

VI Brazilian Congress of Metrology (VI Congresso Brasileiro de Metrologia)

Transformação do Banco de Células do Rio de Janeiro em um Centro de Recursos Biológicos

*A.M. Monteiro*¹, *Nívea Ferreira Silva*², *Marcelo Neves Medeiros*³ & *R. Borojevic*⁴
^{1,2 e 4} Banco de Células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil cellbank@hucff.ufrj.br
³ INMETRO, Rio de Janeiro, Brasil Rio de Janeiro, Brasil cellbank@hucff.ufrj.br

Resumo: A 21ª Conferência Geral de Pesos e Medidas (CGPM) em 1999 reconheceu o grande desafio que é a aplicação da metrologia na área biológica. O Comitê Brasileiro de Metrologia, em 2003, elaborou um documento com as diretrizes estratégicas para a Metrologia Brasileira. Este foi mais um ponto de partida para o desenvolvimento da Biometrologia em nosso país. Dentro das diretrizes estratégicas da Metrologia Brasileira 2008- 2012, destaca-se o item 6.11, que trata da Metrologia para a Biologia e tem como meta, entre outros, o desenvolvimento de metodologias básicas de bioquímica e biologia molecular para criticamente avaliar e normalizar a qualidade de produtos biotecnológicos [1].

Abstract: The 21st. General Conference of Weights and Measures (GCWM), in 1999, recognized the great challenge that is the application of metrology in the biological area. The Brazilian Committee for Metrology, in 2003, prepared a document with the Strategic Guidelines for the Brazilian Metrology and this document was another starting point for the development of Biometrology in our country. For the period 2008-2012 is the item 6.11, the Metrology for the Biology, and as one of the aims is the development of basic metrologies of biochemistry and molecular biology to evaluate and normalize the quality of biotechnological products critically.

Palavras chave: célula, biometrologia, avaliação, centro de recursos biológicos, material biológico e coleção.

1. INTRODUÇÃO

A Biotecnologia tem avançado muito nos diversos campos das ciências da vida, na produção de alimentos e bebidas, de fármacos, e insumos para medicina [2]. A cultura de células é uma técnica que auxilia os estudos de diferenciação, interação, proliferação e metabolismo celular, neoplasias, clonagem, genoma, engenharia genética, metabolismo de drogas, células tronco, vacinas, kits diagnóstico, análises de citotoxicidade entre outras. A Política de Desenvolvimento da Biotecnologia, conforme Decreto 6.041, prevê a estruturação de uma rede de coleções de cultura e de Centros de Recursos Biológicos (CRB) que operem como coleções prestadoras de serviço para fins de pesquisa e desenvolvimento. Dentro desta Rede, estará o Centro Brasileiro de Material Biológico (parceria entre o Inmetro e o INPI com a principal finalidade de armazenar patentes em biotecnologias). Associam-se algumas coleções biológicas, entre elas o Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ que é a única coleção de células humanas e animais do Brasil e a maior da América do Sul. Estas coleções estão em processo de preparação para se transformarem em Centros de Recursos Biológicos – CRB, que são instituições essenciais para o suporte ao desenvolvimento da biotecnologia, provendo insumos, material biológico certificado e informações associadas, funcionando como centros de conservação da biodiversidade e de material genético. Este trabalho visa contribuir com as recomendações para o gerenciamento do BCRJ na implementação de políticas e procedimentos de gestão administrativa e de processos técnicos que possam dar a confiabilidade ao acervo e reconhecimento como um CRB.

As coleções de culturas são centros de conservação de recursos genéticos *ex-situ* que tem como principal função a aquisição, caracterização, manutenção e distribuição do material biológico [3- 4].

As ciências biológicas apresentam um enorme desafio para a metrologia, na própria identificação do que deve ser medido e na aplicação de metodologia adequada para a medição, com dificuldade crescente no nível dos genes, passando pelas proteínas e chegando ao nível da célula.

O fornecimento de material biológico sem os devidos controles que possam garantir a autenticidade, pureza e viabilidade deste material (por exemplo: culturas com identificação incorreta, com contaminações cruzadas e inviáveis) pode acarretar sérios problemas com conseqüências irreparáveis e apresentar resultados prejudicados pelos erros de identificação [5-6]. O monitoramento contínuo da pureza das linhagens celulares, para fins de controle de qualidade e fornecimento de resultados confiáveis e compatíveis entre laboratórios, é necessário e importante. Ressalta-se, também, a conscientização por parte da comunidade científica que utiliza estas linhagens celulares como ferramenta de trabalho. Futuramente, há proposta de ser requerido, aos autores que submetem artigos relatando o uso da técnica de cultura celular, um certificado de análise de contaminação cruzada celular — CCC (*cell cross-contamination*) — como já é exigido pela revista “In Vitro Cellular and Developmental Biology”.

Diversas coleções espalhadas pelo mundo, cada uma com suas particularidades e escopo de serviço, escolheram os mais adequados processos de gestão da qualidade de acordo com sua missão, possibilidades e objetivos. Depois de pesquisar e analisar os diversos sistemas implantados em diversas coleções internacionais, o embrião da ¹Rede Nacional de Coleções de Cultura escolheu a ABNT NBR

¹ Rede Nacional de Coleções composta pelo BCRJ, CBMAI, CLIOC, EMBRAPA e CRIA.

ISO/IEC 17.025: 2005[7] e sua interface com os Guidelines de Boas Práticas para os CRB da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico - OCDE (Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres e OECD Best Practice Guidelines for Biosecurity for BRCs (OECD 2007) [8-9] e no ISO Guia 34:2009 [10], para preparar estas coleções e se candidatarem a serem um CRB. Estas implantações seguem o modelo de algumas coleções e CRB internacionais que conferem e atestam a competência técnica e avaliam os processos de gestão da qualidade.

2. OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho propõe a adoção de orientações, recomendações, normas e diretrizes para o gerenciamento do BCRJ visando a sua preparação para atuar como Centro de Recursos Biológicos (CRB) com base na ABNT NBR ISO/IEC 17.025: 2005, nos Guidelines da OCDE - Guidance For The Operation of Biological Research Centres (BRCs) [2] e no ISO Guia 34. Fazer parte da Rede Nacional de Coleções de Cultura que está em formação, contribuindo com base tecnológica para a biotecnologia e a Metrologia para a Biologia na área que envolva os trabalhos com cultura de células.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1. Controle da Qualidade do Acervo

3.1.1. Autenticidade Celular

A importância do estabelecimento de métodos para identificação precisa das linhagens celulares se tornou evidente depois dos relatórios de contaminações cruzadas generalizadas com a célula Hela [11]. Com base em observações de grandes repositórios estima-se que entre 18 – 36% de linhagens celulares podem estar contaminadas ou mal identificadas [12-13-14]. A caracterização das linhagens celulares é vital, não só para determinar a sua autenticidade mas também a sua funcionalidade e podem ser feitas através de vários métodos imunológicos, moleculares e citogenéticos como: análise do cariótipo, das isoenzimas, dos antígenos de superfície celular, do citoesqueleto, do DNA fingerprint, do perfil de DNA entre outros.

3.1.2. Controle da Contaminação por micoplasma

A presença de Mycoplasma sp. nas linhagens celulares é um evento comum, podendo trazer grandes prejuízos para as culturas de células, interferindo nos resultados dos experimentos e que tem sido registrados por diversos autores [15-16]. As cepas podem ser carreadas por humanos, suínos ou bovinos [17-18].

3.1.3. Viabilidade Celular

O método de armazenamento celular utilizado é através da criopreservação. Mesmo com o uso de agentes crioprotetores como o DMSO e o glicerol que são moléculas de baixo peso molecular e podem se difundir rapidamente dentro da célula pode-se obter injúrias nas células através do rompimento da membrana celular. *Sistema de Gestão*

3.1.2. Implantação do Sistema de Gestão da Qualidade de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17.025: 2005

É essencial capacitar os laboratórios, uma vez que suas funções de ensaio e calibração, assim como de laboratórios de ensaios de proficiência, exigirão que os CRB que vierem a atuar como laboratório de ensaio se capacitem para atender ao processo de acreditação segundo de acordo com as regras aceitas internacionalmente.

3.2.2. Guidelines da OCDE para CRB

Este documento elaborado e aprovado pela OCDE com a recomendação da Organização Mundial de Coleções de Cultura - WFCC é uma diretriz que fornece a base para as boas práticas na gestão de Centros de Recursos Biológicos replicáveis [19-20]. Reúne os princípios fundamentais e as boas práticas dos sistemas de gestão da qualidade, suplementada pelas boas práticas de biossegurança e biosseguridade e diretrizes operacionais, prescritas por coleções de serviço públicas.

3.1.3. ISO GUIA 34:2009

O ISO GUIA 34:2009, é uma norma internacional que estabelece os requisitos gerais para produção de material de referência (MR). Um laboratório produtor de material de referência deve demonstrar que ele opera de acordo com este Guia, é destinado para utilização pelos produtores de material de referência no desenvolvimento e implementação do seu sistema de gerenciamento de operações de qualidade, administrativos e técnicos. É necessário estabelecer um conjunto de procedimentos rigorosamente alinhados com as disposições emanadas dos principais foros internacionais sobre a avaliação da conformidade do material biológico. Deverá conter neste sistema de avaliação, uma estrutura de procedimentos técnicos que resultem em laudos comprobatórios da conformidade de um dado material com os requisitos especificados.

4. RESULTADOS

4.1. Controle da Qualidade do Acervo

Verificação da Identidade Celular

4.1.1. Autenticidade Celular das células de origem humanas

No panorama internacional, destaca-se a iniciativa do American Type Culture Collection (ATCC) que é a maior coleção de cultura do mundo e é um CRB acreditado na ISO/IEC 17.025:2005, na ISO 9001 e no ISO GUIA 34. O ATCC está desenvolvendo um banco de dados com os perfis de Short Tandem Repeat (STR) presentes no DNA das linhagens celulares humanas. Esta iniciativa além de contribuir para a autenticação destas células, proporcionará um importante acervo de informações para que outras coleções possam comparar os perfis de suas células humanas com os estabelecidos pelo ATCC.

O STR loci estão entre os marcadores mais informativos polimórficos no genoma humano. Estudos têm demonstrado

que um mínimo de oito marcadores STR são necessários para identificar positivamente linhagens de células humanas. O BCRJ implantou este ensaio e já analisou cerca de 95% do seu acervo comparando os dados com os descritos pelo ATCC. Outros ensaios de autenticidade complementares podem ser feitos para comprovar a identidade destas células humanas.

4.1.2. Autenticidade Celular das células de origem animal

Outros métodos de autenticidade podem ser utilizados tanto para as células de origem humana ou de origem animal como: análises do cariótipo, análise das isoenzimas, dos antígenos de superfície celular, do citoesqueleto, do DNA fingerprint e do perfil de DNA. Independentemente da capacidade intrínseca do laboratório, o perfil de DNA tornou-se um procedimento padrão para a identificação da grande maioria de linhagens celulares e um procedimento padrão com aplicação universal [21].

As coleções internacionais realizam principalmente as seguintes análises para caracterizar as linhagens celulares:

- 1- Técnicas que envolvem a biologia molecular, perfil de DNA (STR) para células de origem humanas.
- 2- As análises citogenéticas, são utilizadas para todos os tipos celulares, baseia-se na visualização dos cromossomos e proporciona uma valiosa perspectiva sobre a estrutura física do genoma.
- 3- 3- Análise Isoenzimática, é a análise eletroforética de isoenzimas assim como toda eletroforese de proteína, corresponde à migração diferencial, em um suporte adequado (gel), de moléculas com cargas e tamanhos diferentes quando submetidas a um campo elétrico.
- 4- 4- DNA Fingerprint também chamado de impressão digital genética, é uma técnica utilizada para ajudar na identificação de indivíduos com seus respectivos perfis de DNA.
- 5- Marcadores Imunológicos, os antígenos de superfície celular são os marcadores particularmente úteis para classificação de células hematopoiéticas [22], e de outros tipos celulares como epitélios, endotélios, hepatócitos, mesotélios, células mielóides entre outras.
- 6- Morfologia celular é a mais simples e direta técnica usada para identificar as células, no entanto a plasticidade da morfologia celular não é a mesma em diferentes condições de cultura o que dificulta a sua observação.

O planejamento da autenticidade do acervo do BCRJ, é implantar as metodologias de biologia molecular que são mais viáveis economicamente e proporcionam confiabilidade. Este processo estará diretamente ligado aos procedimentos de avaliação da conformidade e a produção de material de referência. O BCRJ já efetuou 95 % das

análises do acervo de células humanas pelo método PCR STR. Para as células de origem animais estamos avaliando as metodologias disponíveis e sua implantação.

4.1.3. Controle da Contaminação de Micoplasma.

O BCRJ implantou o método de PCR e estamos analisando um método novo no mercado baseado em bioluminescência. É um teste bioquímico seletivo que explora a atividade de certas enzimas do micoplasma. Os micoplasmas viáveis são rompidos e as enzimas reagem com o substrato do Kit que catalisa a conversão de ADP em ATP. Este aumento de ATP pode ser detectado usando a seguinte reação bioluminescente, a intensidade da luz emitida é linearmente relacionada à concentração de ATP e é medido com um luminômetro. Resultados preliminares comparativos com o método PCR tem demonstrado que são equivalentes.

4.1.4. Viabilidade Celular

O BCRJ avalia a viabilidade celular de todos os lotes de células congelados. Contagens são feitas antes e depois do congelamento para avaliar o número total de células e o percentual de viabilidade.

Resultados do Sistema de Gestão

4.2. Sistema de Gestão

Panorama Internacional de Coleções

Cada coleção escolhe seu sistema de gestão de acordo com seus objetivos e sua missão, o ATCC por exemplo resolveu adotar um esquema mais abrangente que envolve a ISO/IEC 17.025:2005, na ISO 9001:2000 e no ISO GUIA 34. A coleção alemã Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen and Cell Cultures (DSMZ) possui a ISO 9001:2000. A coleção belga, BELGIAN CO-ORDINATED COLLECTIONS OF MICRO-ORGANISMS (BCCM) é um consórcio composto por sete coleções de serviço. Essas coleções são coordenadas por uma equipe central da Política Científica Federal da Bélgica, seu sistema de gestão é ISO 9001:2000. A Health Protection Agency Culture Collections representa uma fusão de quatro coleções, a National Collection of Type Cultures (NCTC) - 1920, a European Collection of Cell Cultures (ECACC) - 1984, a National Collection of Pathogenic Fungi (NCPF) - 1946, e a National Collection of Pathogenic Viruses (NCPV) - 2001. A acreditação segue a norma internacional ISO 9001:2008.

Panorama Nacional de Coleções

Hoje quatro coleções estão em processo de preparação para se transformarem em CRB e formarem a Rede Nacional de Coleções de Cultura, a Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI), a coleção da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) que integra pesquisas de recursos genéticos, biotecnologia, controle biológico e segurança biológica, a

Coleção de Leishmania (CLIOC) da Fundação Oswaldo Cruz e o BCRJ. A Rede Brasileira de CRB será composta por estas quatro coleções e o Centro Brasileiro de Material Biológico (CBMB), que é uma parceria entre o INMETRO e o INPI e que terá como principal função o recebimento de patentes em biotecnologia.

Uma comissão formada pelos curadores destas quatro coleções, que são o embrião da Rede Nacional de Coleções, representantes do INMETRO e especialistas dos segmentos estão envolvidos em estudar os modelos para a acreditação das coleções nacionais de cultura. A proposta do plano é a de consolidar a estruturação de CRB através da formalização da acreditação. O esquema de acreditação, compatível com o Guia de Práticas da OECD, segue a lógica de laboratórios (ABNT NBR ISO 17025) e é complementado com um sistema de informação também integrado a Rede Global de Centros de Recursos Biológicos (SICol-Sistema de Informação em Coleções de Interesse Biológico).

A opção pela adoção da ABNT NBR ISO 17025 na base laboratorial de coleções de cultura como primeiro passo para a estruturação de CRB no País apresenta a vantagem de ser o próprio Inmetro que realiza as auditorias de reconhecimento de competência de CRB.

Os Modelos de acreditação ainda não estão estruturados em bases internacionais, portanto não existem obstáculos para que, no Brasil, mobilizem os participantes e se implante um modelo balizado na lógica internacional.

Depois destes modelos implementado nas coleções o reconhecimento como CRB será de competência dos órgãos governamentais. Com isto, facilitará o intercâmbio de material biológico, a interação e colaboração, a transferência de tecnologias, e etc no âmbito nacional e internacional e será uma ferramenta contra as barreiras técnicas.

5. CONCLUSÕES

As exigências relativas à qualidade dos materiais biológicos para quaisquer fins representam um grande salto na agregação de valores e são exigências do mercado atual globalizado. A utilização de material biológico não conforme pode acarretar sérios problemas. O uso da cultura de células por diversos laboratórios de pesquisa, desenvolvimento e diagnóstico, tem cada vez mais intensificado o interesse em utilizar culturas autênticas e puras.

A necessidade de verificar a autenticidade das linhagens celulares em um banco de células é crítica. O conceito e a implantação de Masters Bank, que são lotes primários testados e aprovados para identidade, pureza e viabilidade, são fundamentais em uma coleção, eles são o ponto de referência para a confecção dos lotes de serviço e distribuição. Este Master Bank é importante para manter as condições originais genotípicas e fenotípicas da célula. Para os lotes de serviço, é importante que o controle destes três parâmetros sejam realizados rotineiramente lote a lote para detecção de possíveis contaminações cruzadas e (ou) alterações morfológicas, fisiológicas causadas por uma série de fatores e eventos como mutações.

É importante a conscientização destes controles por parte da comunidade científica que utiliza estas linhagens celulares como ferramenta de trabalho. Estas exigências serão cada vez mais requisitadas e uma previsão bem realista do futuro de publicações científicas é que nenhuma revista aceitará um trabalho sem estas comprovações.

Os usuários de culturas celulares devem realizar os testes de autenticação ou contratar laboratórios competentes e acreditados para realizarem estes ensaios e adquirir novas culturas em repositórios reconhecidamente competentes nacional e internacionalmente e exigir os laudos comprobatórios da identidade celular.

5.1. Controle da Qualidade

Autenticação, pureza e viabilidade

A autenticação ou caracterização celular é proveniente de um conjunto de informações como o ciclo celular, citogenética, presença de agentes contaminantes, suscetibilidade celular a determinados vírus e identificação de espécies.

Com relação às diversas metodologias de controle da qualidade podemos fazer os seguintes comentários:

1- A técnica de cariótipo é uma técnica relativamente simples, mas sua interpretação requer um profissional experiente para analisar os resultados.

2- Segundo Barros [23] a análise eletroforética de isoenzimas permite detectar possíveis contaminações interespecies de linhagens, o ideal é um conjunto de duas ou mais isoenzimas para estudos mais satisfatórios e confiáveis, visto que, quando temos uma determinada porcentagem de contaminação cruzada ela pode não ser detectada para uma ou outra enzima.

3- O uso de células contaminadas com micoplasma pode alterar todos os parâmetros celulares impactando seriamente a confiabilidade, reprodutibilidade e consistência dos resultados experimentais [24]. O método de fluorescência para detectar a presença de micoplasma nas culturas, apresenta uma série de pontos negativos como: para uma cultura fracamente positiva, o operador encontra dificuldades de avaliar o resultado, o laudo é dependente exclusivamente de uma análise do observador, podem acontecer muitos resultados inconclusivos devido a pouca quantidade de micoplasma, erro de coloração, confluência da cultura etc. O Kit de PCR é um método confiável e deve ser recomendado pela segurança nos resultados, requer um laboratório e equipamentos apropriados de biologia molecular e profissional habilitado. O método de bioluminescência tem algumas vantagens como a sua rapidez nos resultados, baixo custo, tem uma sensibilidade menor que o PCR, de 20 micoplasmas o que não é crucial porque quando temos uma cultura contaminada o número de micoplasmas pode atingir a 10^7 logo, isto se torna irrelevante.

4- Calcular o número de células e o número de células viáveis em uma cultura pode parecer em um primeiro momento um procedimento simples e sem muita

importância, puro engano. O método utilizando a câmara de Neubauer não permite avaliar as células que estão entrando em processo apoptótico além do erro que pode ser ocasionado pela diluição, pela contagem e por outros fatores presentes no processo. O sucesso de terapias celulares é dependente do número de células que é injetada nos pacientes, se acontecer um erro e quantidades inferiores forem utilizadas isso poderá comprometer o tratamento.

5.2. Sistema de Gestão

ABNT ISO IEC 17.025:2005 em conjunto com o ISO GUIA 34

É essencial capacitar os laboratórios, uma vez que suas funções de ensaio e calibração, assim como de laboratórios provedores de ensaios de proficiência, exigirão que os CRBs que vierem a atuar como laboratório de ensaio se capacitem para atender ao processo de acreditação segundo de acordo com os consensos aceitos internacionalmente.

A produção de material de referência certificado (MRC) por uma coleção proporcionará confiabilidade ao material biológico na pesquisa e desenvolvimento e será um material padrão para utilização por outros laboratórios que fazem ensaios biológicos, desafiando o desempenho destas análises, validando ou comparando os métodos de ensaio, e estabelecendo a linearidade, sensibilidade e especificidade dos ensaios durante a validação ou implementação. Os MRCs são uma ferramenta importante para a validação de métodos e de desempenho do método de verificação. Eles também fornecem a consistência necessária para ensaio e calibração realizados em laboratórios acreditados pela ISO 17025. O material biológico de referência produzido sob um processo acreditado o ISO Guia 34 proporciona a confirmação a identidade e as características bem definidas e uma cadeia de custódia. Estas qualidades fazem dos MRCs padrões biológicos ideais para fins de pesquisa e desenvolvimento, representam a confiança na qualidade do material biológico, estabelecem a rastreabilidade e, assim, permitem a comparabilidade dos resultados de medição, que é uma das principais aplicações de MRCs

Guidelines de Boas Práticas para os Centros de Recursos Biológicos da OCDE

A implementação deste guia nos CRBs alinhará o programa nacional com as ações internacionais de outros CRBs espalhados pelo mundo. Estas diretrizes completam as normas de acreditação da ISO IEC 17.025 e ISO GUIA 34 de forma harmônica e contribuem como um Landmark para os CRB. Os termos abordados estão em sintonia com os itens das normas acima descritas e acrescentam recomendações importantes que não estão presentes nestas normas, como: duplicação do acervo, aspectos de biossegurança e biosseguridade, formação de recursos humanos, controle de qualidade do material biológico entre outras.

6. DISCUSSÕES E RECOMENDAÇÕES

A transformação de uma coleção em um CRB é um processo lento e gradual. Coleções como o DSMZ na

Alemanha e o ATCC nos Estados Unidos, levaram cerca de 20 anos recebendo permanentes e substanciais recursos governamentais para se consolidarem. Esta transformação depende da definição de diretrizes e políticas de Estado que assegurem a capacitação contínua dos centros credenciados e a consolidação de um sistema de informação que assegure garanta a integração dos esforços e facilite o monitoramento e a avaliação do desempenho dos centros credenciados. Isto só será possível através da adoção de uma estratégia que garanta e proporcione o apoio de longo prazo aos centros componentes da rede e ao sistema de informação integrado. Esta é a maior dificuldade encontrada nas coleções nacionais. É fundamental a participação do governo nos programas de biotecnologia voltados para o auxílio às coleções.

A construção de um sistema de avaliação da conformidade de material biológico requer o envolvimento dos CRB, uma vez que esses terão o papel de depositários do material a ser utilizado em todas as etapas do ciclo de vida do material biológico [25]. Um CRB constitui instrumento básico para a estruturação do Sistema de Avaliação da Conformidade do material biológico, é necessário estabelecer um conjunto de procedimentos rigorosamente alinhados com as disposições emanadas dos principais foros internacionais sobre a avaliação da conformidade do material biológico. Deverá conter neste sistema de avaliação, uma estrutura de procedimentos técnicos que resultem em laudos comprobatórios da conformidade de um dado material com os requisitos especificados.

A acreditação ABNT ISO IEC 17.025:2005, no ISO GUIA 34 em conjunto com os Guidelines da OCDE, é um projeto piloto e cada coleção está em processo de definição do escopo dos serviços que serão acreditados por estas normas e a combinação dos três documentos na produção de material de referência. No caso do BCRJ, o planejamento está voltado para a acreditação dos processos que envolvem o depósito, a guarda e a distribuição de culturas celulares com os seus parâmetros analisados sob a égide científica e metrológica e linhagens celulares como material de referência certificado.

Serviços de autenticação, caracterização e identificação taxonômica requerem a atuação de profissionais especializados (taxonomistas) para os diferentes organismos do escopo da coleção. As técnicas utilizadas para a caracterização devem envolver uma abordagem polifásica, incluindo análises de morfologia, fisiologia, características bioquímicas e estudo dos ácidos nucleicos (DNA). Algumas destas técnicas, como por exemplo, os métodos moleculares, demandam infra-estrutura específica, recursos humanos especializados e envolvem altos custos de processamento. A coleção deve avaliar as suas condições para atender as exigências de qualidade e fornecer o material com um grau de confiabilidade baseado em técnicas e conceitos cientificamente aceitos.

Os conceitos biometrológicos estão cada vez mais em evidência, produzir um material biológico de referência é uma atividade complexa e que apresenta um custo elevado.

A instabilidade inerente dos materiais biológicos traz desafios ao estabelecimento de normas para os sistemas de modelo *in vitro* e de processos compatíveis com a ISO para produzi-los.

5. REFERÊNCIAS

[[1] DIRETRIZES ESTRATÉGICAS PARA A METROLOGIA BRASILEIRA 2008 – 2012.

<http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/dirEstrategica/diretrizesEstrategicas.pdf>

[2] **CANHOS, V.P.& MANFIO, G.P.** 2004. Recursos Microbiológicos para Biotecnologia. Em: Biotecnologia e Recursos Genéticos: desafios e oportunidades para o Brasil (Organizadores: Silveira, J.M.F.J; Poz, M.E.D. & Assad, A.L.D.)

[3]GUIDANCE FOR THE OPERATION OF BIOLOGICAL RESOURCES CENTRES (BRCs). 2003. Certification and quality criteria for BRCs

[4]**WFCC, World Federation for Culture Collections** www.wfcc.info

[5] AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION STANDARDS DEVELOPMENT ORGANIZATION WORKGROUP ASN -002. Cell line misidentification: the beginning of the end. Nature Reviews Cancer, v 10, p.441 – 448, 2010

[6] **NATURE** 457, 935 – 936, Editorial, February 2009, doc: 10.1038-457935b, disponível em: <http://www.nature.com/nature/journal/v457/n7232/full/457935b.html>

[7] **NBR ISO IEC 17.025/ 2005.**

[8]GUIDANCE FOR THE OPERATION OF BIOLOGICAL RESOURCES CENTRES (BRCs). 2003. Certification and quality criteria for BRCs.

[9]GUIDELINES FOR THE ESTABLISHMENT AND OPERATION OF COLLECTIONS OF CULTURES OF MICROORGANISMS, 2nd edition, June 1999. World Federation for Culture Collections.

[10]ISO GUIDE 34, http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=50174

[11]**Culliton, B.J.:** Hela cells: Contaminating culture around the world. Science, 1058-1059, 1974.

[12]**Hughes, P., Marshall, D., Reid, Y., Parkers, H. and Gelber, C.:** The cost of using unauthenticated, over-

passaged cell lines: how much more data do we need: **BioTechniques** 43:575-586, 2007.

[13] **Lacroix, M.:** Persistent use of "false" cell lines. **Int. J. Cancer:** 122, 1-4, 2008.

[14]**Freshney, R. I.** Culture of animal Cells, sixth edition, .pg 609 - 659

[15]**MIYAKI, C.; PRAL, M.M.; GALLINA, N.M.F.; RIZZO, E.** Micoplasma como contaminante de culturas celulares mantidas em laboratórios de instituições particulares e oficiais. **Revista de Saúde Pública, São Paulo, v.23, n.1, p. 39-44, 1989.**

[16] **Lincoln CK, Gabridge MG.** Cell culture contamination: sources, consequences, prevention, and elimination. **Methods Cell Biol.** 1998;57:49-65.

[17] **TIMENETSKY, J.; SANTOS, L. M.; BUZINBANI, M.; METTIFOGO, E.** Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Ribeirão Preto, v. 39, n.7, p. 907-94, 2006.**

[18]**JUPHOFF, C.C.; DREXLER, H.G.** Comparative PCR analysis for detection of Mycoplasma infections in continuous cells lines. **In vitro cellular and developmental biology . Animal, Columbia, v.38, n., p. 79-85, 2002.**

[19]**OECD Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres: <http://www.oecd.org/dataoecd/55/48/2487422.pdf>.**

[20]**ORGANIZAÇÃO DE COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO (OCDE). BIOLOGICAL RESOURCE CENTERS: Underpinning the future of life sciences and biotechnology. Paris, 2001. 66p. (www.sourceocde.org).**

[21]**ASN-0002 (2010). American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup ASN-0002. Cell line misidentification: the beginning of the end. Nat Rev Cancer** 10:441-448.

[22]**Edvardson, L., & Olofsson, T.** Real time PCR analysis for blood cell lineage specific markers. **Methods Mol Biol.** 496: 313-332, 2009.

[23] **Barros, T. F., Simoni, I.C., Fernandes, M.J.B.:** Análise eletrofrética de isoenzimas para detecção de contaminação cruzada entre linhagens celulares. **Revista Biociências, UNITAU, v. 14, n.1, 2008.**

[24]**Lincoln CK, Gabridge MG.** Cell culture contamination: sources, consequences, prevention, and elimination. **Methods Cell Biol.** 1998;57:49-65

[25]**SISTEMA DE AVALIAÇÃO DA CONFORMIDADE DO MATERIAL BIOLÓGICO, Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília, SENAI/DN, 2002. 102p Título ISBN 85-7519-6 <http://www.anvisa.gov.br/reblas/biologico.pdf> .**