidade de células e seu impacto na reprodutibilidade da pesquisa científica. A elaboração deste artigo contou com as seguintes etapas: 1) apresentar ao leitor os principais contaminantes microbiológicos em cultivos de células de mamíferos; 2) discutir a importância da autenticação da identidade das linhagens celulares em ensaios laboratoriais; 3) verificar, nas páginas da *web* de diferentes coleções biológicas do mundo, como a informação de controle de qualidade associada ao material biológico comercializado está disponível. O levantamento de literatura científica foi realizado por consulta às bases de dados PubMed e SciELO, empregando palavras-chave como: técnicas de cultivo celular/métodos, controle de qualidade, reprodutibilidade dos resultados, autenticidade celular, micoplasma, contaminação celular. Foram incluídos artigos publicados em inglês e português, sem restrição de ano de publicação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Contaminantes microbiológicos em cultivo de células de mamíferos

Os contaminantes microbiológicos mais comumente encontrados nas células são micoplasmas, vírus, bactérias e leveduras. Na maioria dos casos, as contaminações por bactérias e fungos são facilmente reconhecidas e, não sendo possível o descarte dessas culturas, elas são passíveis de tratamento com antibióticos. Entretanto, a contaminação com micoplasmas e vírus muitas vezes passa despercebida pois eles são invisíveis na observação direta ao microscópio óptico e nem sempre causam alterações na morfologia das células. Mesmo assim, podem ocorrer alterações como redução da taxa de crescimento, alterações cromossômicas ou no metabolismo de aminoácidos e ácidos nucleicos. Por estes motivos, a contaminação das células em cultura pode colocar em dúvida os resultados de ensaios *in vitro*, provocando atrasos, perda financeira e requerendo esforços para sua detecção e eliminação, quando possível¹⁹.

No caso das contaminações que acontecem por micoplasmas, o tratamento das culturas celulares é possível usando um ou mais antibióticos associados em protocolos *in house* ou mesmo produtos comerciais para este fim específico. Entretanto, é possível



que as células selecionadas ao final do tratamento apresentem algumas diferenças em relação à cultura original²⁰. Assim, é recomendável que, após submetida a este processo de descontaminação, as culturas tenham seu desempenho avaliado nos ensaios específicos em que serão utilizadas. Por este motivo, sempre que possível, recomenda-se dar preferência ao descarte da cultura contaminada e substituição por lote previamente testado, livre de micoplasmas. Já em casos de contaminações virais, este descarte é a única opção, pois não há forma efetiva de descontaminação.

Além das células que deram origem às culturas (linhagens celulares ou culturas primárias), outros insumos de origem animal utilizados na manutenção de culturas de células, tais como o soro fetal bovino (SFB) e a tripsina, podem ser a fonte de vírus ou micoplasmas contaminantes das culturas, assim como o uso de procedimentos inadequados de manuseio. Por suas consequências ou pela dificuldade (ou mesmo impossibilidade) do processo de descontaminação, a prevenção das contaminações microbiológicas é a melhor solução para este problema. Para isto, o monitoramento periódico de possíveis contaminantes em culturas celulares e seus insumos é essencial para a manutenção da qualidade das culturas celulares e garantia de confiança nos resultados dos ensaios *in vitro*.

No Brasil, Oliveira et al. trabalharam no desenvolvimento de metodologia para a detecção por reação em cadeia da polimerase (PCR) de alguns agentes adventícios como micoplasmas, circovírus porcino 1 (PCV1), vírus da diarréia viral bovina (BVDV)¹⁹ e o parvovírus suíno (PPV)²¹ e fizeram o levantamento destas contaminações em 88 culturas celulares, 13 amostras de soro fetal bovino e dez amostras de tripsina utilizados em oito laboratórios veterinários brasileiros (de rotina ou de pesquisa). Os resultados mostraram a ocorrência das seguintes taxas de contaminações das células: 34,1% com micoplasma, 35,2% com PCV1, 23,9% com BVDV e em mais de 50% com PPV. Genoma do BVDV foi detectado em duas amostras de SFB e do PCV1 em uma amostra de tripsina. Estes resultados demonstraram que a cultura celular, soro e tripsina utilizados por diferentes laboratórios mostram uma alta taxa de contaminantes. Vale destacar entre os resultados que: o DNA do micoplasma foi detectado em células de todos os laboratórios, o RNA do BVDV em metade deles e apenas 4,5% das culturas celulares analisadas foram negativas para a detecção de qualquer um dos contaminantes pesquisados. Os resultados são atribuídos à prática comum de troca de amostras de células entre laboratórios e ao uso de SFB ou tripsina sem avaliação prévia de possíveis contaminantes. Os autores evidenciam a necessidade do controle de contaminantes biológicos em laboratórios e bancos de células.

Para a detecção de micoplasmas, o método clássico é o de cultivo em meios específicos e, mesmo no Brasil, já era há muito sugerido como rotina nos laboratórios de culturas de células²². Entretanto, além de ser uma técnica demorada, por questões técnicas e de biossegurança, esta atividade requer pessoal experiente e instalações especiais²³. Ainda, como nem todos os micoplasmas são facilmente cultiváveis, alguns casos de contaminação podem passar despercebidas. Ao microscópio eletrônico os micoplasmas podem ser vistos no interior das células ou mesmo na superfície

da membrana celular, mas também requer equipamentos de alto custo e pessoal especializado. Assim, na prática, outros métodos são utilizados na rotina. A marcação de DNA das células fixadas em lâmina com corantes fluorescentes²⁴ é um destes métodos. Em células saudáveis o corante é visto ao microscópio óptico de fluorescência apenas no núcleo das células, mas nas células contaminadas por micoplasmas, o corante pode ser visto também pontilhando o citoplasma ao marcar o DNA deste parasita intracelular (a Figura 1 mostra a detecção de micoplasmas por DAPI). Já os testes enzimáticos, capazes de indicar no sobrenadante da cultura de células a presença de enzimas específicas dos micoplasmas, são bastante específicos e *kits* comerciais estão disponíveis para este fim. Kazemiha et al. comparam alguns métodos de detecção de micoplasma e indicaram o ensaio bioquímico como substituto do cultivo de micoplasmas²⁵. Em nosso laboratório, foi possível atingir no ensaio bioquímico sensibilidade equivalente a uma PCR². Este ensaio molecular, a PCR, atrai muita atenção porque é rápido, robusto e altamente sensível¹⁹, existindo comercialmente kits de PCR e qPCR e várias metodologias publicadas. Idealmente, o resultado de contaminação de uma cultura celular por micoplasma deve ser confirmado apenas com o resultado positivo em duas destas técnicas.

Para a detecção de contaminantes virais, o método clássico procura fazer o isolamento viral colocando uma alíquota do sobrenadante/lisado da cultura ou o insumo a ser testado sobre uma cultura de células susceptíveis sabidamente livres de contaminantes. Assim, a presença de vírus pode ser detectada por alterações morfológicas nessas células (efeito citopático) e/ou evidenciada com o uso de anticorpos antivirais marcados ou outros testes sorológicos ou moleculares. Esta metodologia, que depende da capacidade de multiplicação do vírus contaminante nas células susceptíveis, é a única cujo resultado positivo confirma diretamente a presença de partículas virais viáveis e, por este motivo, o isolamento viral é mandatório pelo *Food and Drug Administration* para a detecção de vírus em SFB (9 CFR 111.47)

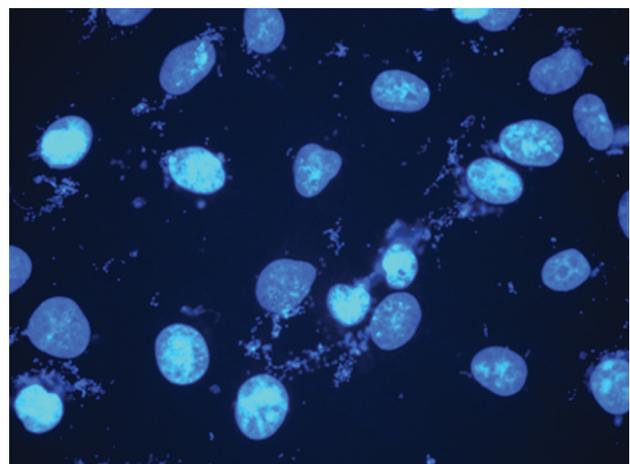


Figura 1. Células em monocamada contaminadas por micoplasmas e coradas com DAPI. São observados os núcleos corados, pela marcação do DNA e também o DNA dos micoplasmas presentes no citoplasma ou membrana das células, dando o típico aspecto de “céu estrelado”. Foto gentilmente cedida pelo Dr. Alberto Fraile-Ramos.



como o BVDV e parvovírus, entre outros²⁶. Além do isolamento, a realização extensiva de outros testes para agentes virais específicos é recomendada²⁷. Alguns destes podem detectar a presença de vírus, ou partes deles, buscando por atividades específicas (como hemaglutinação) ou a reatividade com anticorpos específicos (como vírus neutralização e imunoenaios). Já os testes moleculares detectam o DNA ou RNA viral por PCR ou RT-PCR, respectivamente. Para todos existem na literatura métodos e também kits comerciais que avaliam a presença de diversos vírus para este fim. A busca destes agentes adventícios pode ser trabalhosa, pois cada ensaio costuma detectar um tipo viral apenas. Por este motivo, não sendo possível a implantação de métodos validados no laboratório, recomendamos pelo menos a aquisição de insumos previamente testados e pedimos especial atenção aos detalhes dos ensaios incluindo a especificidade de cada um e o limite de detecção do teste. Estas informações não costumam estar facilmente disponíveis ao consumidor, mas são essenciais para a avaliação e comparação entre produtos²⁸. No caso da implantação no laboratório dos ensaios de detecção viral, estas informações são importantes também para a escolha do método, além da validação para o uso em cultura de células, pois pode haver efeito de matriz que altere a eficiência de kits de uso veterinário aplicados para esta atividade²¹.

Na maioria dos métodos descritos acima há a busca específica de determinado contaminante, desta forma, agentes não pesquisados ou desconhecidos não serão identificados. Para superar este viés, alguns autores têm sugerido que a metagenômica por sequenciamento de próxima geração (sequenciamento paralelo massivo) como metodologia imparcial para detectar vírus e outros agentes em soros e outros tecidos de animais. Usando metodologia Illumina (Illumina, San Diego, CA, EUA), Sadegui et al.²⁶ identificaram novos vírus em SFB e avaliaram que eles poderiam ter o potencial de contaminar culturas de células. Toohey-Kurth et al.²⁷ descreveram a aplicação de métodos metagenômicos (MiSeq, Illumina, San Diego, CA, EUA) para a detecção de vírus em soros bovinos obtidos a partir de fontes comerciais. Foram pesquisados 26 soros comerciais de 12 fabricantes independentes nos EUA, Austrália e Nova Zelândia, incluindo 20 SFB, e detectadas sequências de nove famílias virais e mais quatro vírus desconhecidos. A técnica foi tão sensível quanto uma RT-qPCR (reação de PCR quantitativo após transcriptase reversa), variando o número de vírus de 0-11 entre amostras e de 1-11 entre fornecedores, com apenas um produto de um fornecedor sendo inteiramente “limpo”. Os autores consideram que estas descobertas ilustram que confiar em painéis de testes específicos para vírus conhecidos (embora isso possa atender aos requisitos regulatórios) é inadequado para abordar o alcance completo do problema biológico. No futuro, espera-se que a metagenômica possa ser uma ferramenta qualitativa e quantitativa para o controle de qualidade de produtos biológicos derivados de soro, o próprio soro e, porque não, de culturas celulares.

Enquanto estas novas tecnologias não estão disponíveis para o controle de qualidade de culturas celulares e seus insumos, vão merecer nossa máxima atenção à qualidade das células que manipulamos no laboratório e dos produtos para cultura celular

que a ele chegam. Além disso, acreditamos que deve haver um maior esforço para melhorar as diretrizes e regulamentos para as atividades que envolvem culturas celulares.

Como exemplo desta iniciativa, observamos que vários protocolos preconizados pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE - www.oecd.org) para métodos alternativos ao uso de animais, que utilizam linhagens celulares, exigem que as mesmas sejam testadas quanto à presença de contaminação por micoplasmas: (i) Método OECD TG 129 - Estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica ([http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2010\)20&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2010)20&doclanguage=en)); (ii) Método OECD TG 432 - Teste de Fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU (<http://dx.doi.org/10.1787/9789264071162-en>); (iii) Método OECD TG 439 - Teste de Irritação Cutânea *in vitro* (<http://dx.doi.org/10.1787/9789264242845-en>); (iv) Método OECD TG 460 - Teste de Permeação de Fluoresceína (<http://dx.doi.org/10.1787/9789264185401-en>); (v) Método OECD TG 487 - Teste do Micronúcleo em Célula de Mamífero *in vitro* (<http://dx.doi.org/10.1787/9789264091016-en>); (vi) Método OECD TG 491 - Teste *in vitro* de curta duração para danos oculares (<http://dx.doi.org/10.1787/9789264242432-en>). Vale ressaltar que, no Brasil, os métodos acima são reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea), a partir das Resoluções Normativas nº 18, de 24 de setembro de 2014 e nº 31, de 18 de agosto de 2016. Com a publicação da RDC nº 35, de 07 de agosto de 2015, a Anvisa formalizou sua aceitação sobre os métodos alternativos de experimentação animal listados nas resoluções supracitadas, com substituição total do uso de animais para os desfechos relativos a estas metodologias a partir de 2019.

Autenticação de linhagens celulares humanas e não humanas

As linhagens celulares são o modelo mais utilizado em pesquisas biomédicas e na produção de produtos biológicos. A primeira linhagem estabelecida em 1952 foi extraída de uma paciente com câncer cervical (Henrietta Lacks) e, em homenagem a ela, a linhagem foi nomeada como HeLa²⁹. O modelo logo ganhou popularidade e novas linhagens foram estabelecidas, como, por exemplo a BT-20, a primeira linhagem proveniente de câncer de mama³⁰, e a MCF-7, também representativa de tumor mamário, porém metastático e isolado a partir de efusão pleural³¹.

No final dos anos 1950, surgiu o primeiro relato de identificação errônea/contaminação de uma linhagem celular. O caso foi descrito por Rothfels et al.³² em 1958. Desde então governos e institutos de pesquisa buscam dar visibilidade e combater o problema. Em 1962, foi criado o banco de células autenticadas da *American Type Culture Collection* (ATCC) (www.atcc.org) que testava todas as culturas celulares de origem humana e não humana por cariotipagem (padrão de bandas cromossômicas) ou por eletroforese de isoenzimas (técnica que permitiu a verificação da autenticidade celular em larga escala^{33,34,35,36}).

A cariotipagem foi a primeira técnica que permitiu a identificação de uma linhagem celular contaminada. Trata-se de uma



metodologia bem estabelecida e descrita em guia harmonizado³⁷ como teste *in vitro* a ser realizado para testar químicos para análise de aberrações cromossômicas de mamíferos. O método parte do princípio de que cada espécie apresenta um conjunto único de cromossomos e por isso tem sido utilizado na identificação de espécies de culturas primárias. Já na análise de linhagens celulares, a cariotipagem pode ser bastante complicada, uma vez que linhagens cultivadas por longos períodos de tempo estão sujeitas a diferentes condições experimentais e podem ser geneticamente instáveis, gerando heterogeneidade celular. De fato, a cariotipagem permite uma visualização geral do genoma e que seja feita a identificação de espécie de origem, dentro de um enorme espectro de espécies, utilizando uma mesma metodologia. No entanto, porque a cariotipagem se baseia na contagem e na análise estrutural dos cromossomos, o método é extremamente trabalhoso e com análise demorada, requerendo ao menos o espalhamento de 20 metáfases, mas usualmente entre 50-100, o que muitas vezes ainda é insensível na detecção de células contaminantes. Embora as análises padrão de células metafásicas podem não ter sensibilidade para detectar contaminação cruzada³⁸, podem determinar gênero, ploidia e estabilidade genética, mas de forma não muito precisa³⁹. Alguns sistemas automatizados que utilizam marcadores para cada cromossomo tornaram a técnica menos laboriosa, no entanto, de custo mais elevado⁴⁰. Assim, com o desenvolvimento de métodos mais rápidos, precisos e menos trabalhosos, o uso da cariotipagem para a autenticação de linhagens celulares, especialmente de origem humana, foi drasticamente reduzido, embora ainda útil em algumas situações pontuais, além de ampla utilização em outras aplicações como em diagnóstico.

Resumidamente, a análise de isoenzimas detecta polimorfismos de enzimas citosólicas por alteração em sua mobilidade eletroforética, que permitem discriminar linhagens celulares de diferentes espécies animais⁴¹. No entanto, as limitações da técnica incluem desde a correta escolha do conjunto de enzimas a serem analisadas até a dificuldade de interpretação dos resultados e de se encontrar kits comerciais para este ensaio. Ainda, técnicas baseadas em análise de DNA tendem a ser mais rápidas, mais baratas e mais sensíveis que aquelas baseadas em proteínas, o que fez com que a metodologia também tenha sido substituída por novas. A Tabela 1 sumariza as principais técnicas utilizadas em autenticidade de células humanas e não humanas, apresentando uma breve descrição dos princípios de cada metodologia bem como de suas aplicações.

Atualmente, a técnica recomendada para a genotipagem de linhagens celulares humanas é o perfil de *Short Tandem Repeat* (STR) (Figura 2), focado no uso de nove *loci* além da amelogenina (identificação sexual), com alguma variação entre diferentes bases de dados. Hoje, os marcadores escolhidos são: D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, D21S11, vWA, TH01, Amelogenina, TPOX, CSF1PO⁴².

É interessante destacar que, embora a análise de STR possa, em teoria, ser usada para a identificação de todas as espécies animais, atualmente o uso desses marcadores em bancos celulares

é específico para humanos e poucas iniciativas tentam aplicar essas metodologias em outras espécies⁴³. Como consequência, pouco é conhecido sobre o nível de erro na identificação de linhagens celulares animais bastante utilizadas na indústria, incluindo a produção de proteínas recombinantes, vacinas e outros produtos biológicos³⁸ e de contaminação interespecie. Embora *primers* para STR de camundongos estejam disponíveis, seu uso permanece um desafio uma vez que muitas linhagens celulares de camundongo são derivadas de um mesmo indivíduo, portanto indistinguíveis. Além disso, seria necessário desenvolver *primers* para todas as espécies com uso comercial, ou seja, identificar STR polimórficos confiáveis para discriminação intraespécie incluindo a participação de muitos laboratórios coletando dados de STR para a mesma linhagem celular a fim de se construir um consenso na identificação. Em conclusão, os ensaios de Barcode, cariotipagem por bandeamento G e análise de marcadores de superfície ainda são os métodos de escolha para caracterização de células não-humanas, por exemplo, conforme recentemente divulgado em um estudo que caracterizou um erro de identificação em uma linhagem celular de rato, a RGC-5⁴⁴.

Os *loci* de STR são regiões do genoma com conjuntos de nucleotídeos repetidos sequencialmente. Os STR variam de dois a sete nucleotídeos por unidade de repetição e costuma-se utilizar os *loci* de STR com quatro ou cinco nucleotídeos por repetição. Quanto menor é esse número menor será o fragmento total aumentando a probabilidade de sucesso para analisar DNA degradado (maioria das amostras forenses), contudo STR com dois ou três nucleotídeos por repetição costuma gerar mais artefatos que são inerentes à técnica, por esse motivo a melhor relação entre o menor tamanho de fragmento com menos artefatos são os STR com quatro ou cinco repetições^{45,46}.

O número de repetições é o alelo e pode ser igual ou diferente entre os indivíduos de uma população. Existem muitas centenas de *loci* de STR para humanos distribuídos em todos os cromossomos, o número de alelos possíveis (ou repetições) é finito e cada alelo possui uma frequência dentro da população e dos demes. Com base nessas características, foram selecionados 13 *loci* de STR (é comum referir-se, neste caso, ao *locus* gênico como marcador genético) para serem utilizados na identificação humana e investigação de paternidade dentro das ciências forenses. Por conta disso uma grande quantidade de material empírico foi gerada e disponibilizada por universidades, centros de pesquisa, perícia forense e empresas particulares^{47,48,49}.

Este investimento gerou um impacto positivo no desenvolvimento de equipamentos, procedimentos, validação e por consequência um amadurecimento do conhecimento da técnica tornando-a mais robusta, reprodutível, passível de automatização, relativamente barata e com inúmeros kits comerciais já validados disponíveis. Além disso, não é preciso um grande conhecimento técnico para executar o ensaio. Desta forma, foi a metodologia escolhida pela comunidade científica e implementada na norma ANSI/ATCC SDOW ASN-0002:2011^{33,35,42,50} que apresenta um processo compreensível para a execução do ensaio, incluindo requisitos relacionados à qualidade do ensaio.

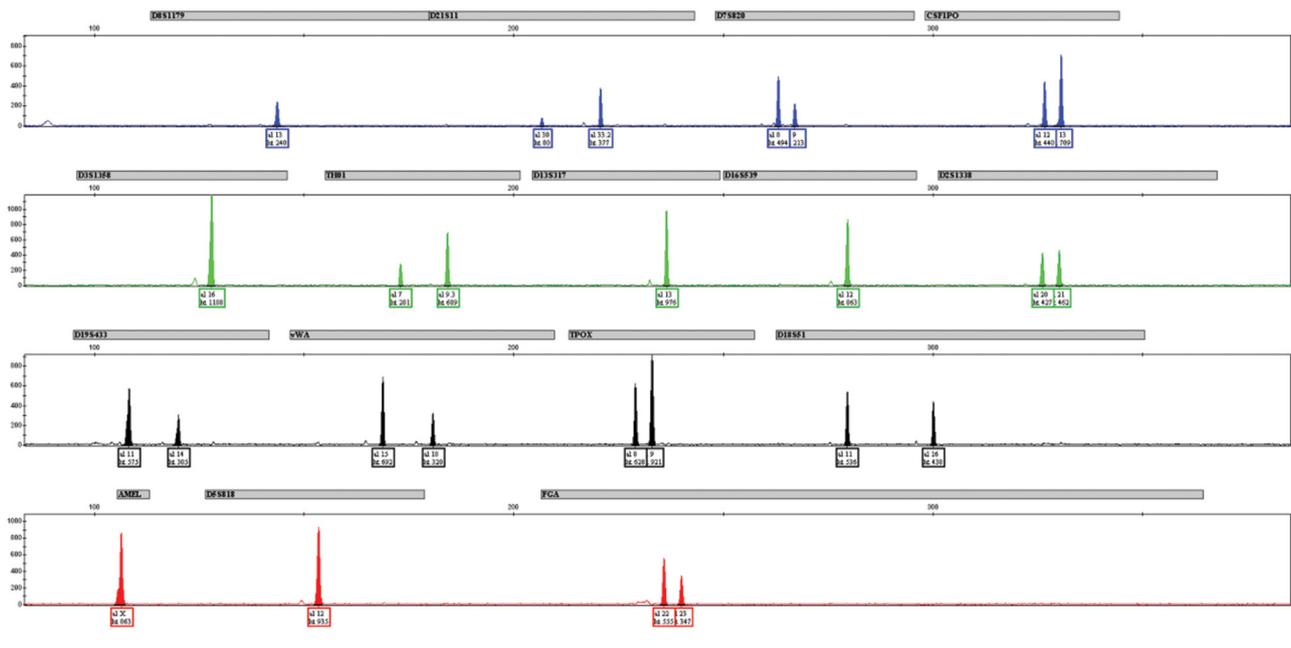


Figura 2. Perfil de STR. A figura representa um eletroferograma interpretado por um *software* específico. Os retângulos cinzas possuem o nome do marcador escrito e delimitam o intervalo de alelos conhecidos. Os picos representam os alelos (número de repetições), quanto mais à direita maior o tamanho do fragmento, conseqüentemente maior o número de repetições. Cada marcador (*locus* gênico) pode ter um pico (homozigoto) ou dois picos (heterozigoto), haja vista, que os humanos são diploides, um pico representa o alelo presente no cromossomo que herdou do pai e o outro pico o alelo no cromossomo que herdou da mãe. Em condições normais, o marcador que apresentar apenas um pico significa que ambos os cromossomos possuem o mesmo alelo. Para os marcadores com dois picos, em alguns deles, é possível perceber que há uma diferença grande de altura (desbalanço alélico), para humanos saudáveis se aceita uma diferença de até 30%, contudo as células imortalizadas ao longo das passagens podem apresentar essa diferença como resultado da degeneração genética, além disso, a presença de três ou quatro picos em um ou dois marcadores não é um evento raro.

Independente do *kit* utilizado o alelo será sempre o mesmo para um mesmo marcador em um mesmo indivíduo e por isso passíveis de comparação com os diferentes bancos de dados (Tabela 2). Além da possibilidade de buscar um determinado perfil pelo nome da linhagem e comparar manualmente, o *websoftware* CLIMA⁵¹

permite uma busca por perfil de STR utilizando os alelos. O CLIMA (http://bioinformatics.hsanmartino.it/clima2/index_test.php) faz uma busca dentre 5.450 perfis disponíveis em diferentes bases de dados e retorna como resultado as linhagens com pelo menos 60% de similaridade, organizadas com mais semelhante no topo da lista⁵¹.

Tabela 1. Comparação entre as principais técnicas utilizadas em autenticidade celular.

Técnica	Descrição	Aplicação	Ref
Análise cromossômica / cariotipagem	Envolve a preparação de um espalhamento de metáfase com bandas cromossômicas e coloração para identificar o número do cromossomo e marcadores.	Spp; Ind	(52)
Análise de isoenzimas	Método bioquímico de separação de isoenzimas por eletroforese; a mobilidade de isoenzimas pode variar entre indivíduos ou entre espécies. Kits disponíveis incluem o sistema de eletroforese em gel Authentikit.	Spp;Ind	(53,54)
“fingerprint” de DNA multilocus	Método molecular de detecção de comprimento dentro de minissatélites de DNA que contém um número variável de seqüências repetidas em tandem. A análise é feita por Southern blot usando sondas de DNA, fago de M13 ou seqüências de oligonucleotídeo.	Ind	(55,56)
Perfil de STR - Short Tandem Repeat	Método molecular de detecção de variação de comprimento dentro de regiões de microssatélite de DNA contendo um número variável de seqüências repetidas em <i>tandem</i> . A análise é por PCR/eletroforese capilar, a interpretação é dependente de um padrão de peso molecular e <i>software</i> específicos de cálculos.	Ind	(57,58)
SNP - Single Nucleotide Polymorphism	Método molecular de detecção de mutações em um único nucleotídeo. A análise é baseada na identificação de um base dentre duas opções conhecidas para cada locus. Enquanto que no STR o alelo é o número de repetições de um conjunto de nucleotídeos, aqui o alelo é um nucleotídeo (por exemplo, para a posição 55009062 do cromossomo 7 há um SNP cujos alelos são G e T, com frequência do T igual aproximadamente 25% como descrito em https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=712829). A grande vantagem desse marcador bi alélico é a capacidade de se trabalhar com amostras muito degradadas, a desvantagem é a necessidade de um número muito superior de loci que o STR.		(59,60)
DNA Barcode	Envolve o sequenciamento de um fragmento da subunidade 1 do citocromo oxidase C, um gene mitocondrial, a análise é feita pelo alinhamento das diferentes seqüências à mesma posição, as diferenças são computadas numa análise multivariada de agrupamento. O número de seqüências em base de dados públicas já alcança milhões. O DNA Barcode (Código de barras de DNA) tem se mostrado uma técnica prática para distinguir um grande número de espécies, virtualmente qualquer espécie que possua mitocôndria.	Spp	(61,62)

Spp=espécies; Ind=indivíduo ou linhagem; ref= referências.

STR: Short Tandem Repeat; SNP: Single Nucleotide Polymorphis; PCR: reação em cadeia da polimerase.



Tabela 2. Principais bancos de células com bancos de perfis genéticos.

Bancos de Célula	País	URL
ATCC	EUA	http://www.atcc.org/
Cell Bank of Australia	Austrália	http://www.cellbankaustralia.com/
DSMZ	Alemanha	http://www.dsmz.de/
ECACC	Reino Unido	http://www.hpacultures.org.uk/collections/ecacc.jsp
ICLC	Itália	http://www.iclc.it/
JCRB	Japão	http://cellbank.nibio.go.jp/
RIKEN	Japão	http://www.brc.riken.go.jp/lab/cell/english/guide.shtml

ATCC: American Type Culture Collection; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; ECACC: The European Collection of Cell Cultures; ICLC: Interlab Cell Line Collection; JCRB: Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank; RIKEN: Designated National Research and Development Institute.

Linhagens celulares imortalizadas podem sofrer com diferentes alterações genéticas ao longo de suas passagens, com reflexo em seu perfil de STR. O *International Cell Line Authentication Committee* (ICLAC - [iclac.org](http://www.iclac.org)), um comitê internacional para autenticidade celular, e a norma ANSI/ATCC SOW ASN-0002⁴² sugerem que uma concordância na identidade entre o perfil de referência e o perfil questionado de até 80% ainda indica autenticidade, ou seja, que as células são provenientes de um mesmo doador. Este é o padrão adotado mundialmente que permite uma intercomparabilidade de resultados. Apesar de bem estabelecida existem poucos trabalhos de levantamento de contaminação.

Estima-se que de 18,0% a 36,0% de todas as culturas utilizadas no mundo possuam algum erro, seja de autenticidade, contaminação intra ou interespecífica^{63,64}. No Brasil os dados sugerem que 12,0% (11/91) das culturas estejam contaminadas ou mal identificadas⁶⁵, enquanto o *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ) reportou 17,9% (45/252)⁶³. Ainda, o Banco Nacional de Células do Irã encontrou erro em 18,9% das culturas (10/53)⁶⁶, o *Bioresource Collection and Research Center of China* (BCRCC) em 16,3% (17/104)⁶⁷, e o *China Infrastructure of Cell Line Resource* (CICR) em 20,7% (100/482)⁶⁸.

É interessante notar que, embora haja uma iniciativa do ICLAC em divulgar as linhagens celulares erroneamente identificadas (incluindo 24 linhagens de células não humanas dentre as 488 linhagens relatadas por terem erros em sua identidade)⁶⁹, o guia de autenticação de células disponibilizado pelo próprio comitê atualmente contempla apenas células de origem humana⁶⁹. Portanto, há uma grande possibilidade de haver subnotificação desses dados, considerando que embora órgãos regulatórios exijam também a autenticação de linhagens celulares não humanas, não há consenso no melhor método a ser utilizado para tal, o que permite que sejam utilizados métodos bioquímicos, imunológicos ou citogenéticos (Tabela 1), nem sempre implementados na rotina dos laboratórios.

Nesse sentido, o uso do Barcode de DNA vem sendo preconizado como método de escolha para determinar a espécie de uma linhagem celular. Trata-se da análise de um gene mitocondrial conservado, com variação na sequência intraespécie, o que permite o desenvolvimento de um ensaio de especiação de vertebrados e invertebrados baseado em PCR^{61,70}. A análise do citocromo C oxidase I (COI), um fragmento de aproximadamente 700 pares de base (pb), é extensivamente utilizada para identificação em nível

de espécie, permitindo identificação de linhagens celulares, alimentos e outros produtos de origem animal, amostras forenses, entre outros. O método surgiu através de um consórcio formado principalmente por museus, que precisavam de um método mais confiável de identificação de espécies, além da extensiva análise morfológica⁷¹. Posteriormente, houve intenso interesse de órgãos regulatórios em virtude da crescente necessidade do mercado em fiscalizar adulterações e fraudes especialmente em alimentos. O Barcode de DNA é uma ferramenta riquíssima com grande potencial por ser relativamente simples e rápida, podendo substituir com sucesso técnicas mais trabalhosas e menos reprodutíveis como a tipagem bioquímica por isoenzimas ou a cariotipagem. Considerando que a publicação da norma ANSI/ATCC ASN-0002 em 2011 fez com que a análise de fragmentos para identidade de células humanas passasse a ser realizada por repositórios de célula por todo o mundo, é esperado que, com a publicação da norma ANSI/ATCC ASN-0003 de 2015 (<https://webstore.ansi.org/RecordDetail.aspx?sku=ANSI%2fATCC+ASN-0003-2015>), o método de Barcode de DNA seja difundido e amplamente utilizado na identificação de linhagens celulares não humanas, ao menos reduzindo o problema do grande desconhecimento sobre as contaminações interespecíficas em linhagens celulares.

O uso de linhagens celulares contaminadas conduz a resultados, via de regra, errôneos e não reprodutíveis. As publicações com esses dados custam milhares de dólares, geram uma confusão que pode levar anos para ser elucidada e por consequência um atraso significativo no avanço da ciência. Por exemplo, Dirks et al.⁷² apresentaram dados apontando que a linhagem de célula endotelial ECV-304 havia se tornado um subclone da linhagem T24, células de carcinoma de bexiga, provavelmente por uma contaminação no laboratório de origem⁴⁴. Apesar disso, mais de 500 trabalhos foram publicados após a divulgação do problema⁷³, a validade dos resultados é questionável e certamente não comparável.

A questão torna-se ainda mais alarmante quando levantados os impactos financeiros. Nos Estados Unidos¹⁵, foi estimado que são gastos pelo menos 28 bilhões de dólares em pesquisas biomédicas não reprodutíveis. Linhagens celulares mal identificadas ou contaminadas são relacionadas como um dos fatores que contribuem para esse cenário. Apesar de uma análise de STR ser capaz de identificar uma identificação errônea ou contaminação e ser relativamente de baixo custo (aproximadamente 200 dólares por amostra) apenas um terço dos laboratórios testam suas linhagens



regularmente⁷⁴. A Figura 3 ilustra um perfil contaminado, em comparação a Figura 1 fica claro que a amostra celular continha mais de um tipo. Freedman et al.¹⁶ exemplificaram bem a questão: um pesquisador acadêmico financiado pelo *National Institute of Health* (NIH) recebe em média USD 450.000,00. Ele gastaria apenas 0,2% de todo recurso para validar a identidade as células compradas e seu próprio estoque. No total o NIH investe USD 3,7 bilhões em pesquisas que utilizam linhagens ou culturas de células, um quarto desses projetos utilizam linhagens celulares com algum tipo de problema que representa 750 milhões de dólares e acelerariam o progresso da pesquisa e o desenvolvimento de novos tratamentos para doenças¹⁶.

Nardone³⁵ e Nelsson-Rees et al.³⁶ são considerados as duas maiores referências na busca pela erradicação do uso de células contaminadas ou não autênticas e propuseram, dentre outras coisas, que grandes periódicos científicos e até mesmo agências de fomento exigissem comprovação da autenticidade das culturas utilizadas nos projetos/artigos. Apesar de esta prática não ter sido completamente adotada, surtiu algum impacto positivo, sobretudo na cultura mundial de verificação de contaminantes em culturas. Já Capes-Davis et al.⁷⁵ optaram pela profilaxia e pesquisaram as principais fontes de erros: inventariamento incorreto, rotulagem, erros tipográficos, nomes semiapagados, manipulação simultânea de diferentes linhagens e utilização da mesma pipeta em diferentes culturas⁷⁵.

Mesmo com a técnica de STR sendo rotineira em muitos laboratórios de biologia molecular, celular e genética, no Brasil, apenas o Laboratório de Bioengenharia Tecidual (Labio_ do Inmetro) a oferece como um serviço normatizado para a comunidade científica, indústria e centros de pesquisa e tecnologia.

Apesar disso, menos de 10 instituições já solicitaram o serviço e destas, menos de cinco são solicitantes frequentes. A exceção de duas, todas as instituições estão no Sudeste. Na busca por uma mudança de cultura serão oferecidos cursos de autenticidade e pureza celular para os laboratórios da Rede Nacional de Métodos Alternativos (Renama).

Apesar dos esforços de diferentes grupos em chamar a atenção para a questão da autenticidade das culturas celulares, que remontam há mais de três décadas, ainda hoje temos alguns números preocupantes⁶⁸, principalmente vindos de países que demoraram mais a incutir a cultura de verificar suas linhagens. Por outro lado, como algo positivo, temos que autenticidade e pureza celular deixaram de ser uma preocupação apenas do eixo Estados Unidos-Europa-Japão para se tornar um movimento mundial de governos, empresas e pesquisadores em prol de uma ciência mais reprodutível e de qualidade.

Panorama atual do controle de qualidade de células realizado por coleções biológicas

Em 2014, Geraghty et al.⁷⁶ sugeriram diretrizes para o uso de linhagens celulares em pesquisa biomédica. Dentre estas diretrizes, a primeira delas diz que é recomendável que as linhagens de um estudo sejam adquiridas de uma coleção biológica reconhecida. Nesse sentido, é consenso entre as diversas coleções internacionais a importância dos testes de identificação de perfil genético humano por STR e da avaliação de contaminação por micoplasmas. Dependendo da infraestrutura disponível ou do investimento em outras técnicas, análises de contaminação viral também são disponibilizadas. Muitos dos bancos, além de

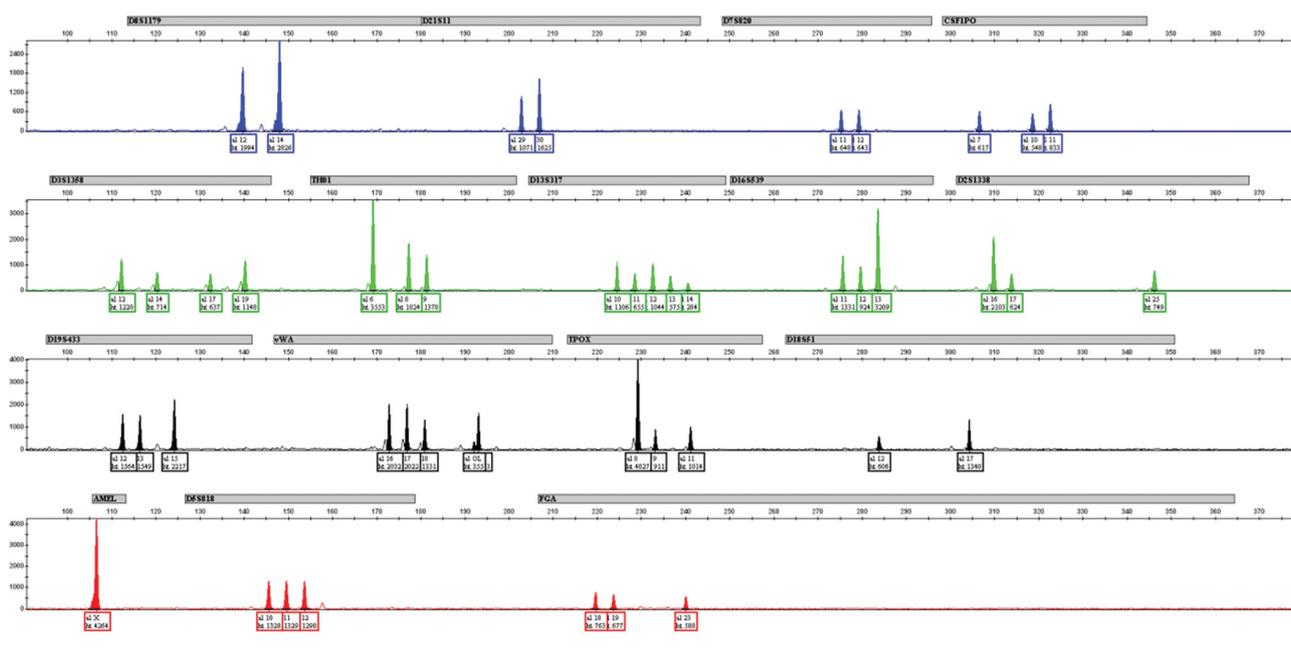


Figura 3. Perfil de STR mostrando uma contaminação. A identificação da mistura de DNA de dois ou mais indivíduos é indubitável, como já explanado cada marcador deveria apresentar no máximo dois picos (humanos são diploides), excepcionalmente aceita-se uma trissomia em um ou dois marcadores. Na imagem praticamente todos os marcadores apresentam tri- ou tetrasomia, ou seja, três a quatro picos indicando a contaminação cruzada entre dois ou mais indivíduos (linhagens celulares). O desbalanço alélico, ou seja, a diferença na altura entre dois picos dentro do mesmo marcador indica que aquele alelo está recebendo uma contribuição maior que o(s) outro(s) alelo(s).



Tabela 3. Tabela demonstrativa do controle de qualidade de linhagens distribuídas e de demais serviços oferecidos por coleções biológicas internacionais.

Coleção Biológica	Controles de qualidade das linhagens celulares de seu acervo	Serviços oferecidos
ATCC (EUA)	<ul style="list-style-type: none">• Perfil de STR (linhagens humanas)• Testes de esterilidade para bactérias, fungos e micoplasmas• Testes de detecção viral para HBV, citomegalovírus, HIV, EBV, HPV	<ul style="list-style-type: none">• Análise de perfil genético humano por STR• Análise de contaminação de micoplasmas por cultivo• Análise de contaminação de micoplasmas por fluorescência• Distribuição de linhagens celulares
Cell Bank of Australia	<p>O banco comercializa linhagens do ECACC, submetidas ao controle da origem. Porém, em linhagens exclusivas de seu acervo, realiza os controles de:</p> <ul style="list-style-type: none">• Perfil de STR (linhagens humanas)• Barcode para identificação da espécie• Testes de esterilidade para micoplasmas	<ul style="list-style-type: none">• Análise de perfil genético humano por STR• Identificação de espécies para linhagens não humanas por Barcode• Análise de contaminação de micoplasmas por PCR• Análise de contaminação de micoplasmas por Bioluminescência• Distribuição de linhagens celulares
DSMZ (Alemanha)	<ul style="list-style-type: none">• Testes de esterilidade para micoplasmas• Imunomarcagem de proteínas de membrana e citoesqueleto• DNA fingerprinting• Barcode para identificação da espécie• Cariotipagem• Análise de contaminação viral por HBV, HCV, EBV, HHV-8, HHV-4, HIV-1, HIV-2, HTLV 1 e 2, HPV, SMRV, XMRV	<ul style="list-style-type: none">• Análise de perfil genético humano por STR• Análise online de perfil de STR obtido pelos clientes• Identificação de espécies para linhagens não-humanas por Barcode• Análise de contaminação de micoplasmas por PCR• Análise de contaminação de micoplasmas por cultivo• Serviço de descontaminação de linhagens com micoplasmas• Serviço de detecção viral: HBV, HCV, EBV, HHV-8, HHV-4, HIV-1, HIV-2, HTLV 1 e 2, HPV, SMRV, XMRV• Distribuição de linhagens celulares
ECACC (Reino Unido)	<ul style="list-style-type: none">• Análise de perfil genético humano por STR• Análise online de perfil de STR obtido pelos clientes• Identificação de espécies para linhagens não humanas por Barcode• Análise de contaminação de micoplasmas por PCR• Análise de contaminação de micoplasmas por cultivo• Análise de contaminação de micoplasmas por cultivo• Análise de contaminação microbiológica e identificação de bactérias e fungos	<ul style="list-style-type: none">• Análise de perfil genético humano por STR• Análise online de perfil de STR obtido pelos clientes• Identificação de espécies para linhagens não-humanas por Barcode• Análise de contaminação de micoplasmas por PCR• Análise de contaminação de micoplasmas por cultivo• Análise de contaminação de micoplasmas por fluorescência• Análise de contaminação microbiológica e identificação de bactérias e fungos
ICLC (Itália)	<ul style="list-style-type: none">• Identificação de espécies por isoenzimas• Identificação de espécies por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos• Identificação de linhagens humanas por STR• Testes de esterilidade por micoplasmas	<ul style="list-style-type: none">• Análise de contaminação de micoplasmas por PCR• Análise de contaminação de micoplasmas por ensaios bioquímico• Análise de contaminação de micoplasmas por fluorescência• Distribuição de linhagens celulares
RIKEN (Japão)	<ul style="list-style-type: none">• Análise de perfil genético humano por STR• Identificação da espécie por Isoenzimas e PCR• Identificação da linhagem de camundongo por SSLP• Identificação dos contaminantes virais HBV (oriundas de fígado), HCV (fígado), HIV (sangue), HTLV-1 (sangue) e EBV (sangue e tumores)• Teste de esterilidade de micoplasmas por PCR e isoenzimas	<ul style="list-style-type: none">• Distribuição de linhagens celulares
BCRJ (Brasil)	<ul style="list-style-type: none">• Análise de perfil genético humano por STR• Teste de esterilidade de micoplasmas por Bioluminescência, PCR e/ou fluorescência• Teste microbiológico para esterilidade de bactérias e fungos	<ul style="list-style-type: none">• Testes de avaliação de contaminação de micoplasmas por Bioluminescência ou PCR• Distribuição de linhagens celulares

STR: Short Tandem Repeat; SNP: Single Nucleotide Polymorphis; PCR: reação em cadeia da polimerase; ATCC: American Type Culture Collection; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; ECACC: The European Collection of Cell Cultures; ICLC: Interlab Cell Line Collection; RIKEN: Designated National Research and Development Institute; BCRJ: Banco de Células do Rio de Janeiro.

oferecer a distribuição das linhagens testadas também oferecem os serviços de controle de qualidade em seus portfólios de serviço, como descrito na Tabela 3. Deste modo, é possível observar que a oferta de culturas celulares com qualidade agregada aumentou consideravelmente e a sua aquisição junto a coleções biológicas que as oferecem após os devidos testes de autenticidade e pureza mostra-se como o padrão ouro para a implementação de ensaios *in vitro* que as utilizam, com finalidade de indústria ou pesquisa.

CONCLUSÕES

Considerando todo o investimento aplicado em pesquisa científica em âmbito mundial, o desenvolvimento de novas metodologias alternativas ao uso de animais e o consenso crítico de que o conceito de qualidade também deve ser aplicado nas ferramentas que utilizam cultivos celulares em seus modelos testes, conclui-se que qualquer laboratório deve garantir o controle de pureza e autenticidade de suas linhagens.



Com a aceitação formal da Anvisa dos protocolos reconhecidos pelo Concea, diversos laboratórios poderão prestar serviços na área de análise toxicológica *in vitro*. Neste sentido, as Diretrizes da OECD são muito claras no que diz respeito ao controle de qualidade das linhagens utilizadas, tais como o registro do controle periódico de contaminação por micoplasmas, por exemplo. Caso a linhagem seja humana, recomenda-se a identificação do perfil genético por STR. Para as linhagens não humanas, o *barcode surge* como possível técnica de identificação, ao menos, da espécie da linhagem, que poderá sempre ser acompanhada pela avaliação morfológica e dados originais da literatura sobre seu o isolamento.

Além disto, nas pesquisas que envolvem células tumorais, cuja grande maioria é de origem humana, diversos periódicos internacionais já exigem testes de identidade celular para a publicação de artigos. Sendo assim, o Inmetro, como Laboratório Central da Renama, tem se empenhado na implantação e desenvolvimento de metodologias de pureza e autenticidade celulares, de modo a possibilitar o treinamento e/ou oferecimento deste tipo de serviço para os laboratórios de ensaio e centros de pesquisa do país, com o objetivo de agregar confiabilidade e reprodutibilidade dos dados gerados no Brasil.

REFERÊNCIAS

1. Begley CG, Ellis LM. Drug development: raise standards for preclinical cancer research. *Nature*. 2012;483(7391):531-3. <https://doi.org/10.1038/483531a>
2. Falagan-Lotsch P, Lopes TS, Ferreira N, Balthazar N, Monteiro AM, Borojevic R et al. Performance of PCR-based and Bioluminescent assays for mycoplasma detection. *J Microbiol Methods*. 2015;118:31-6. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.08.010>
3. Lees JS, Sena ES, Egan KJ, Antonic A, Koblar SA, Howells DW et al. Stem cell-based therapy for experimental stroke: a systematic review and meta-analysis. *Int J Stroke*. 2012;7(7):582-8. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2012.00797.x>
4. Piuze NS, Chahla J, Schrock JB, LaPrade RF, Pascual-Garrido C, Mont MA et al. Evidence for the use of cell-based therapy for the treatment of osteonecrosis of the femoral head: a systematic review of the literature. *J Arthroplasty*. 2017;32(5):1698-708. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2016.12.049>
5. Kim G, Eom YW, Baik SK, Shin Y, Lim YL, Kim MY et al. Therapeutic effects of mesenchymal stem cells for patients with chronic liver diseases: systematic review and meta-analysis. *J Korean Med Sci*. 2015;30(10):1405-15. <https://doi.org/10.3346/jkms.2015.30.10.1405>
6. Stryeck S, Birner-Gruenberger R, Madl T. Integrative metabolomics as emerging tool to study autophagy regulation. *Microb cell*. 2017;4(8):240-58. <https://doi.org/10.15698/mic2017.08.584>
7. Negoro T, Okura H, Matsuyama A. Induced Pluripotent stem cells: global research trends. *Biores Open Access*. 2017;6(1):63-73. <https://doi.org/10.1089/biores.2017.0013>
8. Amelian A, Wasilewska K, Megias D, Winnicka K. Application of standard cell cultures and 3D *in vitro* tissue models as an effective tool in drug design and development. *Pharmacol Rep*. 2017;69(5):861-70. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.03.014>
9. Caballero D, Kaushik S, Correlo VM, Oliveira JM, Reis RL, Kundu SC. Organ-on-chip models of cancer metastasis for future personalized medicine: from chip to the patient. *Biomaterials*. 2017;149:98-115. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.005>
10. Sewell F, Doe J, Gellatly N, Ragan I, Burden N. Steps towards the international regulatory acceptance of non-animal methodology in safety assessment. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2017;89:50-6. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.07.001>
11. Hamm J, Sullivan K, Clippinger AJ, Strickland J, Bell S, Bhatarai B et al. Alternative approaches for identifying acute systemic toxicity: moving from research to regulatory testing. *Toxicol In Vitro*. 2017;41:245-59. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.01.004>
12. Vinken M, Knapen D, Vergauwen L, Hengstler JG, Angrish M, Whelan M. Adverse outcome pathways: a concise introduction for toxicologists. *Arch Toxicol*. 2017;91(11):3697-707. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2020-z>
13. Evans SJ, Clift MJ, Singh N, de Oliveira Mallia J, Burgum M, Wills JW et al. Critical review of the current and future challenges associated with advanced *in vitro* systems towards the study of nanoparticle (secondary) genotoxicity. *Mutagenesis*. 2017;32(1):233-41. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew054>
14. Leite PE, Pereira MR, Granjeiro JM. Hazard effects of nanoparticles in central nervous system: searching for biocompatible nanomaterials for drug delivery. *Toxicol In Vitro*. 2015;29(7):1653-60. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.06.023>
15. Baker M. 1,500 scientists lift the lid on reproducibility. *Nature*. 2016;533(7604):452-4. <https://doi.org/10.1038/533452a>
16. Freedman LP, Gibson MC, Ethier SP, Soule HR, Neve RM, Reid YA. Reproducibility: changing the policies and culture of cell line authentication. *Nat Methods*. 2015;12(6):493-7. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3403>
17. Casadevall A, Steen RG, Fang FC. Sources of error in the retracted scientific literature. *FASEB J*. 2014;28(9):3847-55. <https://doi.org/10.1096/fj.14-256735>
18. Sobral FR, Campos CJ. Utilização de metodologia ativa no ensino e assistência de enfermagem na produção nacional: revisão integrativa. *Rev Esc Enferm USP*. 2012 Feb;46(1):208-18. <https://doi.org/10.1590/S0080-62342012000100028>
19. Oliveira TFP, Fonseca Junior AA, Camargos MF, Oliveira AM, Cottorello ACP, Souza AR et al. Detection of contaminants in cell cultures, sera and trypsin. *Biologicals*. 2013 Nov;41(6):407-14. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.08.005>



20. Souza FTS. Efeito do micoplasma e do agente removedor de micoplasma (MRA) sobre a medida da atividade de hidrolases lisossômicas, em culturas de fibroblastos humanos [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.
21. Pinheiro de Oliveira TF, Fonseca Júnior AA, Camargos MF, de Oliveira AM, Lima NF, Freitas ME et al. Porcine parvovirus as a contaminant in cell cultures and laboratory supplies. *Biologicals*. 2016;44(2):53-9. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2015.12.003>
22. Timenetsky J, Miyaki C, Mendes IF, Rizzo E. Identificação de micoplasmas pela inibição de crescimento de amostras isoladas de culturas celulares. *Rev Saude Publica*. 1992;26(1):17-20. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101992000100004>
23. Volokhov DV, Norris T, Rios C, Davidson MK, Messick JB, Gulland FM et al. Novel hemotrophic mycoplasma identified in naturally infected California sea lions (*Zalophus californianus*). *Vet Microbiol*. 2011;149(1-2):262-8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.026>
24. Chen TR. In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp Cell Res*. 1977;104(2):255-62. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(77\)90089-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(77)90089-1)
25. Molla Kazemiha V, Amanzadeh A, Memarnejadian A, Azari S, Shokrgozar MA, Mahdian R et al. Sensitivity of biochemical test in comparison with other methods for the detection of mycoplasma contamination in human and animal cell lines stored in the National Cell Bank of Iran. *Cytotechnology*. 2014;66(5):861-73. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9640-9>
26. Sadeghi M, Kapusinszky B, Yugo DM, Phan TG, Deng X, Kanevsky I et al. Virome of US bovine calf serum. *Biologicals*. 2017;46:64-7. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.12.0028>.
27. Toohey-Kurth K, Sibley SD, Goldberg TL, Phan TG, Deng X, Kanevsky I et al. Metagenomic assessment of adventitious viruses in commercial bovine sera. *Biologicals*. 2017;47:64-8. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.10.009>
28. Flatschart RB, Almeida DO, Santos NC, Boldrini LC, Granjeiro JM, Folgueras-Flatschart LAC. The impact of BVDV presence on fetal bovine serum used in the biotechnology industry. In: Berhardt LV, editor. *Advances in medicine and biology*. [S. l.]: Nova Sciences; 2016. p. 75-94.
29. Gey GO, Coffmann WD, Kubicek MT. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res*. 1952;12:264-5.
30. Lasfargues EY, Ozzello L. Cultivation of human breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst*. 1958;21(6):1131-47. <https://doi.org/10.1093/jnci/21.6.1131>
31. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1973;51(5):1409-16. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1409>
32. Rothfels KH, Axelrad AA, Siminovitch L, McCulloch EA, Parker RC. The origin of altered cell lines from mouse, monkey, and man. as indicated by chromosome and transplantation studies. In: Begg RW, editor. *Proceedings of the Third Canadian Cancer Research Conference*. New York: Academic Press; 1958. p. 189-214.
33. 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. *Vitr Cell Dev Biol Anim*. 2010 Oct 8;46(9):727-32. <https://doi.org/10.1007/s11626-010-9333-z>
34. Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(9):1463-7. <https://doi.org/10.1043/1543-2165-133.9.1463>
35. Nardone RM. Eradication of cross-contaminated cell lines: a call for action. *Cell Biol Toxicol*. 2007;23(6):367-72. <https://doi.org/10.1007/s10565-007-9019-9>
36. Nelson-Rees WA, Flandermeyer RR, Hawthorne PK. Banded marker chromosomes as indicators of intraspecies cellular contamination. *Science*. 1974;184(4141):1093-6. <https://doi.org/10.1126/science.184.4141.1093>
37. OECD. Test No. 473: *In vitro* mammalian chromosomal aberration test. In: *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*. 2014[acesso 5 nov 2017]. Disponível em: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-473-in-vitro-mammalian-chromosomal-aberration-test_9789264224223-en
38. World Health Organization - WHO. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. Geneva: World Health Organization; 2010.
39. Food and Drug Administration. Guidance for industry: - characterization and qualification of cell substrates and other biological materials used in the production of viral vaccines for infectious disease indications. 2010[acesso 5 nov 2017]. Disponível em: <https://www.federalregister.gov/documents/2010/03/04/2010-4553/guidance-for-industry-characterization-and-qualification-of-cell-substrates-and-other-biological>
40. Padilla-Nash HM, Barenboim-Stapleton L, Difilippantonio MJ, Ried T. Spectral karyotyping analysis of human and mouse chromosomes. *Nat Protoc*. 2006;1(6):3129-42. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.358>
41. Gartler SM. Genetic markers as tracers in cell culture. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1967;26:167-95.
42. American National Standards Institute. ANSI/ATCC ASN-0002-2011. Authentication of human cell lines: standardization of STR profiling. [S.l.]: American National Standards Institute; 2011.
43. Almeida JL, Hill CR, Cole KD. Mouse cell line authentication. *Cytotechnology*. 2014;66(1):133-47. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9545-7>



44. Hall E. RGC-5 is not rat retinal ganglion. [S. l.]: International Cell Line Authentication Committee; 2015[acesso 8 nov 2017]. Disponível em: <http://iclac.org/case-studies/rgc-5/>
45. Budowle B, Allard MW, Wilson MR, Chakraborty R. Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2003;4(4):119-41. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.4.070802.110352>
46. Butler JM. Overview and history of DNA typing. In: Butler JM, editor. *The evaluation of forensic DNA evidence.* San Diego: Academic Press; 2010. p. 1-18.
47. Butler JM. Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers forensic DNA typing. San Diego: Academic Press; 2005.
48. Francez PAC, Silva EFA. Biologia forense. In: Velho JA, Geiser GC, Espindula A, editores. *Ciências forenses: uma introdução às principais áreas da criminalística moderna.* Campinas: Millennium; 2012. p. 191-211.
49. Butler JM. Chapter 11 - Statistical interpretation: evaluating the strength of forensic DNA evidence. In: Butler JM, editor. *The evaluation of forensic DNA evidence.* San Diego: Academic Press; 2010. p. 229-58.
50. Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, Keys KM, Smerick JB, Budowle B. Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *J Forensic Sci.* 2001;46(3):647-60. <https://doi.org/10.1520/JFS15018J>
51. Romano P, Manniello A, Aresu O, Armento M, Cesaro M, Parodi B. Cell Line Data Base: structure and recent improvements towards molecular authentication of human cell lines. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Database issue):D925-32. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn730>
52. MacLeod RA, Kaufmann M, Drexler HG. Cytogenetic harvesting of commonly used tumor cell lines. *Nat Protoc.* 2007;2(2):372-82. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.29>
53. 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.* 1980;16(2):119-35. <https://doi.org/10.1007/BF02831503>
54. 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(1):75-85. <https://doi.org/10.1006/biol.1996.0062>
55. Stacey GN, Bolton BJ, Morgan D, Clark SA, Doyle A. Multilocus DNA fingerprint analysis of cell banks: stability studies and culture identification in human B-lymphoblastoid and mammalian cell lines. *Cytotechnology.* 1992;8(1):13-20. <https://doi.org/10.1007/BF02540025>
56. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature.* 1985;316(6023):76-9. <https://doi.org/10.1038/316076a0>
57. 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. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(14):8012-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.121616198>
58. Butler JM. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J Forensic Sci.* 2006;51(2):253-65. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00046.x>
59. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science.* 1998;280(5366):1077-82. <https://doi.org/10.1126/science.280.5366.1077>
60. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA et al.; International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature.* 2007;449(7164):851-61. <https://doi.org/10.1038/nature06258>
61. Hebert PDN, Ratnasingham S, Waard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings Biol Sci.* 2003;270 Suppl(Suppl_1):S96-9. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
62. Cooper JK, Sykes G, King S, Cottrill K, Ivanova NV, Hanner R et al. Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 43(10):344-51. <https://doi.org/10.1007/s11626-007-9060-2>
63. MacLeod RA, Dirks WG, Matsuo Y, Kaufmann M, Milch H, Drexler HG. Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source. *Int J Cancer.* 1999;83(4):555-63. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19991112\)83:4<555::AID-IJC19>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19991112)83:4<555::AID-IJC19>3.0.CO;2-2)
64. Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(4):315-9. <https://doi.org/10.1038/nrc775>
65. Cosme B, Falagan-Lotsch P, Ribeiro M, Napoleão K, Granjeiro JM, Moura-Neto R. Are your results valid? Cellular authentication a need from the past, an emergency on the present. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2017;53(5):430-4. <https://doi.org/10.1007/s11626-016-0124-z>
66. Azari S, Ahmadi N, Tehrani MJ, Shokri F. Profiling and authentication of human cell lines using short tandem repeat (STR) loci: Report from the National Cell Bank of Iran. *Biologicals.* 2007;35(3):195-202. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2006.10.001>
67. Wu ML, Liao LC, Chen CY, Lee SY, Yuan GF, Hwang SM. A 2-yr service report of cell line authentication. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2013;49(10):743-5. <https://doi.org/10.1007/s11626-013-9669-2>
68. Bian X, Yang Z, Feng H, Sun H, Liu Y. A Combination of species identification and STR profiling identifies cross-contaminated cells from 482 human tumor cell lines. *Sci Rep.* 2017 Aug;7(1):9774. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09660-w>
69. International Cell Line Authentication Committee - ICLAC. *ICLAC. org Naming a Cell Line.* Vol. 8. 2014.



70. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1994;3(5):294-9.
71. Ratnasingham S, Hebert PD. bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol Ecol Notes.* 2007;7(3):355-64. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
72. Dirks WG, MacLeod RA, Drexler HG. ECV304 (endothelial) is really T24 (bladder carcinoma): cell line cross- contamination at source. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 35(10):558-9. <https://doi.org/10.1007/s11626-999-0091-8>
73. Dittmar KE, Simann M, Zghoul N, Schön O, Meyring W, Hannig H et al. Quality of cell products: authenticity, identity, genomic stability and status of differentiation. *transfus med hemother.* 2010;37(2):57-64. <https://doi.org/10.1159/000284401>
74. Buehring GC, Eby EA, Eby MJ. Cell line cross-contamination: how aware are Mammalian cell culturists of the problem and how to monitor it? *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 40(7):211-5. [https://doi.org/10.1290/1543-706X\(2004\)40<211:CLCHAA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1290/1543-706X(2004)40<211:CLCHAA>2.0.CO;2)
75. Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA et al. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer.* 2010;127(1):1-8. <https://doi.org/10.1002/ijc.25242>
76. Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I et al.; Cancer Research UK. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer.* 2014;111(6):1021-46. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.166>

Agradecimentos

Agradecemos os recursos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Rede Nacional de Métodos Alternativos (Renama) - vinculados ao Ministério de Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações (MCTI) - que possibilitam a continuidade das ações no âmbito de controle de qualidade de linhagens celulares no Laboratório de Bioengenharia Tecidual do Inmetro. Ao Dr. Alberto Fraile-Ramos (que foi bolsista do programa Pronametro, do Inmetro), atualmente professor na *Universidad Complutense de Madrid*, pelas fotografias cedidas.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.