

Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS – FARMANGUINHOS

Ana Paula Gregório Alves Fontão

**Determinação de Parâmetros para Criação e Funcionamento de um  
Banco de Células de Mamíferos em um Laboratório de Estudos não  
Clínicos**

Rio de Janeiro

2019

Ana Paula Gregório Alves Fontão

**Determinação de parâmetros para criação e funcionamento de um Banco de Células de mamíferos em um laboratório de estudos não clínicos**

Dissertação submetida ao corpo docente do Curso de Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscila da Nóbrega Rito.

2º Orientador: Dr. André Luiz Franco Sampaio.

Rio de Janeiro

2019

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

F677d Fontão, Ana Paula Gregório Alves

Determinação de parâmetros para criação e funcionamento de um banco de células de mamíferos em um laboratório de estudos não clínicos. / Ana Paula Gregório Alves Fontão. – Rio de Janeiro, 2019.

ix, 89 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Priscila da Nóbrega Rito.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos-Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2019.

Bibliografia: f. 73-80

1. Banco de Células. 2. Linhagens Celulares. 3. Autenticação Celular. 4. Boas Práticas de Cultura de Células. I. Título.

CDD 615.1

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese/dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Ana Paula Gregório Alves Fontão

**Determinação de parâmetros para criação e funcionamento de um Banco de Células de mamíferos em um laboratório de estudos não clínicos**

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos – Fundação Oswaldo Cruz.

Aprovada em 28 de Fevereiro de 2019.

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscila da Nóbrega Rito.  
Instituto de Tecnologia em Fármacos – Fiocruz (Orientadora).

---

Prof. Dr. André Luiz Franco Sampaio.  
Instituto de Tecnologia em Fármacos – Fiocruz (2º Orientador).

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Andrea Surrage Calheiros  
(Escola Técnica Estadual de Saúde Herbert José de Souza – FAETEC).

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Wanise Borges Gouvea Barroso.  
(Instituto de Tecnologia em Fármacos – Fiocruz).

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Almeida de Souza.  
(Vice-Presidência de Gestão e Desenvolvimento Institucional – Fiocruz).

Rio de Janeiro  
2019

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha Família.

Ao meu esposo Fabio por estar ao meu lado em todos os momentos, e aos meus filhos Cadu e Gabriel que são a principal razão das minhas motivações e que renovam as minhas forças todos os dias.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, Natividade e Eduardo por toda ajuda e incentivo para concluir mais essa etapa, e por serem não só meu porto seguro como também o dos meus filhos.

Ao meu esposo Fabio, por toda paciência, compreensão e dedicação e também por sempre ter acreditado e me incentivado a seguir em frente. Você, Cadu e Gabriel são meus bens mais valiosos!

A minha orientadora Priscila Rito, pela sua dedicação e profissionalismo, mas principalmente pelo incentivo e alegria, cada encontro com você era renovador e estimulante.

Ao meu orientador André Sampaio, muito obrigada por me ajudar a realizar esse sonho antigo, obrigada por acreditar em mim e por todo o apoio para que eu chegasse até aqui.

A toda a minha família, sem exceção, que rezaram, incentivaram e apoiaram, e principalmente a Tia Mônica, Tia Wilma e Analice que sempre estão prontas para atender meus pedidos de socorro.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Molecular, obrigada por entenderem minhas ausências, minhas negativas em ajudar e os desabafos do estresse.

Aos amigos da equipe de Qualidade e Processos, Cristiane, Fernando e Marcus, por toda ajuda e paciência em dividir os conhecimentos de “Gestão”, tão importantes para “Pesquisa”.

Aos amigos de Farmanguinhos que tanto me incentivaram e apoiaram, um abraço especial para Renata, Marcia e para as meninas que tanto nos ajudam nos momentos de desespero, Gabriela, Shirlei, Tainá e Ariane.

A minha querida amiga “Bonomiana”, Ana Carolina, por toda ajuda e incentivo de longa data.

À todas as pessoas especiais que contribuíram de alguma maneira me incentivaram, torceram por mim e estiveram sempre ao meu lado seja qual fosse a ocasião.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

*(Martin Luther King)*

## RESUMO

FONTÃO, Ana Paula Gregório Alves. Determinação de parâmetros para criação e funcionamento de um Banco de Células de mamíferos em um laboratório de estudos não clínicos. 2019. 93f. Dissertação Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

Nas últimas décadas, houve avanços no uso de linhagens celulares como modelos e ferramentas na pesquisa, em medicina e indústria, sendo amplamente utilizadas em pesquisa básica, descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, vacinas, produtos biotecnológicos e ferramentas terapêuticas. Entretanto, um grande problema enfrentado atualmente é a falta de reprodutibilidade dos estudos *in vitro*, principalmente devido a problemas de contaminação ou de autenticação das linhagens celulares. Neste trabalho foi realizada uma análise, da legislação nacional brasileira e de normas internacionais acerca do estabelecimento e da caracterização de bancos de células, bem como questões relacionadas ao tema. Foi identificada uma lacuna regulatória nacional com relação ao tema e, por isso, documentos internacionais foram analisados para identificar os requisitos de estrutura, procedimentos e ações de gestão da qualidade. Foram identificados, ainda, parâmetros importantes para estabelecimento e manutenção de um banco de células em um laboratório de pesquisa. O modelo de banco de célula com dois níveis, o banco mestre e o banco de trabalho, demonstrou ser o mais eficiente, pois atende às recomendações vigentes e pode ser facilmente dimensionável para laboratórios e instituições de pesquisa. Em adição, as normas de boas práticas devem ser adotadas durante o armazenamento sob a estrutura de banco de células e a manipulação das linhagens, a fim de mitigar o risco de contaminação e erros de identificação. Neste contexto, para garantia das células do banco, são apontadas as seguintes atividades de maior importância para a observação das boas práticas de cultura de células: documentação, critérios para aquisição e incorporação de linhagens no banco, congelamento celular e, controle microbiológico e de identidade. A observação de boas práticas nestas atividades fortalece a estrutura do banco de células, assegurando a qualidade do material biológico armazenado. Ao descrever as atividades foi possível mapear dois importantes processos: Aquisição de linhagens celulares e estruturação do banco de células de dois estágios. Em suma, o presente trabalho identificou gargalos e atividades essenciais, na manutenção de um banco de células, bem como no seu uso pelos laboratórios de pesquisa, a fim de melhorar ou estabelecer práticas adequadas de formação e manutenção dos mesmos, garantindo a confiabilidade e reprodutibilidade dos dados gerados a partir dos experimentos com linhagens celulares.

**Palavras-chave:** Banco de Células. Linhagens Celulares. Autenticação Celular. Caracterização Celular. Boas Práticas de Cultura de Células.

## ABSTRACT

FONTÃO, Ana Paula Gregório Alves. Determinação de parâmetros para criação e funcionamento de um Banco de Células de mamíferos em um laboratório de estudos não clínicos. 2019. 93f. Dissertação Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

In the last decades, we have observed advances in the use of cell lines as models and research tools in medicine and industry, being widely used in basic research, discovery and development of new drugs, vaccines, biotechnological products and new therapeutic strategies. Nowadays a major problem is faced: the lack of reproducibility of in vitro studies, mainly due to contamination or cell line misidentification. In this work, we have performed an electronic search of Brazilian legislation and international standards on the establishment and characterization of cell banks. In Brazil, we have found a regulatory gap in respect to the establishment and characterization of cell banks. In order to fill the gaps in Brazilian legislation, international documents were analyzed to identify the basic parameters and requirements of structure, quality and procedures for establishment and maintenance of a cell bank in a research laboratory. The model consisting of a two-tiered bank, a master cell bank and a working cell bank, meets current recommendations and can be easily customized for laboratories and research institutions. Concerning the procedures, in order to mitigate the risk of contamination and misidentification, storage under the cell bank structure and handling of lineages following good practice standards should be adopted. In this context, we have identified the following activities of crucial importance for the observation of good cell culture practices: documentation, criteria for acquisition and incorporation of lineages in the bank, cell freezing, microbiological and identity control. The observation of good practices in these activities strengthens the structure of the cell bank, ensuring the quality of stored biological material. After identification of activities and procedures in the cell bank, it was possible to draw two important processes: Acquisition of cell lines and structuration of the two-stage cell bank. The regulatory material collected, the forms shown in this study, the identification of bottlenecks and minimal core activities, empower and underpin the research laboratories to improve or establish appropriate practices for training and to maintain their cell banks. A cell bank, and ultimately a cell line with quality, will increase the reliability and reproducibility of data generated in the research projects.

**Key-words:** Cell bank. Cell line. Cell line authentication. Cell line characterization, Good Cell Culture Practice.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Hierarquia de Processos                                                                                                                                                                                                     | 29 |
| <b>Figura 2:</b> Sequência de etapas no portal do Ministério da Saúde para acesso ao Saúde Legis                                                                                                                                             | 34 |
| <b>Figura 3:</b> Consulta no Saúde Legis por documentos normativos sobre Banco de Células                                                                                                                                                    | 35 |
| <b>Figura 4:</b> Sequência de etapas no portal do Inmetro para acesso aos documentos normativos e orientativos de acreditação                                                                                                                | 36 |
| <b>Figura 5:</b> Princípios das boas práticas de cultura de células                                                                                                                                                                          | 48 |
| <b>Figura 6:</b> Critério a serem avaliados na caracterização das linhagens celulares armazenadas nos Bancos de células                                                                                                                      | 62 |
| <b>Figura 7:</b> Atividades e Processos Importantes para o Funcionamento de um Banco de Células em um Laboratório de Pesquisa de Médio Porte. O esquema abrange as principais etapas a serem seguidas para a formação de um Banco de Células | 76 |
| <b>Figura 8:</b> Processo de formação de Banco de células de dois estágios. Os lotes de congelamentos devem ser formados a partir do pool de células como recomendado pela OMS (2010)                                                        | 78 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> Lista de Palavras chaves utilizadas na revisão da literatura                                                                              | 38 |
| <b>Tabela 2:</b> Compilação das Resoluções sobre Boas Práticas de Fabricação e Registro de Produtos Biológicos                                             | 40 |
| <b>Tabela 3:</b> Compilação das Resoluções e Portaria sobre Armazenamento e Uso de Materiais Biológicos                                                    | 42 |
| <b>Tabela 4:</b> Compilação das Resoluções e Recomendações internacionais sobre Produção de Produtos Biológicos Manutenção de Bancos de Material Biológico | 44 |
| <b>Tabela 5:</b> Comparação entre os métodos de armazenamento de linhagens celulares em temperaturas ultrabaixa                                            | 56 |
| <b>Tabela 6:</b> Banco de dados com informações sobre aspectos e características de linhagens celulares                                                    | 64 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|         |                                                               |
|---------|---------------------------------------------------------------|
| AACR    | <i>American Association for Cancer Research</i>               |
| ANSI    | <i>American Nacional Standards Institute</i>                  |
| ANVISA  | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                      |
| ATCC    | <i>American Type Culture Collection</i>                       |
| BCM     | Banco de Célula Mestre                                        |
| BCRJ    | Banco de Célula do Rio de Janeiro                             |
| BCT     | Bancos de Célula de Trabalho                                  |
| BSE     | Encefalopatia Espongiforme Bovina                             |
| BPCC    | Boas Práticas de Cultura de Célula                            |
| BPF     | Boas Práticas de Fabricação                                   |
| BPL     | Boas Práticas de Laboratório                                  |
| CRBs    | Centro de Recursos Biológicos                                 |
| CAPES   | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior   |
| DMSO    | Dimetilsulfóxido                                              |
| DNA     | Ácido Desoxirribonucleico                                     |
| DSMZ    | <i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i> |
| ECACC   | <i>European Collection of Cell Cultures</i>                   |
| EMA     | <i>European Medicines Agency</i>                              |
| EPC     | Equipamentos de Proteção Coletiva                             |
| EPI     | Equipamentos de Proteção Individual                           |
| FAQ     | <i>Frequently Asked Questions</i>                             |
| FDA     | <i>Food and Drug Administration</i>                           |
| Fiocruz | Fundação Oswaldo Cruz                                         |
| ICH     | <i>International Council for Harmonisation</i>                |
| ICLAC   | <i>International Cell Line Authentication Committee</i>       |
| IFA     | Insumos Farmacêuticos Ativos                                  |
| JCRB    | <i>Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank</i> |
| NIH     | <i>National Institutes of Health</i>                          |
| OECD    | Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico     |
| OMS     | Organização Mundial de Saúde                                  |
| SFB     | Soro Fetal Bovino                                             |

|      |                                                 |
|------|-------------------------------------------------|
| SGQ  | Sistema de gestão da qualidade                  |
| STR  | <i>Short Tandem Repeat</i>                      |
| SUS  | Sistema Único de Saúde                          |
| WFCC | <i>World Federation for Culture Collections</i> |

## SUMÁRIO

|          |                                                                                     |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>                                                                   | <b>15</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b>                                                        | <b>19</b> |
| 2.1      | Histórico                                                                           | 19        |
| 2.2      | Linhagens Celulares                                                                 | 20        |
| 2.3      | Definição e Relevância dos Bancos de Células                                        | 22        |
| 2.4      | Boas Práticas de Laboratório e Cultura de Células                                   | 23        |
| 2.4.1    | Boas Práticas de Laboratório                                                        | 23        |
| 2.4.2    | Boas Práticas de Cultura de Células                                                 | 24        |
| 2.5      | Regulamentação Internacional                                                        | 25        |
| 2.6      | Legislação Nacional Brasileira                                                      | 26        |
| 2.7      | Contexto                                                                            | 27        |
| 2.8      | Modelagem de Processos                                                              | 28        |
| <b>3</b> | <b>JUSTIFICATIVA</b>                                                                | <b>31</b> |
| <b>4</b> | <b>OBJETIVOS</b>                                                                    | <b>33</b> |
| 4.1      | Objetivo Geral                                                                      | 33        |
| 4.2      | Objetivos Específicos                                                               | 33        |
| <b>5</b> | <b>METODOLOGIA</b>                                                                  | <b>34</b> |
| 5.1      | Levantamento Bibliográfico das Normas Técnicas e Regulatórias Nacionais Brasileiras | 34        |
| 5.2      | Levantamento Bibliográfico das Normas Técnicas e Regulatórias Internacionais        | 37        |
| 5.3      | Levantamento Bibliográfico na Busca de Procedimentos de Estruturação e Manutenção   | 37        |
| 5.4      | Processo de Modelagem                                                               | 38        |
| <b>6</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                       | <b>39</b> |

|                                                                                                             |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 6.1 Pesquisa de Normas Técnicas e Regulatórias Nacionais Brasileiras                                        | 39        |
| 6.2 Pesquisa de Normas Técnicas e Regulatórias Internacionais                                               | 43        |
| 6.3 Boas Práticas de Cultura de Células                                                                     | 47        |
| 6.3.1 Processos e Técnicas                                                                                  | 50        |
| 6.3.1.1 Meios de Cultivo e Suplementos                                                                      | 50        |
| 6.3.1.2 Condições Ambientais                                                                                | 52        |
| 6.3.1.3 Criopreservação                                                                                     | 53        |
| 6.3.1.4 Contaminação                                                                                        | 56        |
| 6.3.1.4.1 Micoplasma                                                                                        | 59        |
| 6.3.1.5 Caracterização de Bancos Celulares                                                                  | 61        |
| 6.3.1.6 Autenticação                                                                                        | 65        |
| 6.3.2 Gestão da Qualidade                                                                                   | 69        |
| 6.3.2.1 Garantia da Qualidade                                                                               | 69        |
| 6.3.2.2 Documentação                                                                                        | 70        |
| 6.4 Recebimento de Nova Linhagem Celular                                                                    | 72        |
| 6.5 Estruturação de um Banco de Células                                                                     | 74        |
| <b>7 CONCLUSÃO</b>                                                                                          | <b>80</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                                                           | <b>81</b> |
| <b>APÊNDICE A – FICHA DE ACOMPANHAMENTO DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO CELULAR</b>                       | <b>89</b> |
| <b>APÊNDICE B – FICHA DE CADASTRAMENTO DE LINHAGEM CELULAR</b>                                              | <b>90</b> |
| <b>APÊNDICE C – FICHA DE AUTENTICAÇÃO</b>                                                                   | <b>91</b> |
| <b>APÊNDICE D – Mapa do processo “ENTRADA DE NOVA LINHAGEM CELULAR”</b>                                     | <b>92</b> |
| <b>APÊNDICE E – Mapa do processo “FORMAÇÃO DO BANCO DE CÉLULAS MESTRE E DO BANCO DE CÉLULA DO TRABALHO”</b> | <b>93</b> |
| <b>APÊNDICE F – Check list para criação de Banco DE CÉLULAS DE LINHAGENS CELULARES DE MAMÍFEROS</b>         | <b>94</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Desde a década de 50, linhagens celulares humanas são utilizadas como ferramenta em muitas áreas das ciências biomédicas. Ao longo das décadas, houve um progresso na utilização de linhagens celulares como modelos e ferramentas na pesquisa básica, em aplicações na medicina e na indústria, sendo amplamente utilizadas em pesquisa para o desenvolvimento e descoberta de novos fármacos, vacinas e produtos biotecnológicos (CAPES-DAVIS, 2013).

A HeLa foi a primeira linhagem celular humana estabelecida, derivada de um carcinoma de cólon de útero, em 1952 (MASTERS, 2002). A partir da década de 50, grandes avanços aconteceram na área de cultivo celular, com o estabelecimento de diversas linhagens de diferentes tecidos e espécies, que auxiliaram o aprofundamento no entendimento dos aspectos biológicos das células e doenças (FRESHNEY, 2010).

Em oncologia, linhagens celulares representam um suporte aos estudos sobre a biologia do tumor devido à facilidade da manipulação experimental. Muitos estudos não clínicos utilizam painéis de linhagens tumorais para a descoberta e desenvolvimento de fármacos (BARRETINA, 2012). Nesta área, a diversidade celular é mais evidente do que em outras áreas da biologia, existem mais de 3000 linhagens celulares tumorais descritas na literatura, representando a diversidade celular que compõe o microambiente tumoral e o órgão afetado (LANGDON, 2004; WILDING, 2014). No entanto, linhagens celulares morfológicamente parecidas podem ser facilmente confundidas, apesar de muitas vezes apresentarem diferenças na origem, biologia e/ou resposta a fármacos. Assim, a não caracterização celular criteriosa somada a falta de boas práticas de laboratório, tem como consequência a obtenção de resultados com células que não representam o órgão, a patologia ou o tipo celular que se pretende estudar (HORBACH, 2017).

O aumento marcante nas pesquisas com linhagens celulares trouxe à tona um problema: o surgimento de dados não confiáveis pela utilização de linhagens mal identificadas ou contaminadas com outros tipos celulares (HUGHES, 2007).

A maioria dos laboratórios que utilizam células eucariotas para cultivo *in vitro* para uso na pesquisa e desenvolvimento tecnológico mantém diversas linhagens em cultivo e/ou estocadas. Por essa razão, nesses laboratórios, se não observarem as

boas práticas de cultivo celular, estarão propensos a problemas relacionados a erros de identificação e contaminações cruzadas, ou seja, a introdução inesperada de um tipo celular que não corresponde à célula original da cultura (COSME, 2017). Dentre as possíveis causas desses problemas estão a falta de atenção, negligência, inépcia dos operadores, má rotulagem do material, falta de registros adequados e, emprego de nomenclatura não padronizada (ROMANO, 2008). Esses fatores prejudicam e podem até mesmo invalidar os resultados da pesquisa que neles se baseiam (NELSON–REES, 2001 e FREEDMAN, 2017). O problema se propaga e amplifica quando linhagens celulares estabelecidas ou estocadas em um laboratório são doadas a outros grupos sem a devida autenticação (HUGHES, 2007).

Para assegurar a qualidade e a confiabilidade do trabalho publicado utilizando cultura de células, é essencial garantir que elas estejam identificadas corretamente e livres de contaminação cruzada, ou por microrganismos (CAPES-DAVIS, 2010).

Um conjunto de fatores são necessários para manter o controle de qualidade de culturas celulares. Para a obtenção de matrizes originais de linhagens celulares de fontes confiáveis, por exemplo, o ideal é que se obtenha de bancos de células comerciais, como o Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), e a *American Type Culture Collection* (ATCC), maior repositório americano (HARTUNG, 2002). Essas grandes empresas mantêm suas coleções de células autenticadas e caracterizadas, garantido assim a qualidade do produto biológico disponibilizado (FOLGUERAS-FLATSCHART, 2018).

Todos os processos envolvidos na manutenção das linhagens celulares devem seguir as boas práticas de cultivo celular, que incentivam a racionalização e a padronização das práticas laboratoriais envolvidas nos procedimentos de cultivos celulares, padronização de um sistema de controle de qualidade, assim como protocolos de segurança, de registro e de melhorias, todos em conformidade com a legislação, e os princípios regulatórios e éticos (HARTUNG, 2002).

É necessário não apenas criar uma fonte robusta de armazenamento de informações sobre as linhagens celulares cultivadas, como também manter as matrizes originais dessas linhagens propriamente ditas. A melhor forma de preservar linhagens celulares, conservando suas características iniciais, é mantendo um estoque destas linhagens congeladas, criopreservadas.

A criopreservação acontece a temperaturas ultrabaixas, em torno de  $-196^{\circ}\text{C}$ . Nessa temperatura, as reações bioquímicas nas células tendem a ficar paralisadas impedindo qualquer alteração por um período de tempo, observando que as condições ótimas devem ser estabelecidas para cada tipo celular (FRESHNEY, 2010).

As diferentes linhagens podem ser criopreservadas por tempo indefinido, e podem ser armazenadas de diferentes formas com maior ou menor controle, ainda que o melhor sistema de armazenamento seja o banco de células (LÉO, 2008). Um sistema de banco de células bem mantido observando boas práticas, com linhagens bem caracterizadas, fornece ao pesquisador um suprimento constante e homogêneo de células (ICH, 1997).

Até o momento, o Brasil não possui legislação específica sobre a formação de bancos de células. Na Constituição Federal de 1988 encontra-se a base legislativa no artigo 199 que prevê a disposição de condições e requisitos para a remoção de amostras humanas para fins de pesquisa, dentre outros, destacando o aspecto da proibição de qualquer tipo de comercialização.

Através de uma visão sistêmica, buscou-se uma forma de melhor organizar o trabalho e destacar os procedimentos importantes, e para isso o uso de ferramentas gerenciais foi visto como uma opção. A ferramenta de gestão de processos, ou notação BPMN, é uma ferramenta recomendada pelo Governo Federal para modelagem de processos de trabalho, que está bem difundida na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (BRASIL, 2014). Seu objetivo é que as atividades sejam facilmente compreendidas por todos os usuários, quanto pelos quais executam o processo tanto pelos que o controlam (LONGARAY, 2017).

Com base no exposto, a proposta deste trabalho foi identificar as normas regulatórias vigentes para o estabelecimento de um banco de linhagens de células de mamíferos e propor requisitos mínimos para o estabelecimento de um banco de linhagens de células tumorais em um laboratório de estudos não-clínicos. Para alcançarmos este objetivo, foi realizado um levantamento bibliográfico das normas técnicas e regulatórias vigentes (nacionais brasileiras e internacionais) que tratam da estrutura e atividade de um repositório ou banco de linhagens celulares e, com isto, foi criada uma recomendação de características mínimas de estrutura e funcionamento de um banco de linhagens de células de mamíferos. Finalmente, foram

sugeridos critérios para aquisição de linhagens celulares de bancos de células ou recebimento por doação de laboratórios de pesquisa no âmbito nacional.

O trabalho também se propôs a realizar a modelagem dos processos da estruturação do Banco de linhagens celulares de mamíferos e de aquisição de nova linhagem celular. Estes dois processos são considerados importantes para o estabelecimento de um banco de linhagens celulares, cujo mapeamento poderá auxiliar outros laboratórios a promover melhorias em seus processos, e mais importante, essa modelagem poderá auxiliar a implantação dessas práticas em laboratórios de pesquisa.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico

A cultura celular é uma extensão da técnica de cultura de tecidos, e durante o século XX, não havia uma clara distinção entre os tipos de culturas sendo “cultura de células” um termo genérico utilizado para incluir culturas *in vitro* de células, tecidos e órgãos (FRESHNEY, 2010).

O nascimento da cultura de tecidos como técnica ocorreu em 1907, quando Ross Harrison retirou cirurgicamente um fragmento do tecido nervoso de um embrião de sapo, e o manteve com vida pelo método da “gota suspensa”, em contato com linfa coagulada, a qual fornecia sustentação e nutrientes apropriados ao crescimento celular (FRESHNEY, 2010).

Em 1943 Earle e colaboradores desenvolveram a primeira linhagem celular contínua, derivada do tecido subcutâneo de camundongo, onde promoveram o congelamento celular em nitrogênio líquido (-196°C) e observaram que as células após descongelamento apresentaram boa viabilidade (WINGLEY, 2002). Já em 1952, George Gey extraiu células de uma paciente com câncer de cólon de útero (Henrietta Lacks) e, em homenagem a ela, a linhagem foi nomeada HeLa, estabelecendo assim a primeira linhagem celular humana. Este fato mostrou que tumores humanos podiam originar células de crescimento contínuo aumentando assim o interesse pelo cultivo de células e, conferindo a esse modelo grande popularidade (ALVES, 2010).

Ao longo dos anos, com a melhoria de técnicas e o desenvolvimento de novas metodologias, tornou-se possível o estabelecimento do cultivo de diversos tipos celulares.

A cultura de células pode ser dividida em três categorias baseadas na origem e na biologia: culturas primárias, subcultura e linhagens celulares (ALVES, 2008). As culturas primárias são isoladas diretamente de órgãos e tecidos. São em sua maioria heterogêneas, representativas do seu tecido de origem e possuem um tempo curto de cultivo. Já as subculturas são derivadas das culturas primárias e possuem maior índice proliferativo, permitindo sua manutenção por um tempo de cultura maior (ALVES,

2008). As linhagens celulares são o foco deste estudo e serão descritas em detalhe a seguir.

## 2.2 Linhagens Celulares

Linhagem celular é definida pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) como células que são propagadas indefinidamente em cultura, a partir de uma cultura de células primárias (recém coletada de um organismo), e que sobrevivem às etapas de transformação e senescência (FDA, 2010). Essas transformações correspondem a alterações no genoma da célula que modificam os estímulos ligados ao controle do ciclo celular. Podem estar relacionadas a mutações que resultam ou na depleção de um ou mais genes de senescência (genes reguladores), ou na superexpressão de um ou mais genes ativadores da proliferação celular (oncogenes). A imortalização de linhagens celulares pode ocorrer espontaneamente (fato que raramente acontece) ou após transformação induzida por agentes químicos carcinogênicos, ou por introdução no genoma da célula de um gene viral, ou oncogene capaz de evitar a senescência (ALVES, 2008). A definição empregada pelo *International Council for Harmonisation* (ICH, 1997) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2010) diferenciam linhagem celular de linhagem celular contínua, onde consideram a primeira como um tipo de população de células que se origina por subcultura em série de uma população de células primárias, geralmente armazenada em forma de banco. Já as linhagens celulares contínuas são as que possuem a capacidade infinita de crescimento, podendo ser usado o termo “imortal”.

As primeiras linhagens contínuas humanas foram derivadas de tumores. Nessa época, as condições de cultura de tecidos não era como conhecemos hoje, não existiam cabines de segurança biológica ou fórmulas estabelecidas de meios de cultivo celular (MASTERS, 2002). A partir da década de 50, grandes avanços aconteceram na área de cultivos celulares, com o estabelecimento de diversas linhagens que auxiliaram no aprofundamento dos aspectos biológicos (FRESHNEY, 2010). Earle e Eagle (1954) desenvolveram as formulações de nutrientes, que

substituíram os extratos biológicos indefinidos, trazendo como vantagem a uniformidade entre os meios de cultivo e a maior facilidade de esterilização. (UNCHERN, 1999). Hoje as linhagens celulares são cultivadas em meios de cultura com fórmulas estabelecidas, podendo haver fórmulas mais complexas capazes de atender a tipos celulares específicos (MORAES, 2008).

As contribuições científicas geradas a partir de pesquisas que utilizam as linhagens celulares como ferramenta são de extrema relevância. As Linhagens celulares vem sendo utilizadas por décadas para estudar mecanismos biológicos, biologia celular, farmacologia, imunologia e outras áreas, servindo como modelos para descoberta de novas drogas, em múltiplas áreas da pesquisa biomédica e biotecnológica (FRESHNEY, 2010).

As linhagens celulares de câncer humano representam um pilar no estudo da biologia tumoral e descoberta de novas drogas. Numerosos estudos utilizam painéis de linhagens tumorais que, associados com dados genéticos e farmacológicos bem caracterizados, oferecem diversos modelos para os estudos pré-clínicos e tem produzido grandes avanços para a pesquisa translacional (CAPONIGRO, 2011).

No entanto, a capacidade das linhagens celulares contínuas de persistirem quase que indefinidamente traz a possibilidade de que essas células sejam usadas além do número seguro de passagens. Ou seja, cultivadas exaustivamente a ponto de perderem características genéticas importantes, passando a não possuir mais uma morfologia consistente. Já foi documentado que o cultivo a longo prazo possui efeitos divergentes sobre a morfologia da célula, expressão gênica e o desenvolvimento da linhagem celular (CHANG-LIU, 1997). Desta forma, o subcultivo a longo prazo pode exercer nas linhagens celulares mutações que alteram as características funcionais das células (HUGHES, 2007).

A melhor forma de preservar a linhagem celular com suas características iniciais, e atrasar qualquer alteração que poderia ocorrer durante seu cultivo contínuo em uma rotina de laboratório, é manter um estoque desta linhagem celular congelada, que pode ser acessado quando o número de passagens pré-estabelecido, é excedido.

### 2.3 Definição e Relevância dos Bancos de Células

Para uma linhagem celular ser considerada como caracterizada ela necessita ter o seu genótipo e seu fenótipo determinados e estarem comprovadamente livres de contaminação microbiológica. Somente após estas análises, as células podem ser utilizadas em diferentes estudos ou para a produção de produtos biotecnológicos (FDA, 2010). Além das boas práticas de cultivo, é necessária a estocagem destas linhagens em condições que asseguram não só as características da linhagem celular, mas que também evite a contaminação com outras linhagens (GERAGHTY, 2014). Para isto faz-se necessário o uso de um banco de células para a correta manutenção e estocagem de linhagens celulares, provendo aos diferentes grupos de pesquisa linhagens celulares de qualidade (YU, 2015).

A OMS (2010) define banco de célula, como uma coleção de recipientes apropriados, cujo conteúdo tem uma composição uniforme e que é armazenado sob condições definidas. Cada ampola representa a alíquota de um único grupo ou, *pool* de células.

O modelo mínimo de banco de células, onde as linhagens celulares são mantidas para o uso de um único grupo de pesquisa, é muito simplificado, muitas vezes improvisado. Em vista disso, pode apresentar grande variabilidade de resultados obtidos com essas linhagens celulares, já que cada grupo de pesquisa possui práticas diferentes de aquisição, estocagem, manutenção e uso das linhagens celulares. Deve-se ressaltar que uma mesma linhagem celular, crescida sob condições diferentes de cultura, uso de reagentes diferentes, número de passagens não padronizado, métodos de criopreservação distintos, falta de cuidado com contaminação por microrganismos ou até por outra linhagem celular, podem causar diferenças fenotípicas nas células, tornando muito difícil a comparação e reprodutibilidade de resultados (WRIGLEY, 2014).

Uma outra abordagem, normalmente encontrada em institutos de pesquisa, é o banco de células centralizado, responsável pela aquisição, crescimento, armazenamento e distribuição das células. Este é um modelo que oferece importantes vantagens na padronização de processos, onde todos os estoques poderão ser tratados do mesmo modo e com o mesmo padrão de qualidade. Além disso, serão

minimizados os esforços dos grupos de pesquisa para aquisição de novas linhagens evitando duplicação de compras e economia de recursos. Vários grupos usando um único banco de células facilita a comparação de resultados, trazendo mais confiabilidade aos mesmos. Esse modelo centralizado é bem-sucedido na indústria farmacêutica para pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, tendo a indústria farmacêutica multinacional AstraZeneca<sup>1</sup>, como exemplo (WRIGLEY, 2014).

O processo de formação de um banco de células tem como objetivo atender o fornecimento de estoques confiáveis de células para serem usados nos projetos de pesquisa. Por isso é importante estabelecer normas para as diferentes práticas envolvidas no processo, boas práticas de cultivo celular, metodologias ideais de criopreservação, bem como uma boa infraestrutura de armazenamento (GERAGHTY, 2014).

## 2.4 Boas Práticas de Laboratório e Cultura de Células

Dentro de um laboratório, onde ensaios, estudos e testes são realizados, os resultados obtidos necessitam de aceitação e credibilidade. Assim, a qualidade é de suma importância, pois favorece a rastreabilidade e a repetição, facilitando a organização e a comunicação dos dados.

### 2.4.1 Boas Práticas de Laboratório

Boas Práticas de Laboratório (BPL) é um sistema de qualidade que abrange o processo organizacional e as condições nas quais os estudos são planejados e executados, visando garantir que os resultados dos testes sejam confiáveis, válidos, reproduzíveis e de qualidade (DOS SANTOS, 2015).

---

<sup>1</sup> AstraZeneca do Brasil é uma empresa biofarmacêutica global, voltada para inovação, com foco na descoberta, desenvolvimento e comercialização de medicamentos de prescrição.

No início dos anos 80, a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) adotou suas primeiras diretrizes sobre as BPL. A OECD explica que estas boas práticas estão focadas nos estudos não-clínicos de segurança, em termos de saúde humana e ambiental. As práticas científicas e gerenciais devem garantir testes com qualidade comparável, para que haja harmonização e aceitação mútua entre diferentes países (OECD, 1998).

No Brasil, as BPLs são compulsórias nos estudos de segurança ambiental e de saúde, exigidos pelos órgãos regulamentadores (ANVISA, IBAMA, MAPA) para realização de testes não clínicos de produtos farmacêuticos, agrotóxicos, cosméticos, veterinários, aditivos alimentares, rações e químicos industriais, a não ser que sejam dispensados por legislação e são baseadas nos princípios originais da OECD (INMETRO, 2009; DE SOUZA, 2012), e o Inmetro, por meio da Coordenação Geral de Acreditação (Cgcre), é a autoridade competente para atuar como órgão oficial de monitoramento da conformidade aos princípios das Boas Práticas de Laboratório-BPL (DOS SANTOS, 2015).

Em 2006, a OMS publicou o Manual de Práticas de Qualidade na Pesquisa Biomédica básica, o referido manual foi preparado para ajudar os pesquisadores em todo o mundo a produzirem pesquisa biomédica de alta qualidade, podendo suas diretrizes serem facilmente institucionalizadas a um custo muito baixo (OMS, 2006).

Existem esforços para que se melhore as práticas na pesquisa biomédica, pois é importante ressaltar que a manutenção de altos padrões é fundamental para todas as boas práticas científicas, e é essencial para assegurar a reprodutibilidade, confiabilidade, credibilidade, aceitação e a aplicação adequada de quaisquer resultados produzidos.

#### 2.4.2 Boas Práticas de Cultura de Células

As Boas Práticas de Cultura de Célula (BPCC) é um conjunto de técnicas, processos, procedimentos e atividades identificados, utilizados, comprovados e reconhecidos, como sendo os melhores quanto ao mérito, eficácia e sucesso alcançados pela sua aplicação na realização de uma tarefa. Essa proposta de BPCC

surgiu em 2002 durante o terceiro congresso mundial sobre alternativas ao uso de animais nas ciências da vida, onde foi solicitado à comunidade científica o desenvolvimento de diretrizes e padrões mínimos, análogos aos da OECD, para a técnica de cultura de célula (HARTUNG, 2002). Esta iniciativa ajudou a reduzir a incerteza no desenvolvimento e na aplicação dos procedimentos, incentivando o estabelecimento de princípios para a maior interação, harmonização e racionalização das práticas laboratoriais. Tais diretrizes devem facilitar a comparabilidade interlaboratorial dos resultados *in vitro*, ou seja, que utilizam culturas de células (HARTUNG, 2002 e COECKE, 2005).

Além disso, as BPCs tratam de questões relacionadas a nomenclatura, rotulagem e informação, caracterização e preservação de características essenciais, bem como garantia da qualidade, meios de cultura, armazenamento, coleções de cultura de célula, banco de tecido humano, patenteamento, educação e treinamento e segurança e ética (COECKE, 2005; PAMIES, 2017).

Neste sentido, os documentos normativos e legislações que se correlacionam às boas práticas e a um sistema da qualidade, foram levados em consideração na busca por procedimentos para estabelecimento e manutenção de um banco de células em um laboratório de pesquisa.

## 2.5 Regulamentação Internacional

Alguns documentos internacionais dissertam sobre os aspectos da certificação de bancos celulares, com finalidades biotecnológicas para a produção de medicamentos biológicos. Esses documentos abrangem os temas de qualidade, caracterização, biossegurança além de questões éticas e regulatórias.

Tais procedimentos são descritos em guias, que são documentos gerais sobre certas questões de interesse, ou recomendações, que estabelecem especificações técnicas para determinados produtos. Todas estas orientações são acompanhadas da instrução para que os países, através de suas agências reguladoras e seus laboratórios de controle nacionais, adotem estes critérios como requisitos mínimos, preferencialmente na forma de monografias em suas farmacopeias ou como

legislação, e implementem maiores requerimentos de acordo com suas necessidades, particularidades e experiências. O documento intitulado, *Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks*, é o mais importante para este tema (OMS, 2010).

Os guias organizados em tópicos do ICH, que reúnem representantes das agências e indústria farmacêutica dos Estados Unidos da América, Europa e Japão, em discussões técnico-científicas, visam harmonizar a interpretação e as exigências para o registro de produtos farmacêuticos para uso humano, dentre os quais estão inseridos os medicamentos biológicos. O guia ICH Q5D é o que aborda as recomendações para caracterização de banco de células.

Os guias da Agência Europeia de Medicamentos (EMA) apresentam maior detalhamento em assuntos como identificação e segurança viral dos bancos celulares a serem usados como plataformas tecnológicas. Alguns de seus guias estão integralmente harmonizados com o ICH, contendo os mesmos títulos e textos. Seguindo a análise, os documentos do *Food and Drug Administration (FDA)* são utilizados como fonte de informação quanto aos requerimentos mais detalhados para o estabelecimento de bancos de células com fins industriais. No guia que trata da caracterização dos substratos celulares e outros materiais biológicos usados na fabricação de vacinas virais contra doenças infecciosas, também aborda a caracterização dos bancos de células de forma mais detalhada, incluindo alguns protocolos de testes sugeridos (FDA, 2010).

## 2.6 Legislação Nacional Brasileira

A legislação nacional pode ser dividida em normas técnicas, resoluções, portarias e leis, que obedecem a uma hierarquia. As normas e notas técnicas, de interesse deste estudo, estão na competência do Inmetro e da ANVISA, enquanto que as resoluções e portarias são competência da ANVISA, Ministério da Saúde e do Conselho Nacional de Saúde. As leis são competência da Presidência da República após tramitação nas instâncias inferiores.

## 2.7 Contexto

As coleções biológicas atuam como centros de conservação de material biológicos (organismos e/ou suas partes, biópsias e material genético dentre outros), que tem como principal função a aquisição, caracterização, manutenção e distribuição destes materiais biológicos, conforme descrito no *site da World Federation for Culture Collections (WFCC)*.

Os Centros de Recursos Biológicos (CRBs) podem abranger os quatro principais segmentos estratégicos para o desenvolvimento da biotecnologia: saúde, agronegócio, ambiente e indústria. O CRB-saúde tem por objetivo dar suporte às inovações biotecnológicas em saúde, por meio de uma plataforma de coleções biológicas que realiza pesquisa de excelência e oferece produtos e serviços certificados para a comunidade científica, o Sistema Único de Saúde (SUS) e o Complexo industrial da Saúde (PIRMEZ, 2015). Além disso, existem esforços de diversas instituições de pesquisa para a formação de uma Rede Brasileira de Centros de Recursos Biológicos, tendo como líderes, na área de saúde, a Fiocruz e a UFRJ (CANHOS, 2009).

A Fiocruz é uma instituição complexa formada por diversas unidades técnico-científicas que atuam em pesquisa, ensino, assistência, desenvolvimento tecnológico e inovação em saúde. Ao longo de mais de um século de existência, a instituição gerou e mantém diferentes tipos de acervos, coleções biológicas, museológicas, documentais e bibliográficas (CERRI, 2014). Na Fiocruz, as coleções biológicas mais antigas começaram a ser compostas no início do século XX, quando pesquisadores da instituição coletaram, analisaram e depositaram material biológico de diferentes regiões do Brasil durante expedições científicas. Atualmente há 34 coleções reconhecidas institucionalmente que contam com o apoio da Fiocruz para sua manutenção e salvaguarda. Nos últimos 10 anos, a Fiocruz vem atuando no fortalecimento de suas coleções biológicas, realizando ações de gestão da qualidade em seus acervos (PORTAL Fiocruz).

Apesar dos esforços institucionais para a criação de coleções biológicas representativas de seu acervo, não existe até o momento um mapeamento da coleção de células de mamíferos mantidas nos laboratórios da Fiocruz. Devido a facilidade de trocas e colaborações, o fluxo de linhagens celulares inter e intra institucional é alto,

possibilitando a diversidade deste acervo, assim como questões sobre a sua qualidade.

Recentemente, na instituição foi formada a rede FIOCANCER com o objetivo de gerar conhecimento e insumos relacionados à oncologia. Durante os debates realizados nos encontros da rede, pode-se perceber que muitos laboratórios compartilham a mesma linhagem celular ou possuem necessidades parecidas como aquisição de linhagens celulares específicas, autenticação e controle de qualidade. Assim, torna-se necessário um esforço para normatização da aquisição, manutenção e qualidade deste acervo.

O Laboratório de Farmacologia Molecular de Farmanguinhos integra a rede FIOCANCER e a rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz prestando serviço de avaliação de atividade antitumoral de compostos oriundos de síntese, produtos naturais e biotecnológicos. Neste contexto, o Laboratório de Farmacologia Molecular vem trabalhando no mapeamento de processos e documentação das etapas de aquisição, manutenção e preservação do seu acervo de linhagens celulares tumorais.

## 2.8 Modelagem de Processos

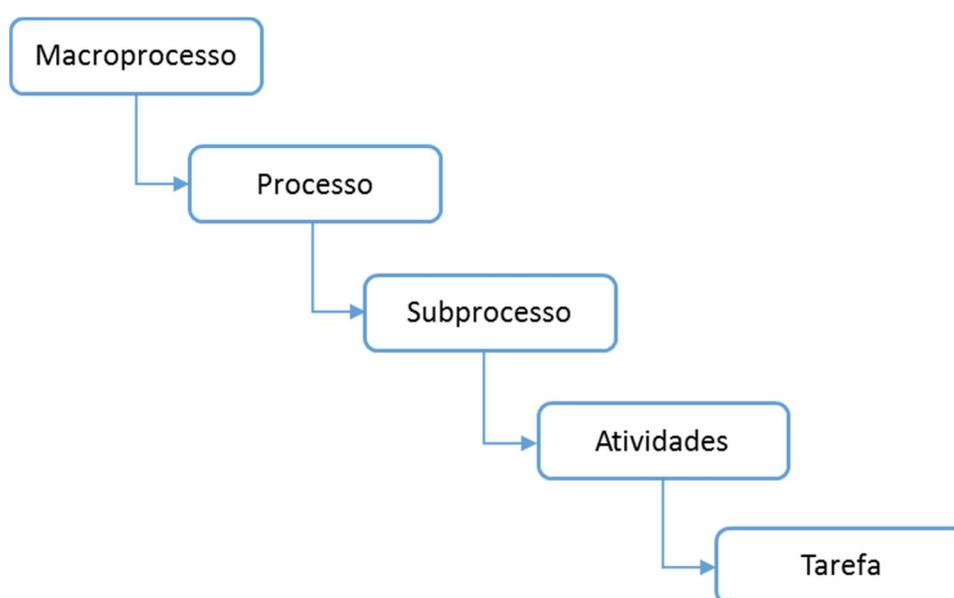
Na busca de uma forma prática de ressaltar os pontos principais para formação e estabelecimento de um banco de linhagens celulares, a visão de processo pode ser considerada uma forma para se realizar uma tarefa de maneira mais organizada, evitando-se assim, desvios durante a execução das atividades e as consequentes falhas ou falta de uniformidade nos processos.

Dentre as diversas definições existentes sobre processo, processo é um grupo de atividades realizadas numa sequência lógica com o objetivo de produzir um bem ou serviço que tem valor para um grupo específico de clientes (VACCARI, 2008). E Davenport define processo como uma ordenação específica das atividades de trabalho no tempo e no espaço, com um começo, um fim, entradas e saídas, claramente identificadas, enfim, uma estrutura para ação (DAVENPORT, 1993).

Dessa forma, quem realiza o processo tem o conhecimento do que será necessário para dar início ao mesmo e, assim, consegue definir previamente os

resultados que deverão ser obtidos. Quando se organiza uma tarefa em processo, é possível se estabelecer previamente os resultados que deverão ser obtidos e executá-lo de uma maneira muito mais ágil e confiável, desde de haja comprometimento do executor (KIPPER, 2011).

O mapeamento ou modelagem de processos é uma ferramenta de análise da gestão que ajuda a compreender as atividades de forma minuciosa com a intenção de melhorar os processos existentes ou implantar uma nova estrutura. Em um mapa de processos consideram-se atividades, informações e restrições de interface de forma simultânea, com a sua representação iniciando-se a partir do sistema inteiro de processos, como uma única unidade modular que será expandida em diversas outras unidades mais detalhadas (sub-processos) que por sua vez, serão decompostas em maiores detalhes de forma sucessiva, como demonstrado na Figura 1.



**Figura 1:** Hierarquia de Processos.

**Fonte:** Conselho Nacional do Ministério Público, Metodologia de Gestão de Processos, 2013.

Muitas são as formas de mapear ou modelar os processos, e as ferramentas de escolha são diversas, com prós e contras, mas dentre as ferramentas disponíveis a Fundação Oswaldo Cruz, adotou o *Bizagi Modeler*, é uma ferramenta utilizada para mapeamento ou modelagem de processos, com notação do BPMN (Business Process Model and Notation), sendo adotado pelos órgãos públicos conforme ePING (Padrões

de Interoperabilidade de Governo Eletrônico) e liderada pelo Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão (BRASIL, 2014; BRASIL, 2016).

### 3 JUSTIFICATIVA

A formação de um banco de linhagens celulares, alinhado às boas práticas de laboratório com a correta caracterização celular por métodos válidos e regulamentados, proporciona atributos de qualidade que resultam na melhora da confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos com as linhagens ali armazenadas.

De acordo com Begley (2012), no comentário *Raise standards for preclinical cancer research*, foi destacado que o uso de linhagens celulares tumorais inadequadas ou não autenticadas dificultam os estudos não clínicos em câncer e, sem resultados robustos, impedem que as descobertas sejam realmente transportadas para os testes clínicos, tornando o desenvolvimento de protótipos e produtos inviável.

Recentemente, o *National Institutes of Health* (NIH) dos EUA, em sua política de concessão de fomento, exige a autenticação de material biológico e reforça a necessidade de autenticação das linhagens celulares utilizadas nos projetos solicitantes (NIH *grant* FAQ e NIH *Enhancing Reproducibility Through Rigor and Transparency*; último acesso 02/06/2017). Soma-se a isto, um número crescente de revistas que exigem a autenticação das linhagens celulares utilizadas nos estudos submetidos para publicação. Dentre estas revistas encontram-se oito da Associação Americana de Pesquisa em Câncer (AACR), *PLOS One* e todas as revistas da família *Nature* (FUSENIG, 2017).

Uma das grandes indústrias do setor farmacêutico, Astrazeneca, já se posicionou com relação à autenticação das linhagens celulares utilizadas em seus estudos não clínicos (WRIGLEY, 2014), pois há um indicativo de que a autenticação passe a ser item de exigência das agências regulatórias para a elaboração do pedido de registro de um novo produto. No âmbito Nacional, a RDC nº 60 (BRASIL, 2014) da ANVISA abre o precedente para a solicitação da autenticidade das linhagens celulares, ao determinar que dados brutos dos ensaios não clínicos possam ser solicitados para o registro de medicamentos novos, genéricos e similares.

A Fundação Oswaldo Cruz é uma instituição de pesquisa biomédica que tem como missão o fortalecimento do SUS, tendo como um de seus valores qualidade e excelência. Inovação e desenvolvimento de fármacos e medicamentos é uma das

vocações da Fiocruz que se apoia principalmente nos projetos do Instituto de Tecnologia de Fármacos (FarManguinhos). Neste contexto, o desenvolvimento de fármacos e biológicos com atividade antitumoral é um novo desafio abraçado pela pesquisa de FarManguinhos e pela Fiocruz (Rede FIOCANCER) para atendimento às demandas do Ministério da Saúde. Linhagens de células tumorais são o pilar da descoberta e desenvolvimento de quimioterápicos, e a elaboração de diretrizes para a criação de um banco de células para atendimento dos laboratórios de estudos pré-clínicos é essencial para que os resultados obtidos nesta fase sejam robustos e assegurem a translação dos protótipos de fármacos para a clínica.

Assim, a importância desta dissertação é criar uma recomendação com as características mínimas de estrutura e funcionamento de um banco de linhagens de células de mamíferos para que qualidade seja um pilar fundamental na realização de experimentos e na rastreabilidade de resultados.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Identificar as normas regulatórias vigentes para o estabelecimento de um banco de linhagens de células de mamíferos e propor requisitos mínimos para o estabelecimento de um banco de linhagens de células tumorais em um laboratório de estudos não-clínicos.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Fazer um levantamento bibliográfico e uma análise crítica das normas técnicas e regulatórias vigentes (nacionais e internacionais) que tratam da estrutura e atividade de um banco de linhagens celulares;
- Propor uma recomendação com as características mínimas de estrutura, processos e procedimentos para o estabelecimento de um banco de linhagens de células de mamíferos, à luz de normas técnicas e regulatórias;
- Determinar os critérios de processos e procedimentos para aquisição de linhagens celulares de bancos de células ou recebimento por doação de laboratórios de pesquisa no âmbito nacional.

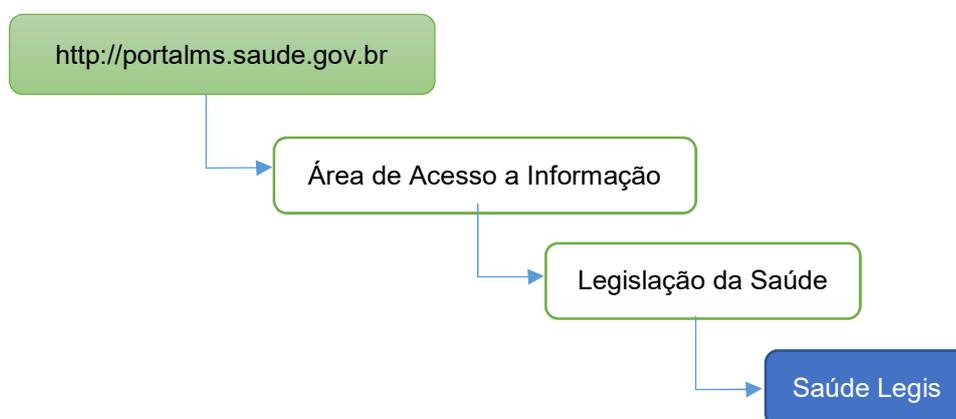
## 5 METODOLOGIA

Para se atingir os objetivos previamente delimitados, primeiramente o estudo envolveu um levantamento bibliográfico de documentos. A pesquisa bibliográfica possibilitou a coleta de dados e obtenção de informações a respeito do tema desta dissertação. Posteriormente foi realizada uma análise crítica e comparação do conteúdo informativo dos documentos coletados.

Enfim, pôde-se realizar a aplicação dos conhecimentos gerados através da pesquisa bibliográfica na proposição de parâmetros para a criação e funcionamento de um banco de células de mamíferos em um laboratório de estudos não clínicos elencando as etapas críticas para o processo de modelagem.

### 5.1 Levantamento Bibliográfico das Normas Técnicas e Regulatórias Nacionais Brasileiras

Foi realizada a busca por documentos normativos no endereço eletrônico do Ministério da Saúde (<http://portalms.saude.gov.br>). Na área de acesso à informação deve-se selecionar a subárea de legislação em saúde, conforme descrito na Figura 2.



**Figura 2:** Sequência de etapas no portal do Ministério da Saúde para acesso ao Saúde Legis.

**Fonte:** Elaborado pela Autora, 2019.

A próxima página direcionada mostrará um *link* do “Saúde Legis” ([http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/LEG\\_NORMA\\_PESQ\\_CONSULTA.CFM](http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/LEG_NORMA_PESQ_CONSULTA.CFM)), que reúne todos os documentos normativos do SUS no âmbito da esfera federal (Figura 3).

Ministério da Saúde

# SAÚDE LEGIS

Sistema de Legislação da Saúde

Dúvidas e sugestões: [fale conosco](#)

Como pesquisar ?

**PESQUISA DE NORMAS**

Tipo de Busca  Busca pelo FORMULÁRIO (via POST)  Busca pela URL (via GET)

Tipo da Norma:  Número:

Data de Publicação:  Até:  Ano de Assinatura:

Origem:

Fonte:

Situação:  Quantidade de Registros:

Assunto:

> **Nenhuma norma encontrada.**

© 2005 DATASUS

7.059.524 consultas

**Alerta Legis**  
Informativo de Legislação

INPI - Registro nº: 091.645

W3C HTML 4.01

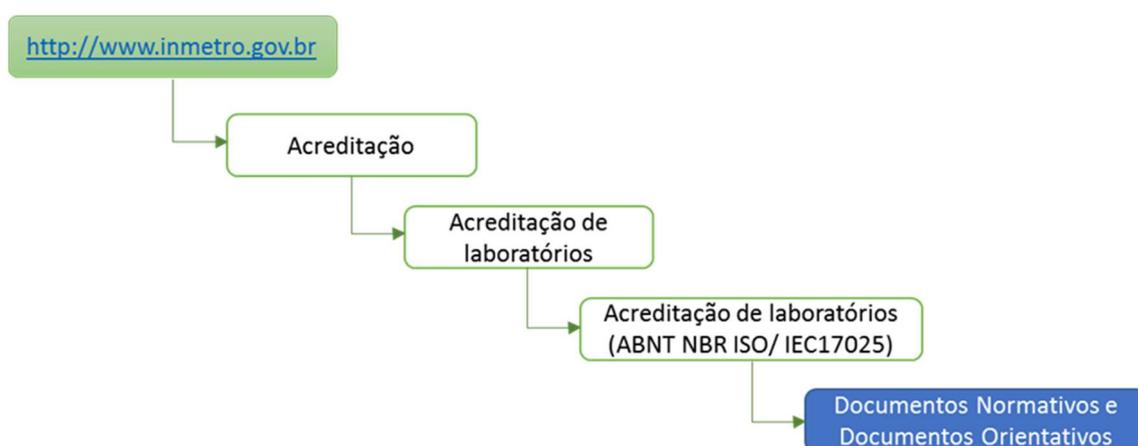
**Figura 3:** Consulta no Saúde Legis por documentos normativos sobre Banco de Células.  
**Fonte:** [http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/LEG\\_NORMA\\_PESQ\\_CONSULTA.CFM](http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/LEG_NORMA_PESQ_CONSULTA.CFM).

No campo “Tipo da Norma” foram incluídas todas as publicações de Leis, Decretos, Portarias, Resoluções, consultas públicas e outros. Não foi especificado nenhum período de tempo, tendo como resultado todos os documentos publicados desde a constituição federal de 1988 até o dia 15 de março de 2018, data em que essa pesquisa foi repetida pela última vez. Essa pesquisa foi repetida por 3 vezes no período de março de 2017 a março de 2018. Nos campos de Origem e Fonte também foi mantido a busca em TODOS, cujo rastreamento ocorreu em todos os órgãos que publicam documentos relacionados ao Ministério da Saúde, assim como em seus meios de divulgação como o Diário Oficial e os Boletins de serviço. A busca foi restrita aos documentos vigentes.

No campo Assunto foram digitadas as seguintes palavras chaves: Célula, Banco, Biobanco, Biológicos. Os termos digitados foram localizados em qualquer parte da ementa, observação ou indexação do documento normativo.

O resultado da busca foi analisado, e após a leitura da ementa de cada resultado, foram selecionados os atos normativos que tratam ou tangenciam o assunto desta dissertação. Foram selecionadas algumas leis, diversas normas como Resoluções da Diretoria Colegiada (RDC), Resoluções (RE), Portarias e Decretos. Os documentos selecionados variam de 2005 a 2016.

Devido à dificuldade de realização de buscas no endereço eletrônico do Inmetro utilizando palavras chaves, foi realizada a busca pelos documentos normativos referentes à acreditação de laboratórios de pesquisa e de centro de recursos biológicos. Assim dentro do endereço eletrônico: <<http://www.inmetro.gov.br>>, dentre as opções apresentadas, foi escolhido “Acreditação” e seguida a sequência apresentada na figura 4, até uma lista de documentos normativos, onde foram analisados os documentos orientativos (DOQ-CGCRE) e documentos normativos (NIT-DICLA), selecionando assim os documentos que abordam as boas práticas de laboratório, e boas práticas de centro de recurso biológicos.



**Figura 4:** Sequência de etapas no portal do Inmetro para acesso aos documentos normativos e orientativos de acreditação.

**Fonte:** Elaborado pela Autora, 2019.

Esses documentos foram processados em *Microsoft Office Excel 2013*, e posteriormente, montadas tabelas com as recomendações obtidas para a presente dissertação.

## 5.2 Levantamento Bibliográfico das Normas Técnicas e Regulatórias Internacionais

A busca por documentos normativos internacionais foi efetuada nos endereços eletrônicos das agências reguladoras FDA (<https://www.fda.gov>) e EMA (<https://www.ema.europa.eu/>) bem como no ICH (<https://www.ich.org>). Por conseguinte, realizou-se consulta no endereço eletrônico da Organização Mundial de Saúde (<https://www.who.int>).

Nestas bases de dados, utilizando o campo de busca em cada uma delas, utilizou-se as seguintes palavras-chaves: *cell line*, *cell bank*, *cell bank characterization*. A pesquisa foi realizada no período de Janeiro de 2017 a Março de 2018.

Os guias internacionais identificados foram analisados na busca por procedimentos técnicos e padrões de qualidade, o documento mais antigo recuperado foi publicado em 1997, já os outros guias datam de 2007 a 2010. Em seguida as principais informações destes documentos foram extraídas e colocadas em tabela no programa *Microsoft Office Excel* 2013 para facilitar análise.

## 5.3 Levantamento Bibliográfico na Busca de Procedimentos de Estruturação e Manutenção

Para a revisão de literatura das atividades estruturação, manutenção e manipulação das células foram realizadas buscas em diversas bases de dados do PubMed, Scopus, Google Acadêmico, Portal periódicos CAPES, Arca da Fiocruz. A metodologia de revisão da literatura nas bases consultadas consistiu nas buscas pelas palavras chave descritas na Tabela 1, sem limite temporal, as palavras pesquisadas se apresentavam nos títulos, resumos, palavras-chave ou ainda no corpo do texto. Em seguida foram lidos todos os títulos e para aqueles que apresentavam correlação com o tema da dissertação, foram lidos os resumos. Estes artigos, foram novamente triados com relação ao tema, e conforme a relevância para esta dissertação, foram lidos em sua totalidade.

**Tabela 1:** Lista de Palavras chaves utilizadas na revisão da literatura.

| <b>EXPRESSÃO EM PORTUGUÊS</b>                      | <b>EXPRESSÃO EM INGLÊS</b>           |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Cultura celular</b>                             | <i>Cell culture</i>                  |
| <b>Linhagem celular</b>                            | <i>Cell line</i>                     |
| <b>Contaminação cruzada de linhagens celulares</b> | <i>Cell line cross-contamination</i> |
| <b>Identificação errada de linhagens celulares</b> | <i>Cell line misidentification</i>   |
| <b>Autenticação de linhagens celulares</b>         | <i>Cell line authentication</i>      |
| <b>Banco de células</b>                            | <i>Cell bank / cell banking</i>      |
| <b>Caracterização de banco de células</b>          | <i>Cell bank characterization</i>    |
| <b>Boas práticas de cultura de células</b>         | <i>Good cell culture practice</i>    |

**Fonte:** Elaborado pela Autora, 2019.

Além do levantamento de dados da literatura, foi realizada uma prospecção ativa de informações disponíveis em endereços eletrônicos dos principais bancos de células comerciais, como a *American Type Culture Collection (ATCC)*, *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)*, *Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (JCRB)*, *European Collection of Cell Cultures (ECACC)* e o Banco de Célula do Rio de Janeiro (BCRJ). Nesses sítios eletrônicos foram usadas as seguintes palavras: *authentication*, *cell bank / cell banking*, *characterization*, *contamination* and *mycoplasma*, com o objetivo de recuperar informações sobre as práticas e procedimentos, relacionadas às palavras buscadas, realizadas nessas instituições.

#### 5.4 Processo de Modelagem

Após a análise dos documentos foi realizada uma comparação das informações normativas, da literatura científica das informações extraídas de grandes coleções de cultura de células, identificando assim etapas importantes nos processos de aquisição de novas linhagens celulares e na estruturação do Banco de células. Esses processos foram então modelados na versão 2.9.0.4 do *software Bizagi Process Modeler*.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Pesquisa de Normas Técnicas e Regulatórias Nacionais Brasileiras

Realizou-se a busca de legislação referente a criação e funcionamento de banco de células nos sites dos órgãos oficiais. Esta busca resultou em 10 documentos, dentre estes, sete são da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e tratam de coleções biológicas, insumos, produção e registro de produtos biológicos. Nenhum documento nacional trata especificamente da criação de banco de linhagens celulares para fins de pesquisa e desenvolvimento de produtos. Mesmo na ausência de documentação específica consideramos, em nossa análise, a legislação vigente como diretrizes a serem observadas.

As normas da ANVISA em relação a bancos de células estão presentes nas Resoluções de Diretoria Colegiada nº 55/2010 (BRASIL, 2010); (RDC): nº 49/2011 (BRASIL, 2011); nº 69/2014 (BRASIL, 2014). Essas resoluções regulamentam a produção e registro de produtos biológicos, e expõe sobre boas práticas de fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos (IFA), e dentre os tipos de IFA, existem os obtidos de cultura de células. A RDC nº 69/2014 destaca como etapa importante do processo a manutenção do banco de célula e da cultura celular, assim como a RDC nº 55/2010 (BRASIL, 2010), estabelece como responsabilidade do produtor a caracterização do banco celular e da linhagem celular utilizada, embora não se aprofunda em quais metodologias devem ser aplicadas referente a essa caracterização, nem do banco de célula ou da linhagem celular. No entanto, nessas normas constam que a caracterização do Banco de Células Mestre (BCM) e de Trabalho (BCT) deve contemplar a avaliação de identidade, pureza, estabilidade e qualificação das células para o fim proposto. A Tabela 2 apresenta o que cada norma da ANVISA expõe e determina sobre banco de células para a produção de medicamentos biológicos e destaca os pontos que tratam sobre banco de células.

**Tabela 2:** Compilação das Resoluções sobre Boas Práticas de Fabricação e Registro de Produtos Biológicos.

| RDC / ANVISA                                 | Dispõe                                                                                                                                                                              | Recomendação                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>RDC Nº 55, de 16 de Dezembro de 2010.</b> | Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências.                                                                                | A empresa deve apresentar a descrição do sistema de BCM e do BCT, e há listado na norma itens de controle de qualidade que devem ser obrigatoriamente apresentados.                                                                                                                   |
| <b>RDC Nº 49, de 20 de Setembro de 2011</b>  | Dispõe sobre a realização de alterações e inclusões pós-registro, suspensão e reativação de fabricação e cancelamentos de registro de produtos biológicos e dá outras providências. | Determina que os BCT devem estar conformes às BPF, e que os BCM devem ser extensivamente caracterizados e qualificados para o fim proposto. E ainda que a cada novo lote do BCT deve ser registrado no histórico de mudanças assim como apresentar todos os testes de caracterização. |
| <b>RDC Nº 69, de 08 de Dezembro de 2014</b>  | Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos.                                                                                                        | Consta a definição de BCM e BCT. E expõe que o fabricante é o responsável pela qualidade de cada banco de célula, devendo garantir a rastreabilidade, identidade, pureza, viabilidade e realização dos testes em cada banco conforme as características biológicas da célula.         |

Fonte: Elaborado pela Autora, 2018.

Após análise detalhada das normativas da ANVISA e comparação com os guias do Conselho Internacional de Harmonização (*International Council of Harmonisation - ICH*), da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da *Food and Drug Administration* (FDA), foi possível observar concordância entres os órgãos. Tal como FDA, a ANVISA direciona quais medidas precisam ser tomadas para o estabelecimento e avaliação da caracterização do banco de células, principalmente quanto aos registros e

documentação. Entretanto, não deixa explícito quais testes e em que condições estes devem ser realizados, ficando muito aquém dos documentos internacionais.

Outros documentos nacionais procuram regulamentar a utilização de materiais biológicos humanos e recomendam a estrutura de banco como forma de armazenamento. Mesmo não existindo uma lei específica que trate do assunto, o tema vem sendo discutido a bastante tempo. A Tabela 3 mostra, por exemplo, que a ANVISA, através das RDC n° 33/2006 (BRASIL, 2006), regulamenta o funcionamento de banco de células e tecidos germinativos, que ao passar do tempo foi sofrendo atualizações com novas normas, a n° 23/2011 (BRASIL, 2011) e a n° 72/2016 (BRASIL, 2016). Além disso, a Lei n° 11.105/2005 (BRASIL, 2005), Lei de Biossegurança, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvem organismos geneticamente modificados e seus derivados, e além do uso de células tronco embrionárias.

Além da ANVISA, o Ministério da Saúde através da portaria n° 2.201/2011 (BRASIL, 2011), aborda diretrizes que estabelecem princípios e normas de funcionamento de biobancos e biorrepositórios de material biológico humano para fins de pesquisa. Esses documentos esclarecem as diferenças entre esses termos. A referida Portaria define Biobanco como uma “coleção organizada que pode armazenar uma gama de materiais biológicos humanos, com informações associadas, sob normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas”. Já Biorrepositório é definido como uma “coleção de material biológico criada para atender um projeto de pesquisa específico”. Os dois tipos de coleções têm a finalidade de atender a pesquisa, mas o armazenamento em Biobanco vai além dos fins de pesquisa e pode também atender propósitos clínicos, legais, educacionais entre outros. A portaria procura regulamentar principalmente as etapas de coleta do material biológico humano, e de uso, pois como tratam de material de origem humana, especialmente pacientes e voluntários de estudos clínicos, compreendem importantes questões éticas envolvidas. Por outro lado, a ANVISA regulamenta o armazenamento e uso de tecidos humanos para fins terapêuticos (transplantes, enxertos, etc.) através da RDC n° 55/2015 (BRASIL, 2015).

**Tabela 3:** Compilação das Resoluções e Portaria sobre Armazenamento e Uso de Materiais Biológicos.

| <b>RDC / ANVISA</b>                                 | <b>Dispõe</b>                                                                                                                                                                                                    | <b>Recomendação</b>                                                                                                              |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>RDC Nº 33, de 17 de Fevereiro de 2006.</b>       | Aprova o Regulamento técnico para o funcionamento dos Bancos de Células e Tecidos Germinativos.                                                                                                                  | Trata de todos os processos envolvidos, desde a doação, processamento, armazenamento e uso de tecidos germinativos.              |
| <b>RDC Nº 23, de 27 de Maio de 2011</b>             | Dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento dos Bancos de Células e Tecidos Germinativos e dá outras providências.                                                                                   | Determina critérios de estrutura como: sala de manipulação, equipamentos de armazenagem e práticas de controle de qualidade.     |
| <b>RDC Nº 72, de 30 de Março de 2016</b>            | Altera a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 23, de 27 de maio de 2011, que dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento dos Bancos de Células e Tecidos Germinativos e dá outras providências. |                                                                                                                                  |
| <b>RDC Nº 55, de 11 de Dezembro de 2015</b>         | Dispõe sobre as Boas Práticas em Tecidos humanos para uso terapêutico.                                                                                                                                           | Estrutura física; Boas práticas e; Programa da qualidade.                                                                        |
| <b>PORTARIA Nº 2.201, DE 14 DE SETEMBRO DE 2011</b> | Estabelece as Diretrizes Nacionais para Biorrepositório e Biobanco de Material Biológico Humano com Finalidade de Pesquisa.                                                                                      | Considera a importância do Biorrepositório e Biobanco de material biológico humano para o desenvolvimento das ciências da saúde. |

Fonte: Elaborado pela Autora, 2018.

## 6.2 Pesquisa de Normas Técnicas e Regulatórias Internacionais

A busca em bases internacionais resultou em documentos mais específicos e detalhados relativos a insumos e produção de biológicos. Como esperado, observamos que a legislação Brasileira vem observando as diretrizes do ICH. Este fato nos ficou evidente no caso da RDC nº 69/2014 (BRASIL, 2014), que trata das boas práticas para fabricação de insumos farmacêuticos que segue à risca as recomendações da ICH Q7. Assim, toda a documentação hoje já contida no ICH referente a banco de células pode ser replicado na sua totalidade ou em parte nas recomendações da ANVISA.

A Tabela 4 segue com um resumo dos principais documentos internacionais que estão relacionados aos procedimentos para formação, funcionamento, manutenção e caracterização de um banco de células. Para efeito desta dissertação, sempre que a legislação nacional não for clara, o material proveniente das organizações internacionais servirá de base para estruturação das recomendações para o funcionamento de banco de células.

O Conselho Internacional de Harmonização (ICH) hoje é uma iniciativa global para um processo de harmonização orientado para unificar procedimentos farmacêuticos que é capitaneado pelas agências regulatórias dos Estados Unidos, Comunidade Europeia e Japão, visando inovações regulatórias. O Brasil é membro desta organização através da ANVISA. A agência foi aceita como membro em novembro de 2016, e pode indicar especialistas para compor os diferentes grupos de trabalho, favorecendo o alinhamento da legislação Brasileira sobre medicamentos às melhores práticas internacionais.

Os guias ICH Q tratam da qualidade dos produtos biotecnológicos, e o ICH Q 5, de 1997, é o guia “Derivação e Caracterização de Substratos Celulares para Produção de Produtos Biotecnológicos”, que possui descrição detalhada sobre banco de célula, seu formato, manutenção e caracterização.

Os guias da Agência Europeia de Medicamentos (EMA), em alguns casos, estão integralmente harmonizados com o ICH, contendo os mesmos títulos e textos, como é o caso do guia do ICH Q5D.

**Tabela 4:** Compilação das Resoluções e Recomendações internacionais sobre Produção de Produtos Biológicos Manutenção de Bancos de Material Biológico.

| Documento                                                              | Título                                                                                                                                                                                                       | Pontos Úteis para Bancos de Células                                                                                                                 |
|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ICH – Q5D<br/>Current Step 4 version<br/>dated 16 July 1997</b>     | Quality of Biotechnological/<br>Biological Products:<br>Derivation and<br>Characterization of Cell<br>Substrates Used for<br>Production of<br>Biotechnological/Biological<br>Products – Q5D.                 | Definições, Sistema e<br>procedimentos em banco de<br>células, Caracterização e<br>testes de banco de célula.<br>Não especifica as<br>metodologias. |
| <b>WHO<br/>(Proposed<br/>replacement of TRS 878,<br/>Annex 1) 2010</b> | Recommendations for the<br>evaluation of animal cell<br>cultures as substrates for<br>the manufacture of<br>biological medicinal<br>products and for the<br>characterization of cell<br>banks.               | Definições, Princípios de<br>boas práticas de cultura de<br>célula, Criopreservação,<br>Caracterização e testes de<br>banco de célula.              |
| <b>FDA<br/>02/01/2010</b>                                              | Guidance for Industry<br>Characterization and<br>Qualification of Cell<br>Substrates and Other<br>Biological Materials Used in<br>the Production of Viral<br>Vaccines for Infectious<br>Disease Indications. | Definições, Estratégias e<br>métodos de banco de<br>célula, Caracterização,<br>Descrição ou protocolo dos<br>métodos.                               |
| <b>OECD<br/>2007</b>                                                   | Best practice guidelines for<br>biological resource centres.                                                                                                                                                 | Definições, Procedimentos<br>de aquisição, manutenção,<br>armazenamento e uso de<br>amostras, Informações de<br>práticas de acreditação de<br>CRBs. |

Fonte: Elaborado pela Autora, 2018.

Seguindo a análise, o documento da agência americana, o FDA (2010), *Guidance for Industry: Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications*, é utilizado como fonte de informação quanto aos requerimentos mais detalhados para o estabelecimento de bancos de células. Este documento, por ser mais atual, abre espaço para o debate sobre diferentes abordagens, desde que haja justificativa científica e validação para tal. Trata-se de um guia bastante completo, propondo, inclusive, protocolos experimentais complementares aos seus, referenciando guias do ICH (1997) ou da OMS (2010).

Assim como o FDA, a Organização Mundial de Saúde em seu documento, *Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks (Proposed replacement of TRS 878, Annex 1)*, expõe de forma mais completa as etapas relacionadas ao banco de células, onde os dois documentos estão alinhados em diversos pontos. O documento da OMS ressalta, ainda, as boas práticas de fabricação e, por conseguinte as boas práticas de cultura de células.

Vale destacar os guias de boas práticas da OECD, ressaltando dentre eles os de boas práticas de laboratório e boas práticas para centro de recursos biológicos. O documento da OECD também orienta no que concerne às boas práticas de qualidade e apresenta as etapas e condições que devem ser adotadas pelos centros de armazenamento de material biológico que buscam acreditação, para assim fazer parte de uma rede internacional de “Centro de Recursos Biológicos” (OECD, 2007).

A Lei brasileira nº 13.243/2016, conhecida como a Lei da Inovação, apresenta o armazenamento de material biológico sob a forma de banco, em condições certificadas e acreditadas, como um ponto importante para auxiliar a inovação no país. Em virtude disso, diversas coleções biológicas nacionais buscaram no documento de Boas Práticas para Centro de Recursos Biológicos (OECD, 2007) a referência para os procedimentos de acreditação de coleções biológicas, que possui uma versão brasileira produzida pelo Inmetro, a DOC-CGCRE-034 de 2012 (Inmetro, 2012).

Processos robustos precisam ser estabelecidos para que, não somente se armazene células, mas também minimizem os riscos potenciais, como o esgotamento

dos estoques celulares, a contaminação cruzada entre linhagens e contaminação por agentes microbiológicos. Um programa de controle de qualidade em um banco de células é importante para que se possa fornecer linhagens celulares confiáveis. A qualidade deve permear todos os processos, como as melhores práticas de cultura de células e metodologias ideais de criopreservação, assim como uma boa estrutura de armazenamento e distribuição e também coleta e rastreamento de dados. Outra etapa importante na qualidade é o monitoramento, que bem aplicado, é fonte constante de melhorias nas práticas.

Sendo assim, após a pesquisa envolvendo os atos legais brasileiros, ficou evidenciada a falta de regulamentação específica capaz de orientar os laboratórios de pesquisa quanto ao estabelecimento de um banco de células, bem como na realização de um programa de testes de controle de qualidade necessários para sua certificação, de forma a garantir sua autenticidade, pureza e estabilidade.

A análise dos documentos internacionais forneceu uma base para a busca das orientações no estabelecimento de um banco de células. Estes textos, tratam amplamente do assunto, já que servem de base para as indústrias de produção de medicamentos biológicos, exigindo assim uma descrição mais detalhada das orientações. Por isso, vale ressaltar que caracterização de um banco de células depende do seu uso, e seu uso particular deve guiar a determinação de qual teste é necessário.

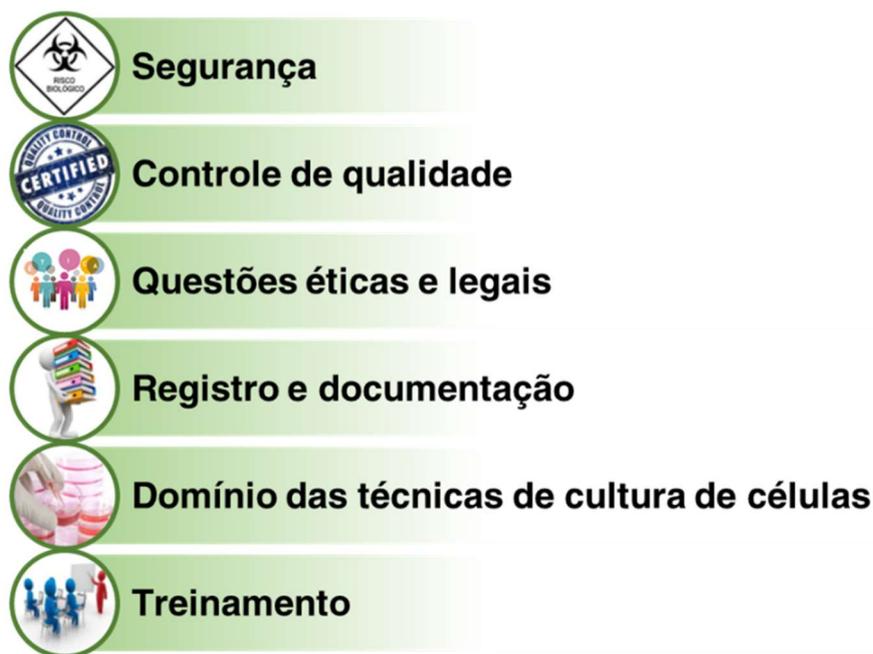
Os documentos internacionais acessados compõem uma base mais sólida para a construção das recomendações para estruturação dos bancos de células para pesquisa e desenvolvimento tecnológico, quando comparado à documentação nacional, apesar da força regulatória que possuem os documentos oriundos da ANVISA.

### 6.3 Boas Práticas de Cultura de Células

Conforme colocado nos objetivos específicos, e para atendimento às recomendações contidas nos documentos analisados, fez-se necessária a observação das Boas Práticas de Cultura de Célula (BPCC). O objetivo das BPCC é reduzir a incerteza no desenvolvimento e aplicação de procedimentos *in vitro*, encorajando o estabelecimento de princípios para a maior harmonização internacional, padronização e implementação racional das práticas de cultivo celular, nomenclatura, sistemas de controle de qualidade, procedimentos de segurança, e documentação (HARTUNG, 2002). As BPCC estabelecem os padrões mínimos para qualquer trabalho *in vitro* envolvendo culturas de células e tecidos. No entanto, sua implementação detalhada depende da natureza do trabalho envolvido (BAL-PRINCE & COECKE, 2011). As BPCC devem fomentar o consenso entre todos os envolvidos com o uso sistemas de cultura de células e tecidos, a fim de:

- Estabelecer e manter a melhor prática de cultura de células e tecidos;
- Promover sistemas eficazes de controle de qualidade;
- Facilitar a educação e o treinamento.

Para a implementação das BPCC é necessário a elaboração de um sistema que englobe os seis princípios importantes para a prática de cultura de células, representados na Figura 5, dos quais destaca-se o primeiro, que trata da compreensão suficiente do sistema de culturas de células *in vitro*, desde o estabelecimento, a manutenção e todos os fatores relevantes que podem afetá-lo, como meio de cultura, criopreservação, contaminação e outros (COECKE, 2005). Este primeiro princípio é composto de alguns pontos críticos que serão discutidos no decorrer desta dissertação.



**Figura 5:** Princípios das boas práticas de cultura de células.

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2019.

O segundo princípio das BPC é a Garantia da Qualidade que deverá abranger os materiais e as metodologias utilizados. Esta é uma prática que cada vez mais deve ser aplicada no cenário da pesquisa, a fim de se evitar as falhas, controlar os erros e melhorar os dados gerados, garantindo a reprodutibilidade (COECKE, 2005). O terceiro princípio participa da Garantia da Qualidade, mas vale destacá-lo devido sua importância: A Documentação. Este item é vital para se introduzir um sistema adequado de manutenção de registros, e que esteja acessível para manutenção e uso dos registros a todos aqueles que conduzem trabalhos (FRESHNEY, 2002; SATCEY, 2004).

O quarto princípio condiz à Segurança, e ressalta a necessidade do estabelecimento e a manutenção de medidas adequadas para proteger os indivíduos e o ambiente de quaisquer perigos potenciais (COECKE, 2007). No Brasil, a lei de biossegurança trata de aspectos referentes ao uso de organismos geneticamente modificados e ao uso de células tronco embrionárias. Assim, sendo, ganha importância dependendo da aplicação do Banco de linhagens celulares, o cumprimento de alguns aspectos dessa lei (BRASIL, 2005). Deve-se ressaltar que o uso de culturas *in vitro* possui questões específicas de cuidados de biossegurança: as linhagens celulares, quando desenvolvidas, recebem uma classificação de

biossegurança, e, ao se adquirir uma linhagem celular, deve-se observar se a mesma está adequada à manipulação no laboratório e se os equipamentos e materiais atendem a segurança dos usuários e do ambiente (HARTUNG, 2002; STACEY, 2004).

O quinto princípio aborda as questões éticas e legais. Atualmente não há diretrizes éticas relacionadas especificamente às práticas de cultura de células em geral, mas várias diretrizes, regulamentos e leis que estão em vigor para lidar com células e tecidos de origem humana. No Brasil, a maioria dos documentos normativos relacionados ao uso de células ou tecidos humanos trazem diretrizes a serem seguidas de forma rigorosa a fim de se fazer cumprir os preceitos éticos (BRASIL, 2011). Mesmo em um banco de linhagens celulares humanas, não estando sob ação direta dos documentos normativos nacionais, é importante que todos os envolvidos mantenham um nível de consciência das questões éticas relacionadas com o trabalho em cultura de células, da opinião pública e da legislação pertinente não só a nível nacional como internacional (STACEY, 2004).

E finalmente o sexto princípio trata de Educação e Treinamento. Ou seja, a competência do indivíduo no desempenho de suas funções em um laboratório é fundamental para garantir que o trabalho seja realizado de acordo com as normas estabelecidas para o cumprimento dos requisitos e obrigações científicas, legais e de segurança. Isso requer educação e treinamento, bem como o monitoramento regular das atividades desenvolvidas (HARTUNG, 2002). A formação deve ser vista como um processo contínuo para melhorar e desenvolver habilidades práticas e manter as competências. E de forma a atender os critérios de boas práticas, os treinamentos devem ser formalmente documentado e abranger toda equipe do laboratório. Como a biotecnologia avança rapidamente, não sendo diferente para a técnica de culturas de células, é importante uma constante revisão das necessidades de treinamento da equipe.

Alguns tópicos das BPCCC têm impacto direto na qualidade do material a ser mantido no banco de células, e podem ser observados nos laboratórios de pesquisa, melhorando a qualidade do material estocado e fornecido para as pesquisas. Estes tópicos serão discutidos mais detalhadamente com base na documentação analisada em cumprimento do primeiro objetivo, assim como artigos científicos que tratam de boas práticas.

### 6.3.1 Processos e Técnicas

Vale lembrar que essa dissertação destaca, dentre os tipos de culturas celulares, as linhagens celulares contínuas ou imortalizadas. Os processos são diferentes

#### 6.3.1.1 Meios de Cultivo e Suplementos

Muitas formulações existem sob o mesmo nome, e até mesmo mudanças sutis na formulação do meio podem alterar substancialmente as características das células. Portanto, o meio a ser usado deve ser precisamente especificado, e é importante verificar se há a necessidade de suplementos além da formulação básica, já que são importantes para atender as necessidades exigidas por cada linhagem celular (FRESHNEY, 2010; GERAGHTY, 2014; PRICE, 2017).

O soro é essencial para a manutenção e proliferação de muitos tipos celulares. É uma mistura complexa de um grande número de constituintes, incluindo uma variedade de biomoléculas de baixo e alto peso molecular (NIMS, 2017). No entanto, devido à sua complexidade e variação de lote para lote, o soro introduz variáveis desconhecidas em um sistema de cultura e pode interferir em seu desempenho. Os soros bovinos são os mais comumente usados e, nas últimas décadas, o soro fetal bovino (SFB) tornou-se o suplemento padrão para o meio de cultura celular. O soro fetal bovino funciona como um coquetel contendo os fatores necessários para a proliferação e manutenção da maioria das células e, portanto, é um suplemento de crescimento quase universal. Uma vez que a composição do soro é altamente variável, é importante que, quando um lote existente de soro esteja quase esgotado no laboratório, um novo conjunto de lotes de soro sejam avaliados em paralelo com o atual lote em uso (GERAGHTY, 2014). Os soros de animais são uma fonte potencial de contaminantes microbiológicos, como micoplasma, vírus bovino e possivelmente o agente causador de Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE). Os fornecedores

usam uma variedade de técnicas, incluindo filtração, irradiação e inativação térmica, para reduzir a contaminação microbiana (NIMS, 2017).

Devido às restrições regulatórias e à pressão do mercado, tem se tentado restringir o uso de proteínas e insumos derivados de animais ou humanos. É possível hoje desenvolver meios definidos, onde se conhece a composição e concentração de todos os seus componentes. Existe uma vasta gama de meios definidos cuja composição não necessita de suplementos de origem animal para seu uso e, na maioria dos casos, a suplementação proteica é feita, quando necessária, com proteínas recombinantes (NIMS, 2017; PRICE, 2017). As vantagens dos meios definidos incluem padronização, reprodutibilidade, ausência de contaminantes microbiológicos. Geralmente eles são mais caros e não são universais, não sendo compatíveis com todas as células, apresentando especificidades. O melhor exemplo que se pode citar são os meios de cultura para cultivo de *stem cells* (PRICE, 2017). Além disso, as células podem ser menos robustas em meio isento de soro e a resposta à essa ausência pode variar de uma linhagem celular para outra. Portanto, os protocolos de bancos de células devem ser adaptados para as respectivas linhagens celulares e suas finalidades.

Outras substâncias importantes são os antibióticos. Trata-se de agentes que interrompem ou destroem aspectos fundamentais da biologia celular e, embora sejam mais eficazes contra células procarióticas (ou seja, bactérias), também são capazes de causar respostas tóxicas em células animais (FRESHNEY, 2010). Não surpreendentemente, os agentes antifúngicos, sendo dirigidos aos microrganismos eucarióticos, são provavelmente mais tóxicos para culturas de células animais (BUTLER, 2004). Assim, devido a essas contraindicações, o uso de antibióticos na cultura de células deve ser focado em necessidades específicas como: i. proteção das culturas celulares da contaminação (como quando expostas a situações com riscos de contaminação); e ii. seleção positiva de clones de células recombinantes com base na expressão de genes de resistência a antibióticos. Como todos os outros reagentes, é importante obter antibióticos de empresas que estejam dispostas a fornecer certificação para a concentração e pureza dos antibióticos que ofertam, ainda que tenham sido testados para cultura de células. Sempre que possível, o uso de antibióticos deve ser evitado. Não deve tornar-se rotina no laboratório de cultura de

células e nunca pode ser usado como um substituto para técnicas assépticas eficazes (FRESHNEY, 2010; BAL-PRINCE & COECKE, 2011).

Outro reagente importante é a Tripsina. Quando usada para preparar culturas de células, deve ser adquirida com recomendações para uso nesta prática. O fabricante deve realizar testes para bactérias cultiváveis, fungos, micoplasma e vírus infecciosos, incluindo parvovírus porcino, já que, tal como nos lotes de soro, os lotes de tripsina são preparados a partir de vários animais, em específico do pâncreas, e por isso, deve haver uma preocupação em adquirir um produto inativado para vírus (OMS, 2010).

#### 6.3.1.2 Condições Ambientais

Deve-se ter cuidado para não expor as linhagens celulares a condições inapropriadas, como por exemplo, tempo excessivo fora da incubadora de CO<sub>2</sub>. Os principais itens utilizados na rotina de manutenção, incluindo incubadoras, cabines de segurança biológica, e equipamentos de criopreservação, devem ser usados somente por pessoal treinado. Técnicas assépticas, quando apropriado, devem ser rigorosamente aplicadas (FRESHNEY, 2010).

Parâmetros como temperatura, atmosfera da estufa e pH devem ter um registro de acompanhamento, pois suas variações podem alterar funções celulares. A variação desses parâmetros pode induzir apoptose em alguns tipos celulares de mamíferos, inibir ou retardar o crescimento celular, mas também podem aumentar a expressão de certas proteínas celulares. Portanto, deve-se verificar diariamente esses fatores, cujos valores para células de mamíferos deve ser 37°C de temperatura, atmosfera de 5% v/v de CO<sub>2</sub> no ar atmosférico da estufa e o pH recomendado é de 7,4, notando que a variação desses parâmetros pode acarretar em variações fenotípicas, de crescimento e viabilidade das células (FRESHNEY, 2010).

### 6.3.1.3 Criopreservação

A manutenção de longo prazo é o objetivo principal de qualquer banco de células. O armazenamento em nitrogênio líquido (a  $-150^{\circ}\text{C}$  na fase de vapor ou  $-196^{\circ}\text{C}$  submerso no líquido) é o melhor e geralmente mais aceito método de preservação de células (GHERNA, 1999). Após análise dos protocolos disponíveis para criopreservação (GHERNA, 1999; STACEY, 2008; INTERNATIONAL STEM CELL BANKING INITIATIVE, 2009; HEIDEMANN, 2010; BAUST, 2017), concluímos que há uma possibilidade de generalização do método, pois existe algum consenso relativo ao crioprotetor e taxa de resfriamento. Contudo, é importante que seja analisado o melhor método para a linhagem a ser trabalhada, atendendo suas especificidades para garantir a qualidade do material congelado.

O sucesso ou falha do método de preservação depende de vários parâmetros críticos, como o controle da taxa de congelamento, o armazenamento sob condições criogênicas apropriadas, o uso correto dos agentes crioprotetores e os procedimentos de descongelamento. Além disso, o meio de crescimento, a idade da cultura no momento da preservação e o procedimento de cultivo também podem afetar o sucesso do processo de congelamento e devem ser investigados e otimizados para cada linhagem celular (GHERMA, 1999; SCHMALE, 2006).

Acredita-se que a apoptose seja um dos principais mecanismos de morte celular induzida pela criopreservação em células de mamíferos (FIEDER, 2005). Minimizar e superar os efeitos indutores de apoptose controlando a taxa de resfriamento enquanto se congelam as células ou durante o descongelamento, quando aquecem o mais rápido possível, é importante. A formação de cristais de gelo internos, o estresse mecânico e concentração de soluto parecem ser as principais causas de morte celular durante a criopreservação (GROUT, 1990).

A escolha da taxa de resfriamento ideal para uma linhagem celular específica é principalmente um procedimento empírico que deve ser realizado junto com a formulação do meio de congelamento. Para a maioria das culturas de células animais, uma taxa de resfriamento de  $-1$  a  $-3^{\circ}\text{C}$  por minuto e descongelamento rápido a  $37^{\circ}\text{C}$  por 60 a 90 segundos, fornece a melhor recuperação. Existem equipamentos automáticos de resfriamento controlado que fornecem um processo de

criopreservação mais reprodutível, desde que o programa de congelamento utilizado tenha sido otimizado para cada linhagem celular. Dispositivos mais simples podem ainda, serem suficientes para uma boa criopreservação (FRESHNEY, 2010; CAPES-DAVIS, 2011).

Os crioprotetores de alta viscosidade são adicionados para minimizar o efeito geral dos danos causados pelos cristais de gelo. Existe um número de agentes protetores penetrantes (por exemplo o dimetilsulfóxido ou o glicerol) e não penetrantes (como a sacarose-propandiol). O glicerol e o dimetilsulfóxido (DMSO) são os mais convenientes e têm sido usados com sucesso como aditivos no congelamento de material biológico por várias décadas (BAUST, 2017). O DMSO, por exemplo, é capaz de entrar e sair das células facilmente durante o congelamento e o descongelamento e, portanto, leva a menos danos por congelamento. No entanto, o contato prolongado com o DMSO também tem um efeito tóxico em algumas células, especialmente em concentrações mais altas ou em temperaturas mais altas (BAUST, 2017). Para reduzir ou eliminar os danos às células, os protocolos padrão de criopreservação recomendam a adição de DMSO em concentrações finais de 5 a 15% (v/v), à suspensão celular a baixas temperaturas (geralmente 4°C) e também para minimizar o tempo de exposição ao DMSO antes do congelamento e durante a recuperação (FRESHNEY, 2010; BAUST, 2017). Recomenda-se que toda vez que um lote de células é congelado, um frasco seja descongelado imediatamente para verificar a viabilidade.

Assim o processo de congelamento inclui as etapas de congelamento, armazenamento e recuperação. Alguns tópicos são importantes para que se obtenha sucesso durante todo o processo (COECKE, 2005; BAUST, 2017):

- ✓ Analisar as características da linhagem celular (tipo de tecido, aderente ou em suspensão);
- ✓ Fase de crescimento (as células devem ser congeladas na fase exponencial de crescimento);
- ✓ Agente crioprotetor (observar a concentração para cada linhagem celular)
- ✓ Necessidade de aditivos para melhorar a sobrevivência da célula (por exemplo, SFB);
- ✓ Taxa de congelamento (observar a taxa de congelamento na presença do crioprotetor selecionado);

- ✓ Condições de armazenamento (temperatura, fase líquida ou fase vapor do nitrogênio líquido);
- ✓ Método de descongelamento (por exemplo, taxa de descongelamento, diluição gradual para minimizar o choque osmótico e a substituição do crioprotetor).

O armazenamento na fase líquida do nitrogênio fornece a menor temperatura de armazenamento, conferindo maior estabilidade. Já o armazenamento em fase de vapor é geralmente considerado mais seguro, pois diminui os riscos de contaminação, apesar de requererem um maior monitoramento no nível do nitrogênio. Os sistemas de armazenamento elétrico (*ultrafreezer*), fornecem uma solução de armazenamento de baixa temperatura muito prática e livre da necessidade de abastecimento (GERAGHTY, 2014). No entanto, em um ambiente multiusuário, sem uma escala com controle de horário para abertura do freezer, o material estocado fica sujeito aos efeitos das flutuações de temperatura e sob alto risco em caso de falta de energia ou oscilação da rede elétrica.

Nos sistemas de imersão ou vapor de nitrogênio, a falha nos procedimentos de reabastecimento de nitrogênio líquido pode resultar na perda das linhagens celulares. É, portanto, vital, que existam procedimentos eficazes de treinamento e monitoramento para o enchimento e a manutenção dos recipientes com nitrogênio líquido. Além disso, é aconselhável o armazenamento de alíquotas de estoques em mais de um local, de preferência afastado do local principal de estocagem, também chamado de banco de células arquivo, como forma de mitigar qualquer problema que possa acontecer no banco de células mestre. A Tabela 5 apresenta os pontos positivos e negativos dos sistemas destacados acima, que devem ser avaliados na decisão da melhor forma de armazenagem.

**Tabela 5:** Comparação entre os métodos de armazenamento de linhagens celulares em temperaturas ultrabaixa.

| MÉTODO                           | VANTAGENS                                                                                                                                                                 | DESVANTAGENS                                                                                                                                                                                                                  |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Freezer Elétrico (-135°C)</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fácil manutenção;</li> <li>• Temperatura estável;</li> <li>• Baixo custo de operação.</li> </ul>                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Requer backup de nitrogênio líquido;</li> <li>• Requer manutenção;</li> <li>• As temperaturas não são tão baixas.</li> </ul>                                                         |
| <b>Nitrogênio Fase Líquida</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperatura ultrabaixa estável (-196°C);</li> <li>• Sem necessidade de manutenção.</li> </ul>                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Requer regular suprimento de nitrogênio líquido;</li> <li>• Alto custo de funcionamento;</li> <li>• Risco de contaminação cruzada devido a imersão no nitrogênio líquido.</li> </ul> |
| <b>Nitrogênio Fase Vapor</b>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sem risco de contaminação cruzada;</li> <li>• Alcança as baixas temperaturas;</li> <li>• Sistema simples e confiável.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Requer regular suprimento de nitrogênio líquido;</li> <li>• Alto custo de funcionamento;</li> <li>• Flutuação da temperatura entre -135°C a -190°C.</li> </ul>                       |

Fonte: Elaborado pela Autora, 2018.

#### 6.3.1.4 Contaminação

Uma variedade de contaminantes biológicos e químicos podem impactar negativamente as células na cultura, desde a destruição direta da cultura, mutação, alterações fenotípicas, alterações na morfologia, ou taxa de crescimento. Existem várias abordagens para detectar e mitigar o risco de contaminantes microbianos em culturas de células, já os contaminantes químicos normalmente surgem de uma manipulação inadequada ou através de reagentes de cultura celular, vidraria ou outros tipos de consumíveis não devidamente limpos e estéreis.

Um outro tipo de contaminação que também requer um monitoramento cuidadoso e uma vigilância constante é a contaminação de uma linhagem celular com outra linhagem celular, também conhecida como contaminação cruzada (NARDONE, 2007; YU, 2015). A contaminação cruzada entre linhagens celulares ocorre por meio de erro humano, como a má rotulação ou a má manipulação da cultura. A contaminação de linhagens de células humanas (intra-espécies) é de longe a forma

mais prevalente e comum de contaminação, como evidenciado pelo alto número de relatos de linhagens celulares que são derivados ou contaminadas com HeLa (BUEHRING, 2004; HORBACH, 2017). A contaminação de linhagem celular não humana (inter-espécies) tem recebido menos atenção, mas acredita-se que afeta aproximadamente 6% das culturas (YU, 2015).

Dentre os contaminantes químicos preocupantes incluem endotoxina bacteriana gram-negativa, detergentes residuais, radicais livres, metais pesados e fixadores residuais. A ocorrência de contaminação química é mitigada através de aderência às melhores práticas de manipulação evitando o uso de tais materiais de forma concomitante dentro da cabine de segurança biológica e evitando também o uso de solventes voláteis dentro de incubadoras (NIMS, 2017).

Os contaminantes biológicos mais comumente encontrados em linhagens celulares são micoplasma, bactérias, leveduras e outros fungos que podem resultar na perda completa dessas culturas celulares, na maioria dos casos, as contaminações por bactérias e fungos são facilmente reconhecidas, geralmente visível a olho nu e detectadas por um aumento repentino na turbidez e mudança de cor do meio de cultura, como resultado de uma alteração no pH (FRESHNEY, 2010; GERAGHTY, 2014). Não sendo possível o descarte dessas culturas contaminadas, elas são passíveis de tratamento com antibiótico (LANGDON, 2004).

No caso de contaminação por vírus, em contraste com a contaminação por bactérias ou fungos, que podem ser detectados com relativa facilidade, representa uma grave ameaça devido à dificuldade em se identificar sua ocorrência e também devido à falta de métodos eficazes de tratamento de culturas de células infectadas (MERTEN, 2002). Enquanto alguns vírus são capazes de causar alterações morfológicas nas células infectadas (por exemplo, efeito citopático) detectáveis por microscopia, algumas contaminações virais resultam na integração do genoma viral não provocando nenhuma evidência visual, por meio da modificação da morfologia celular (GARNICK, 1996).

As fontes de contaminantes virais podem ser diversas, além das próprias linhagens celulares que podem já virem contaminadas, pois a contaminação pode já estar presente desde o tecido do qual a célula foi originada, ou conterem retrovírus endógenos, ou pode vir dos insumos de origem animal (SFB e Tripsina). Vale ressaltar

que vírus de camundongos também são possíveis contaminantes de linhagens celulares (MERTEN, 2002).

Para a detecção de contaminantes virais, o método clássico consiste em fazer o isolamento viral colocando uma alíquota do sobrenadante/lisado da cultura celular a ser testada 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, depende da capacidade de multiplicação do vírus contaminante nas células susceptíveis e, por este motivo, o isolamento viral é mandatório pelo *Food and Drug Administration* para a detecção de vírus (FDA 2010).

No Brasil, Oliveira e colaboradores (2013) desenvolveram um trabalho para a detecção por PCR de alguns agentes adventícios como micoplasmas, circovírus suíno 1 (PCV1), vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e o parvovírus suíno (PPV) e fizeram o levantamento destas contaminações em culturas celulares, amostras de soro fetal bovino e amostras de tripsina utilizados em oito laboratórios veterinários brasileiros. 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 superior a 50% com PPV. Vale destacar entre os resultados, que o DNA de micoplasma foi detectado em células de todos os laboratórios analisados.

Uma contaminação não detectada com microrganismos de crescimento lento, ou com microrganismos resistentes aos antibióticos, podem ter um impacto significativo na qualidade e na validade dos resultados obtidos a partir do uso dessas linhagens celulares (NIMS, 2017). A seguir algumas alterações gerais causadas nas linhagens celulares devido a contaminação microbiológica.

- ✓ Interferência com a taxa de crescimento celular (esgotando o meio de nutrientes);
- ✓ Alteração morfológica, como efeitos citopáticos;
- ✓ Alterações no DNA, RNA e síntese de proteínas;
- ✓ Indução de aberrações cromossômicas (por exemplo, *Mycoplasma orale* e *Mycoplasma arginini*);

- ✓ Alterações na membrana plasmática (interferência nos estudos dos receptores).

A observação microscópica diária das culturas assegurará a detecção precoce da contaminação e possibilitará a ação apropriada assim que os primeiros sinais de contaminação se tornarem aparentes. Além disso, testes específicos para a detecção de bactérias e fungos devem ser usados como parte de um procedimento de triagem de controle de qualidade de rotina (NIMS & PRICE, 2017). E ainda, é importante que todas as instalações de cultura de células possuam medidas apropriadas para detectar e minimizar o risco de infecções bacterianas e virais.

#### 6.3.1.4.1 Micoplasma

Apesar da importância das contaminações bacterianas ou fúngicas em uma cultura de células, estas não são um problema tão sério visto que são facilmente detectadas. Já, a contaminação por micoplasma é mais preocupante por se tratar de infecções sutis, onde ocorre a replicação extensiva do microrganismo sem, no entanto, induzir mudanças perceptíveis na morfologia da cultura (NIKFARJAM, 2011).

Os micoplasmas são os menores procariotos de vida livre, com cerca de 0,2 a 0,3  $\mu\text{m}$  de diâmetro, capazes de se replicar com um genoma de cerca de 600 a 2200kb (BERILE, 1978). Atualmente são considerados o mais prevalente e sério contaminante de culturas celulares, tanto em laboratórios de pesquisa quanto em indústrias (ARMSTRONG, 2010).

Sobrenadantes da cultura e as membranas celulares são adequadas para o crescimento de micoplasma. Além disso, estes microrganismos são resistentes a antibióticos comuns e não podem ser detectados visualmente por turbidez do meio de cultivo. A frequência e impacto da contaminação por micoplasma tem sido amplamente discutido (BARILE, 1978; DREXLER, 2002; NIKFARJAM, 2012). A incidência de contaminação por micoplasma ainda é alta, sendo de 15 a 35% em todo o mundo chegando a incidências extremas 65 a 80%. As incidências de infecções por micoplasma com duas ou mais espécies de micoplasmas estão entre 7 e 60% (DREXLER, 2002; WRINGLEY, 2014).

Existem várias fontes diferentes de micoplasma e a contaminação em culturas de células normalmente está associada à espécies de micoplasma humano, bovino e suíno. As pessoas nos laboratórios são as principais fontes de *M. orale*, *M. fermentans* e *M. hominis*. Estas espécies representam mais da metade de todas as infecções por micoplasma em culturas celulares. *M. arginini* e *A. laidlawii* são outros dois micoplasmas encontrados tanto em culturas celulares como no Soro Fetal Bovino (SFB). Soluções de tripsina derivada de suínos são uma importante fonte de *M. hyorhinis* (NIKFARJAM, 2011; NIMS, 2017)).

Abaixo as principais fontes de contaminação por micoplasma em laboratórios de pesquisa (GERAGHTY, 2014):

- ✓ Contaminação cruzada a partir de outras células positivas para micoplasma;
- ✓ Equipamentos de laboratório e superfícies de trabalho;
- ✓ Pessoal de laboratório (normalmente através de infecções do trato respiratório);
- ✓ Meios de cultivo celular, soros e reagentes;
- ✓ A fase líquida do nitrogênio nos sistemas de criopreservação;
- ✓ Culturas celulares alimentadoras (como meios condicionados);
- ✓ Animais de laboratório.

Para a detecção de micoplasma, o método clássico é o de cultivo em meios específicos (FDA, 2010). Entretanto, esta é uma técnica demorada, e por questões técnicas e de biossegurança, requer pessoal experiente e instalações especiais. Além disso, nem todas as espécies de micoplasmas são facilmente cultiváveis, alguns casos de contaminação podem passar despercebidas.

Existem métodos de detecção não baseados no cultivo de micoplasma, como o rastreamento de adenosina fosforilase, marcadores celulares, bioquímicos e técnicas imunológicas, coloração de DNA, microscopia eletrônica, técnica de hibridização DNA-RNA, PCR, PCR/ELISA, PCR específica com primers multiplex e PCR em tempo real. Estes métodos são geralmente mais econômicos e mais fáceis de executar, no entanto, eles têm suas próprias desvantagens do ponto de vista da sensibilidade, especificidade e precisão (KAZEMIHA, 2014).

Dentre estes, a detecção baseada na reação de polimerase em cadeia (PCR) tornou-se um método difundido por basear-se, na amplificação de regiões específicas

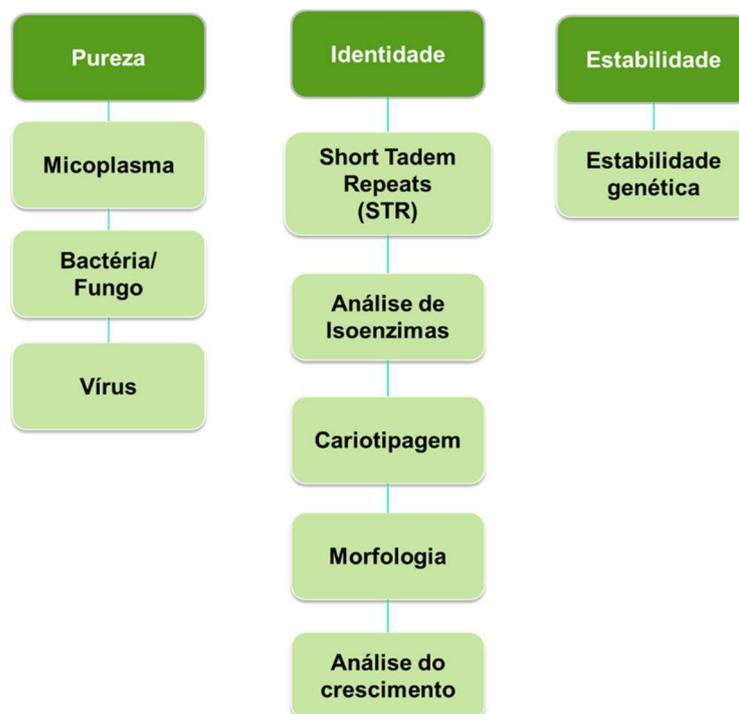
do genoma do micoplasma, com alta sensibilidade, tal que um número mínimo de material é necessário para a detecção. Uma outra opção de teste que se tornou popular pela rapidez são os testes bioquímicos que empregam reações de bioluminescência para detecção da presença de micoplasma nos extratos celulares e meios de cultura através da detecção da atividade de enzimas que estão presentes na grande maioria das espécies de micoplasma e ausentes nas células eucarióticas. Oferecem um formato de teste de rendimento relativamente alto quando automatizado, gerando resultados rápidos, em menos de uma hora (MARIOTTI, 2008).

Estudos comparativos entre os métodos de detecção ressaltam que as características de um método ideal são sensibilidade, especificidade, precisão, rapidez, custo, eficácia e facilidade de interpretação (UPHOFF, 1992; KAZEMIHA, 2014). É recomendável pelas boas práticas que se realize, pelo menos, dois testes com metodologias distintas, de forma paralela para reconhecimento de contaminação (NIMS, 2017; FOLGUERAS-FLATSCHART, 2018).

#### 6.3.1.5 Caracterização de Bancos Celulares

A qualidade das culturas de células e seus produtos é importante na pesquisa científica e crítica quando elas são usadas para diagnóstico e terapias. Aspectos fundamentais da qualidade das culturas celulares são a pureza, que é a ausência de agentes adventícios, a identidade correta, bem como a caracterização biológica adequada (NIMS & REID, 2017). A solução desses problemas garante que os dados experimentais e os produtos celulares atendam aos requisitos mínimos de precisão científica e aprovação regulamentar.

A FDA (2010) define caracterização como a determinação das propriedades de um banco de células. Freshney (2010) considera que a validação de uma linhagem celular se dá pela determinação da autenticidade, procedência e ausência de contaminação. Já a OMS (2010) considera três aspectos a serem avaliados, a identidade, a estabilidade e a pureza, esses aspectos devem ser examinados tanto no BCM, quanto no BCT.



**Figura 6:** Critério a serem avaliados na caracterização das linhagens celulares armazenadas nos Bancos de células.

**Fonte:** Elaborado pela Autora, 2019.

No Brasil, a RDC 55/2010 indica a necessidade de que as linhagens celulares, usadas para a produção de medicamentos biológicos, passem por caracterização, e que sejam demonstradas sua identidade, sua estabilidade e que ocorra a determinação dos agentes estranhos/ adventícios, que equivale a pureza (BRASIL, 2010).

Após a análise dos autores mais atuantes do assunto e dos documentos normativos, foi possível destacar que há uma concordância de que a caracterização de um banco de células depende de seu uso. Seu uso particular, deve guiar a determinação de qual teste é necessário e se testes adicionais podem ser importantes para a finalidade da linhagem celular (STACEY, 2004; FDA, 2010; OMS, 2010; FRESHNEY, 2010).

A identidade ou autenticidade é a determinação da natureza e origem de uma célula, bem como todo seu histórico e procedência. A estabilidade avalia a manutenção das características de uma célula tanto durante a permanência da célula no estado de congelamento, quanto durante o seu uso. A investigação dos diversos

tipos de contaminantes microbiológicos avalia a pureza de uma cultura celular (OMS, 2010).

Os documentos internacionais especificam quais testes de caracterização devem ser realizados nas linhagens celulares para se cumprir as exigências de Boas Práticas de Fabricação de produtos biológicos, estes testes são exaustivos na busca por erros de identidade, pureza ou estabilidade, não só das linhagens celulares, mas também de seus produtos e substratos (FDA, 2010; OMS 2010).

Alguns aspectos ressaltados na descrição da Garantia da Qualidade funcionam também como informação de caracterização das linhagens celulares, já que a finalidade da linhagem celular pode ajudar a determinar quais testes devem ser realizados. Assim os tópicos já destacados na garantia da qualidade fornecem uma caracterização básica, como a descrição morfológica, tempo de duplicação da célula, autenticidade e avaliação de contaminação microbiológica.

Existem bancos de dados disponíveis com informações específicas de diversas linhagens celulares, como destacado na Tabela 6, onde é possível confirmar dados de caracterização e buscar por informações sobre várias linhagens celulares (BAIROCH, 2018).

A observação, monitoramento e documentação simples de morfologia e comportamento celular, incluindo taxas de crescimento, fornecem um alerta precoce da ocorrência de alguma alteração celular e são práticas essenciais para o cultivo de linhagens celulares. As alterações podem indicar contaminação microbiana, deriva genotípica devido ao número de passagem elevada, ou devido algum contaminante químico, ou contaminação cruzada com outra linhagem celular. Métodos moleculares rápidos permitem a identificação de contaminação microbiana e cruzada. Cada vez mais, a autenticação de linhagens celulares é um pré-requisito para a publicação científica para evitar resultados errados que entram na literatura (REIDE, 2011).

**Tabela 6:** Banco de dados com informações sobre aspectos e características de linhagens celulares.

| Nome                                                          | Especificidade                                                 | Endereço eletrônico                                                                                                                                                                                 |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Cell Line Data Base (HyperCLDB)</b>                        | Características gerais                                         | <a href="http://bioinformatics.hsanmartino.it/hypercldb">http://bioinformatics.hsanmartino.it/hypercldb</a>                                                                                         |
| <b>Cellosaurus</b>                                            | Características gerais                                         | <a href="https://web.expasy.org/cellosaurus/">https://web.expasy.org/cellosaurus/</a>                                                                                                               |
| <b>Cell Line Ontology (CLO)</b>                               | Ontologia                                                      | <a href="http://www.clo-ontology.org">http://www.clo-ontology.org</a>                                                                                                                               |
| <b>Braunschweig Enzyme Database (BRENDA)</b>                  | Dados de tecidos e perfil enzimático                           | <a href="https://bioportal.bioontology.org/ontologies/BTO">https://bioportal.bioontology.org/ontologies/BTO</a>                                                                                     |
| <b>Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)</b>                   | Dados experimentais em células tumorais humanas                | <a href="https://portals.broadinstitute.org/ccle">https://portals.broadinstitute.org/ccle</a>                                                                                                       |
| <b>Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC)</b>          | Dados de resposta e sensibilidade contra fármacos antitumorais | <a href="https://www.cancerrxgene.org">https://www.cancerrxgene.org</a>                                                                                                                             |
| <b>Sanger Institute cancer cell-line project</b>              | Dados de mutações somáticas                                    | <a href="http://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines">http://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines</a>                                                                                                           |
| <b>CellFinder</b>                                             | Portal integrativo                                             | <a href="http://www.cellfinder.org/">http://www.cellfinder.org/</a>                                                                                                                                 |
| <b>CellMiner</b>                                              | Portal integrativo                                             | <a href="https://discover.nci.nih.gov/cellminer/home.do">https://discover.nci.nih.gov/cellminer/home.do</a>                                                                                         |
| <b>ATCC</b>                                                   | Perfil STR                                                     | <a href="https://www.atcc.org/STR_Database.aspx">https://www.atcc.org/STR_Database.aspx</a>                                                                                                         |
| <b>DSMZ</b>                                                   | Perfil STR                                                     | <a href="https://www.dsmz.de/services/services-human-and-animal-cell-lines/online-str-analysis.html">https://www.dsmz.de/services/services-human-and-animal-cell-lines/online-str-analysis.html</a> |
| <b>Cell Line Integrated Molecular Authentication Database</b> | Perfil STR                                                     | <a href="http://bioinformatics.hsanmartino.it/clima2">http://bioinformatics.hsanmartino.it/clima2</a>                                                                                               |

Fonte: BAIROCH, 2018.

### 6.3.1.6 Autenticação

O aumento marcante nas pesquisas com linhagens celulares trouxe à tona o problema do surgimento de dados não confiáveis pela utilização de linhagens contaminadas com outros tipos celulares ou mal identificadas (FREEDMAN, 2015). Revistas da família *Nature* iniciaram em 2013 a exigir dos autores a declaração de origem e autenticidade das linhagens celulares. Apesar desta política, a grande maioria dos autores não tem declarado o uso de células autenticadas em seus estudos. Uma amostragem nos últimos dois anos de artigos, publicados em diferentes jornais da família *Nature*, apenas 10% dos autores afirmaram que utilizaram linhagens autenticadas (EDITORIAL NATURE, 2015). Se somarmos isto à informação de que aproximadamente um terço dos autores afirmam que as linhagens celulares foram obtidas de outros grupos de pesquisa e, possivelmente, não são autenticadas, a confiabilidade dos resultados publicados nestes artigos fica prejudicada (YU, 2015).

Uma forma de mitigar esse problema é utilizar métodos para identificação precisa das linhagens celulares, esse processo é chamado de autenticação. No guia de boas práticas para Centro de Recursos Biológicos (CRBs) da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) autenticação é o processo pelo qual os materiais biológicos são caracterizados até um nível definido, usando tecnologia adequada para estabelecer uma base conclusiva para aceitação do material como genuíno (OECD, 2007).

No final da década de 50 surgiu o primeiro relato sobre uma linhagem celular identificada de forma errada e desde então os institutos de pesquisa buscaram entender e combater o problema (ATCC, 2010). Em 1962 foi criado o banco de células *American Type Culture Collection* (ATCC), que desde a sua criação testava todas as células de origem humana e não humana por cariotipagem (análise do padrão cromossômico), ou por eletroforese de isoenzimas (NELSON-REES, 1974), conferindo um status de “autenticado” ao seu acervo desde a sua criação.

A cariotipagem foi a primeira técnica que permitiu a identificação de uma linhagem celular contaminada. Trata-se de uma metodologia bem estabelecida e descrita para análise de aberrações cromossômicas de mamíferos (NELSON-REES, 1974, OMS, 2010). Contudo, para a análise de linhagens celulares, a

cariotipagem pode apresentar uma dificuldade, uma vez que linhagens cultivadas por longos períodos de tempo estão sujeitas a uma instabilidade, gerando uma heterogeneidade celular (PARSON, 2005; Yu, 2015). Além disso, é um método trabalhoso e com análise demorada, não sendo sensível na detecção de uma contaminação cruzada com outra linhagem celular (OMS, 2010), apesar de ser capaz de determinar gênero, ploidia e estabilidade genética (FDA, 2010). Alguns sistemas automatizados, que utilizam marcadores para cada cromossomo, tornaram a técnica menos laboriosa, porém, de custo mais elevado (LANGDON, 2004; PADILLA-NASH, 2006). 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 (NIMS & REID, 2017).

A análise de isoenzimas detecta polimorfismos de enzimas citosólicas, já que cada espécie tem um perfil distinto de isoenzima. Este fato se reflete no padrão de migração quando as enzimas são analisadas por eletroforese, permitindo assim discriminar linhagens celulares de diferentes espécies animais (LANGDON, 2004). 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 outras mais modernas (FOLGUERAS-FLATSCHART, 2018).

A maior parte do DNA humano é idêntico em todos os indivíduos. No entanto, existem regiões que podem variar de pessoa para pessoa. As variações na sequência de DNA entre indivíduos são denominadas polimorfismos. Sequências com o maior grau de polimorfismo são, portanto, usadas para análise de DNA em casos forenses e testes de paternidade. Esta atividade baseia-se na análise da herança de uma classe de polimorfismos de DNA conhecidos como Repetições Curtas em Tandem, os STRs (BUTLER, 2007). Os STR normalmente de comprimento de 2 a 5 pares de bases, que são repetidos várias vezes em sequência. Um exemplo é a sequência de

16 pb de "gatagatagatagata" que possui quatro cópias da sequência "gata" repetidas (BUTLER, 2005).

O amplo uso na tipagem de DNA forense dessa técnica gerou um impacto positivo no desenvolvimento de equipamentos, procedimentos, validação e, por consequência, um amadurecimento do conhecimento da técnica. Isso a tornou mais robusta, reprodutível, passível de automatização, relativamente barata e com inúmeros kits comerciais já validados disponíveis. Dessa forma, a impressão digital de DNA, como passou a ser conhecida, provou ser uma abordagem valiosa para autenticar e caracterizar linhagens celulares (MASTERS, 2001).

Em 2011 a ATCC organizou um grupo internacional compostos por cientistas, agências reguladoras, grandes Bancos de células e Indústrias para desenvolver um protocolo que descreva a melhor prática de autenticação celular, dentre os vários métodos disponíveis foi feita a recomendação para o uso da metodologia de STR (*Short Tandem Repeat*). Esse grupo de trabalho gerou um protocolo para autenticação de linhagens celulares humanas pelo método de STR junto a ANSI (*American Nacional Standards Institute*) ANSI/ATCC ANS0002-2011 (*American Type Culture Collection*, 2010).

Algumas são as vantagens de se utilizar este método para a autenticação das linhagens celulares: é possível hoje encontrar um extenso banco de dados de perfis SRT disponibilizados pelas grandes coleções de cultura de células, como exemplificados na Tabela 6, facilitando o acesso dos perfis STR das linhagens celulares mais usadas. Comercialmente existem *kits* padronizados com uma combinação dos principais perfis STR para a autenticação de linhagens humanas que oferecem interação com banco de dados on-line (CAPES-DAVIS, 2013).

É importante destacar que, embora a análise de STR possa ser usada para a identificação de todas as espécies animais, atualmente o uso desses marcadores em bancos celulares é específico para células e tecidos humanos e poucas iniciativas tentam aplicar essa metodologia em outras espécies (ALMEIDA, 2014)

Além disso, o método de autenticação por STR também possui algumas desvantagens, o método não é útil para determinar contaminação entre espécies, apesar de alguns *kits* comerciais colocarem em sua combinação de *primers*

marcadores murinos. Um problema presente em linhagens tumorais é que muitas delas podem apresentar defeitos no reparo do DNA que podem causar instabilidade de microssatélites podendo então inferir instabilidade dos STRs (PARSON, 2005; ELTONSY, 2012; YU, 2015).

No Brasil poucos são os relatos de grupos de pesquisa que realizam autenticação de suas linhagens celulares. Cosme e colaboradores (2017) avaliaram cerca de 90 linhagens e encontraram aproximadamente 12% de células com contaminação cruzada ou erros de identificação, dados que se aproximam da taxa de erros de identificação encontrada mundialmente. No país, somente o laboratório de Bioengenharia tecidual do Inmetro oferece como serviço a análise por STR para linhagens celulares humanas, e apesar disso menos de 10 instituições já solicitaram o serviço (FOLGUERAS-FLATSCHART, 2018). A comunidade científica brasileira começa a conhecer a necessidade de autenticação celular como parte do processo de pesquisa, por isso a importância de divulgar e discutir metodologias para facilitar o acesso à informação e contribuir para a diminuição desse problema no Brasil.

A autenticação de linhagens celulares humanas pela metodologia do perfil STR oferece uma excelente solução, mas como todas as metodologias, os resultados devem ser interpretados com cuidado e considerar o contexto no qual as linhagens estão sendo mantidas. A validação ajudará a assegurar as linhagens celulares humanas como modelos representativos para a pesquisas biomédicas e biotecnológicas.

Para a autenticação de linhagens celulares não humanas ainda não há um consenso do melhor método a ser utilizado. Uma abordagem utilizada atualmente é o BARCODE de DNA, que realiza a análise da subunidade 1 do citocromo C oxidase (CO1), utilizada para identificação interespecies (NIMS & REID, 2017). A ANSI publicou em 2015 uma metodologia padrão dessa técnica, a ANSI/ATCC ASN-003, sendo provável que este método passe a ser amplamente utilizado na identificação de linhagens celulares não humanas (FOLGUERAS-FLATSCHART, 2018).

A autenticação das linhagens celulares é considerada hoje como uma das principais medidas de controle da qualidade que vem sendo exigidas por algumas agências de financiamento e também revistas científicas (FUSENIG, 2017).

### 6.3.2 Gestão da Qualidade

Na ausência de diretrizes nacionais ou internacionais para qualidade na pesquisa básica, a OMS com o manual de Práticas de Qualidade na Pesquisa Biomédica Básica, traz como foco a qualidade e apresenta que um Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) poderá assegurar qualidade, rastreabilidade, confiabilidade e integridade dos dados (OMS, 2006). A importância das práticas de qualidade em pesquisa básica vem crescendo a cada dia, no Brasil cresce a preocupação com as atividades de implementação do SGQ, mas também com as consequências geradas, na pesquisa, pelas mudanças e ajustes propostos pelo SGQ (PRESOT, 2014).

Um SGQ envolve várias etapas e o sucesso da implementação desse sistema depende do comprometimento dos envolvidos e representa mais do que estabelecer procedimentos (PRESOT, 2013). De acordo com a NBR ISO 9000-2015 um Sistema de gestão da qualidade envolve a garantia da qualidade, que é a parte da gestão da qualidade focada em prover confiança de que os requisitos da qualidade serão atendidos. Portanto, é uma área que está relacionada ao atendimento dos requisitos de qualidade no processo como um todo (produção, pessoas, equipamentos, demais departamentos) (ISO, ABNT NBR ISO 9000, 2000).

Mesmo um laboratório de pesquisa não possuindo um Sistema de gestão da qualidade implementado, é possível, com base nos manuais destacados acima, pôr em prática alguns tópicos de um SGQ para assegurar que os requisitos da qualidade serão atendidos durante a execução das atividades envolvidas com as técnicas de cultivos celular.

#### 6.3.2.1 Garantia da Qualidade

A garantia da qualidade é um tópico relevante para as BPC. É de extrema importância o devido cuidado com todos os materiais e métodos, e suas aplicações, a fim de manter a integridade, validade e reprodutibilidade de qualquer trabalho realizado (BAL-PRINCE & COECKE, 2011). O objetivo da garantia de qualidade é confirmar a consistência, rastreabilidade e reprodutibilidade do trabalho realizado

utilizando linhagens celulares. Cada laboratório deve se preocupar e designar pessoas para supervisionar os seguintes itens:

- ✓ Linhagens celulares;
- ✓ Materiais;
- ✓ Protocolos e POP;
- ✓ Equipamentos e sua manutenção;
- ✓ Procedimentos de registro;
- ✓ Análise de resultados.

O laboratório deve ter protocolos específicos e POP para o recebimento de novas linhagens celulares, manutenção e armazenamento de todas as células, e ainda fichas e formulários de monitoramento de conformidade onde deverão ser considerados os seguintes fatores importantes:

- ✓ Autenticidade;
- ✓ Morfologia;
- ✓ Viabilidade;
- ✓ Taxa de crescimento;
- ✓ Número de passagens ou taxa de duplicação;
- ✓ Funcionalidade;
- ✓ Controle de atividade (que pode variar de acordo com o perfil do laboratório, exemplo: resposta a fármacos);
- ✓ Contaminação microbiológica ou cruzada (com outro tipo celular).

#### 6.3.2.2 Documentação

O registro das informações é de extrema importância para facilitar o rastreamento dos materiais e métodos utilizados e permitir reprodutibilidade do trabalho. A documentação deve ser de fácil acesso para auxiliar de forma precisa a divulgação das informações e resultados. Na metodologia de cultura de células, como em qualquer prática em ciência, a documentação dos sistemas utilizados e os procedimentos seguidos é obrigatória, a fim de permitir a rastreabilidade, interpretação e repetição do trabalho. Portanto, registros precisos do tipo de célula, origem,

autenticação e caracterização, e dos materiais utilizados e das técnicas de cultura realizadas, são essenciais (BAL-PRINCE & COECKE, 2011).

Toda a documentação deve ser rastreável, e é importante que se mantenha o registro de:

- ✓ Origem e caracterização das linhagens celulares;
- ✓ Dados laboratoriais, incluindo resultados, dados brutos e registros de controle;
- ✓ Dos equipamentos utilizados: uso, monitoramento, calibração e manutenção;
- ✓ Materiais e reagentes utilizados: tipos, fornecedores, lotes;
- ✓ Procedimentos de preservação, manutenção e armazenamento das linhagens celulares;
- ✓ Protocolos e POP.

O trabalho com cultura de células exige que um conjunto mínimo de informações seja conhecido e disponível, e para isso, é essencial saber se a linhagem celular é de origem animal ou humana, qual a espécie, no caso de linhagens celulares humanas, qual o sexo, idade, órgão/tecido de origem, tipo celular isolado, patógenos ou doença do doador (GERAGTHY, 2014). Assim como é importante armazenar toda a documentação associada, como o termo de transferência, condições de envio, estado do material na chegada, testes de identificação e contaminação.

No que diz respeito ao sistema de congelamento, as informações armazenadas devem permitir o rastreamento de dados importantes, e no ato do armazenamento deve-se registrar o número de células e volume por criotubo, a posição no container, data e realizador do procedimento, e deve existir uma área que indique a avaliação do lote pela viabilidade e eficiência de recuperação após o descongelamento, como exemplo a ficha no Apêndice A.

A documentação dos procedimentos é vital para o banco ser capaz de demonstrar que está adequado às normas regulamentares e para prever e solucionar problemas e falhas internas no controle de qualidade. A documentação deve incluir todas as informações das linhagens celulares depositadas, consistentemente gravadas dados do controle de qualidade, caracterização e os procedimentos

operacionais padrão para todos os principais processos e protocolos (BAL-PRINCE & COECKE, 2011).

Materiais e procedimentos usados para preparar cada banco de células também devem ser rastreáveis. Todos os dados disponíveis em uma determinada linhagem celular devem ser agrupados ou referenciados em um arquivo mestre próprio da linhagem que fornecerá uma fonte central de informações sobre essa célula e as ações estabelecidas no banco. O banco deve operar com um sistema de gerenciamento de inventário, esses procedimentos devem garantir a precisão e confiabilidade das rotulagens e registros de localização (COECKE, 2005).

Por outro lado, é imprescindível que todos os usuários sejam bem treinados nas melhores práticas em culturas de células, que o laboratório tenha experiência na preparação de banco de células, observação microscópica de células, bem como protocolos detalhados sobre as práticas de manutenção, expansão e armazenagem de linhagens celulares. O laboratório deve assegurar que as instalações sejam apropriadas, e os suprimentos e reagentes adequados e dentro da data de validade.

#### 6.4 Recebimento de Nova Linhagem Celular

Uma das primeiras considerações no gerenciamento de uma linhagem celular, é o recebimento da linhagem celular no laboratório. Existe um risco relativamente alto ao receber células de outro laboratório. As células simplesmente podem não apresentar mais as características da linhagem original e suas propriedades podem não ser mais garantidas, tornando o trabalho irreproduzível. Assim, o terceiro objetivo desta dissertação foi apontar quais os critérios devem ser averiguados durante a aquisição de uma nova linhagem celular e descrever este processo (Apêndice D).

Como primeiro passo, o responsável do banco de células, na hora de adquirir ou solicitar uma nova linhagem celular, deve fazer uma análise crítica, sendo recomendado fazer uma consulta no endereço eletrônico do *International Cell Line Authentication Committee (ICLAC)* para confirmar se a linhagem celular em questão não está classificada como contaminada ou mal identificada e, posteriormente, avaliar

o nível de biossegurança da cultura, as exigências nutricionais e as suas condições de cultivo (GERAGHTY, 2014).

Ao obter uma linhagem celular, a pesquisa de procedência deve ser um requisito fundamental, o que inclui os registros de origem e história, além de testes de controle de qualidade realizados para garantir que esteja livre de contaminantes. A partir dessas informações, é aconselhável a aquisição somente a partir de fontes onde a procedência esteja claramente documentada (FRESHNEY, 2002).

Assim é importante efetuar uma busca por informações, rastreáveis, da linhagem a ser adquirida:

- ✓ Nome da linhagem celular;
- ✓ Informações históricas, incluindo o tipo celular, número de passagens, taxa de duplicação, morfologia, marcadores moleculares específicos da linhagem;
- ✓ Informações clínicas relativas ao paciente, tecido de origem e doença;
- ✓ Procedimentos de manutenção e criopreservação;
- ✓ Meios de cultivo, suplementos e solução de criopreservação.

Para linhagens de culturas de células muitas dessas informações podem ser conseguidas em bancos de dados das grandes coleções ou ainda em endereços eletrônicos de instituições que se dedicam à qualidade no uso de linhagens celulares como o *ICLAC* (<https://iclac.org/>), *Cellosaurus* (<https://web.expasy.org/cellosaurus/>).

Outro ponto importante na aquisição e recebimento de linhagens celulares é a autenticação e qualidade certificados na origem. Uma série de coleções de cultura ou bancos de células comerciais tem todas as suas linhagens testadas quanto à identidade e contaminação por microrganismos. Essas grandes coleções de células rotineiramente autenticam seus estoques de linhagens celulares e fornecem um Certificado de Análise, incluindo um perfil STR, para cada linhagem por eles fornecida, além de realizarem outros testes de controle de qualidade e ainda manterem um perfil de caracterização de muitas das linhagens mantidas no estoque (GERAGHTY, 2014; FOLGUERAS-FLATSCHART, 2018).

Novas linhagens celulares, adquiridas de fontes que não mantenham todos os registros descritos acima, devem ser colocadas em quarentena no laboratório e durante o armazenamento, até que os testes de controle microbiológicos tenham sido

realizados, certificando que as células estão livres de contaminantes microbiológicos. Idealmente, um laboratório de quarentena deveria ser separado e estar disponível para este fim, ou pelo menos ter uma Cabine de segurança biológica de classe II e uma incubadora dedicados à quarentena. Se isso não for possível, outras medidas devem ser tomadas para minimizar o risco de contaminação, como: as linhagens celulares em quarentena devem ser manuseadas somente após todas as outras culturas de células terem sua manipulação concluída, a nova cultura deve ser colocada em um recipiente antes de entrar na incubadora geral, e a cabine de segurança biológica deve ser limpa após o uso com uma solução desinfetante adequada e mantida em funcionamento por, pelo menos, mais 5 min antes de ser desligada (GERAGHTY, 2014).

Tendo como ponto de partida as práticas adotadas no Laboratório de Farmacologia Molecular (Farmanguinhos/Fiocruz) para a aquisição e recebimento de linhagens celulares, foi realizado o mapeamento dessa atividade (Apêndice D), utilizando a ferramenta de modelagem de processo *Bizagi*, onde identificamos além das atividades discutidas acima, outras a serem executadas para que o processo de aquisição de nova linhagem celular possa atingir êxito para iniciar as atividades de criação do banco mestre (Apêndice E). Dentre estas atividades, a troca do termo de transferência de material biológico e o abastecimento dos bancos de dados do laboratório, ver item 6.3.1.6, com as informações sobre a linhagem celular são importantes para garantir cumprimento de algum aspecto legal referente ao uso da linhagem celular e dar acesso ao corpo técnico do laboratório às informações sobre a linhagem. O acesso às informações sobre a linhagem celular tem impacto direto na rotina e na realização dos experimentos nas pesquisas.

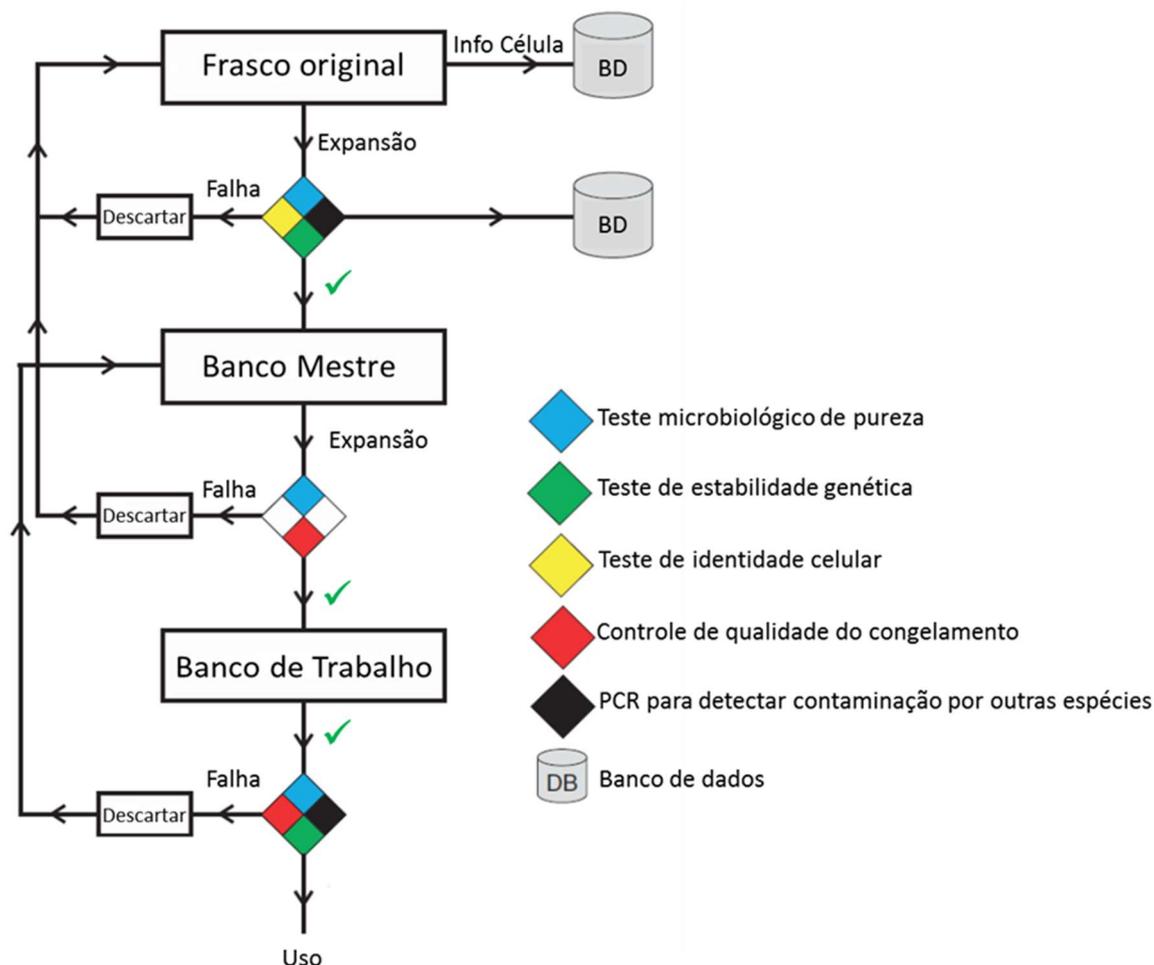
## 6.5 Estruturação de um Banco de Células

Baseado na documentação analisada, pode-se dizer que o banco de células é uma estrutura que segue uma lógica de armazenamento de ampolas com células congeladas para manter a rastreabilidade e qualidade das linhagens celulares ali armazenadas (STACEY, 2008). Uma lógica de estruturação do banco de células bem

aceita, consiste no banco de célula de dois estágios, onde primeiro gera-se o Banco de Células Mestre (BCM), com pelo menos cinco ampolas de células certificadas congeladas em nitrogênio líquido. A partir do Banco de Células Mestre é gerado o Banco de Células de Trabalho, composto por, pelo menos, dez ampolas de cada linhagem celular autenticada, que é utilizado para o fornecimento de linhagens padronizadas e de forma contínua. Esta é considerada uma estratégia prática para manutenção da qualidade da linhagem celular mantida e utilizada nos diferentes estudos (WRIGLEY, 2014).

O *International Council of Harmonisation (ICH)*, define que o Banco de Célula Mestre (BCM) é uma alíquota de um único conjunto de células que foi preparada a partir de um clone de células em condições definidas, distribuídas em vários recipientes e armazenadas em condições definidas. O BCM é usado para derivar todos os Bancos de Célula de Trabalho (BCT), que são preparados a partir de alíquotas de uma suspensão homogênea de células obtidas da cultura do BCM em condições de cultura definidas, como ilustrado nas Figuras 7 e 8 (ICH, 1997).

É importante observar as diretrizes e recomendações de boas práticas para a manutenção de um banco de células com estoques controlados e de qualidade. A Figura 7 descreve um fluxo de trabalho mínimo recomendado para gerenciar um banco de linhagens celulares em um laboratório de pesquisa de médio porte (YU, 2015).



**Figura 7:** Atividades e Processos Importantes para o Funcionamento de um Banco de Células em um Laboratório de Pesquisa de Médio Porte. O esquema abrange as principais etapas a serem seguidas para a formação de um Banco de Células.

**Fonte:** Adaptado de Yu, 2015.

Em grandes coleções de cultura de células e bancos de grandes indústrias farmacêuticas utiliza-se, além das formações descritas acima, um Banco de Células Arquivo que é composto por pelo menos 3 frascos do BCM, que deverá ser armazenado nas mesmas condições dos BCM e BCT, mas em um local alternativo, para mitigar o risco de falhas no armazenamento dos outros bancos (WRIGLEY, 2014).

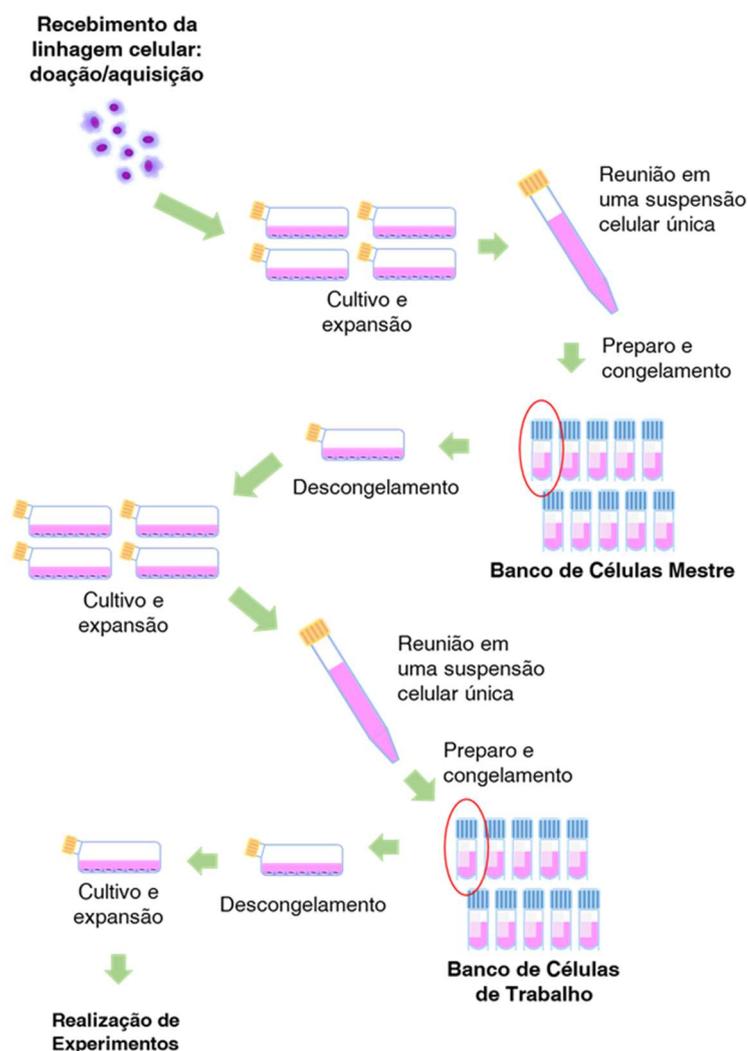
Portanto, quando uma nova linhagem celular é estabelecida ou recebida no laboratório, após serem verificados todos os elementos importantes para a aquisição de uma nova linhagem celular, ver item 6.6. Um estoque viável de células deve ser criopreservado imediatamente, em um estágio inicial. Este estoque inicial deve ser de

2 a 3 ampolas que irá fornecer um material de *backup* em caso de perda acidental durante o início da expansão da linhagem celular. Este estoque pode ser chamado de pré-Banco Mestre (STACEY, 2004), pois, possivelmente, até este momento a linhagem celular não passou ainda pelos principais testes de controle de qualidade, e por isso esse congelamento não pode ser considerado um BCM.

Após o cumprimento das etapas de confirmação da autenticidade e qualidade da linhagem recebida, ou abastecimento do banco de dados após a aquisição, deve-se expandir a linhagem celular para a formação do primeiro Banco de Células Mestre, com pelo menos cinco ampolas contendo de 1 a 5 milhões de células (GERAGHTY, 2014). O número de ampolas e a quantidade de células em seu conteúdo deve ser previamente avaliado, analisando a necessidade e aplicações de uso da linhagem celular a ser incorporada ao banco (STACEY, 2004; GERAGHTY, 2014; WRIGLEY, 2014). As recomendações da OMS para um banco de produção é de pelo menos 10 a 20 ampolas contendo de 5 a 10 milhões de células (OMS, 2010).

Durante o período de expansão do número de células, deve-se registrar as observações sobre as características morfológicas, condições de crescimento e proliferação, além dos testes de caracterização e controle de qualidade, quando necessários, abastecendo assim a ficha de cadastro da linhagem celular a ser adicionada ao Banco de Células (Apêndice B) (FRESHNEY, 2002). A documentação de cadastro da linhagem no BCM fornecerá os dados de referência para todo o trabalho futuro com a linhagem celular. Toda a caracterização, descrita no item 6.4, realizada no Banco de Células Mestre deve ser registrado na ficha de autenticação celular (Apêndice C).

É descrito para a produção de produtos biológicos que após o congelamento de ampolas do BCM, deve-se verificar a viabilidade de cada lote congelado. A exigência de viabilidade para esses bancos é superior a 80% (OMS, 2010). Normalmente, as células quando submetidas aos processos de congelamento e descongelamento adequados, devem ter níveis de viabilidade superiores a 80%, embora, dependendo da linhagem celular, isto possa não ser alcançado. Viabilidades inferiores podem ainda resultar em crescimento adequado e recuperação em qualidades aceitáveis, porém deve haver sempre o registro da viabilidade celular após descongelamento de cada lote.



**Figura 8:** Processo de formação de Banco de células de dois estágios. Os lotes de congelamentos devem ser formados a partir do pool de células como recomendado pela OMS (2010).  
**Fonte:** Elaborado pela autora, 2019.

Com relação ao teste de viabilidade a ser implementado, Stacey (2004) sugere que para laboratórios de pesquisa a viabilidade pode ser monitorada pelo método de exclusão por coloração com azul de tripan. Além disso, deve-se confirmar a autenticação básica e a ausência de contaminação para enfim seguir para a criação do Banco de Células de Trabalho, com no mínimo dez ampolas contendo 1 a 20 milhões de células para 1ml de solução crioprotetora (HEIDEMANN, 2010), que deverá ser mais robusto e atender as necessidades propostas com fins experimentais. Novamente, dentro das normas para produção de medicamentos biológicos o BCT

deve ser submetido aos mesmos controles de qualidade do BCM (ICH 2005; FDA, 2010; OMS, 2010).

Recentemente, para atender uma demanda cada vez maior de testes robustos, rápidos e de baixo custo, surgiram os Bancos de Células “Pronto para Uso” (ZAMAN,2007). O objetivo desse banco é fornecer, como produto, as células diretamente do frasco criopreservado em um bioensaio, eliminando assim a etapa de expansão da célula e economizando tempo no processo. Esses bancos precisam ser maiores em números de ampolas, cerca de 400 a 1000 frascos, com um número significativo de células por frasco. Além disso deve-se garantir uma alta viabilidade celular de 80 a 90% no mínimo (ZAMAN,2007; TERWEE, 2011; MOGILYANSKIY, 2015).

Desta forma, o sistema de Banco de Células Mestre/Trabalho, se preparado corretamente, e mantido de forma alinhada aos padrões de boas práticas, pode fornecer informações reprodutíveis e estoques confiáveis de linhagens celulares idênticas ao longo de muitas décadas, o Apêndice F apresenta tópicos importantes para alcançar este objetivo. Através do uso da ferramenta *Bizagi*, foi realizado o mapeamento de processos (Apêndice E) relativos a criação do banco mestre e banco de trabalho. O mapeamento levou em consideração as recomendações e legislação identificados em nosso levantamento, assim como as práticas adotadas no Laboratório de Farmacologia Molecular de Farmanguinhos/Fiocruz. É importantíssimo realizar o registro das características da linhagem celular após a sua chegada, abastecendo o banco de dados do laboratório, através do preenchimento da ficha de cadastramento de linhagem (Apêndice B). Ressaltamos ainda que, no processo de criação dos bancos de células, a observação da rastreabilidade deve ser feita através da descrição dos lotes congelados documentados nas fichas de congelamento e descongelamento (Apêndice A), assim como a criação do plano de reposição. Essas ações garantem não só a rastreabilidade dos lotes de células gerados, mas também a sua manutenção, evitando o esgotamento dos estoques.

## 7 CONCLUSÃO

Como discutido ao longo do texto, o fornecimento de células de qualidade é essencial para permitir pesquisas com qualidade e reprodutibilidade. No entanto, fornecimento de células de qualidade não se resume a um único processo. Há muitas considerações legais, regulatórias e técnicas em cada etapa desta atividade para a garantia da qualidade do material fornecido.

Conclui-se que para trabalhar com linhagens celulares, devido à variedade de tipos celulares e a complexidade dos sistemas e modelos *in vitro* é, fundamental atentar-se para o controle de qualidade dos reagentes usados em culturas de células, melhores práticas de manipulação e das técnicas de criopreservação alinhados às Boas Práticas de Cultura de Células (BPCC).

Cabe ressaltar que a abordagem do banco de células de dois estágios oferece várias vantagens importantes sobre a criação de um banco de células de estágio único, garantindo maior segurança na preservação da linhagem celular armazenada e proporcionando maior flexibilidade, pois se a demanda por uma linhagem celular aumentar, então o tamanho do próximo estoque de trabalho pode ser aumentado de acordo com a necessidade.

Baseado no que foi discutido neste estudo, com a observação das legislações e recomendações, e o trabalho alinhado às boas práticas de cultura de células, é possível criar e manter um banco de células que pode fornecer material biológico de qualidade para os trabalhos de pesquisa básica e para os estudos de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, vacinas, produtos biotecnológicos e ferramentas terapêuticas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. L.; HILL, C. R.; COLE, K. D. Mouse cell line authentication. **Cytotechnology**, v. 66, n. 1, p. 133-147, 2014.

ALVES, P. M. M.; CARRONDO, M. J.T.; CRUZ, P.E. Introdução à tecnologia de cultivo de células animais. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR (eds.). **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica**. São Paulo: Roca, 2008. p. 2-14.

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Orgs). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. v. 2. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. p. 215-253.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION STANDARDS DEVELOPMENT ORGANIZATION WORKGROUP ASN-0002 et al. Cell line misidentification: the beginning of the end. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 6, 2010.

BAL-PRINCE A., COECKE S. Cell Culture Techniques, Neuromethods, v. 56 Humana Press: Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 2011 p1-25

BARRETINA, J. et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. **Nature**, v. 483, n. 7391, p. 603, 2012.

BAUST, J. M.; CAMPBELL, L. H.; HARBELL, J. W. Best practices for cryopreserving, thawing, recovering, and assessing cells. In **Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 53, n. 10, p. 855-871, 2017

BEGLEY, C. G.; ELLIS, L. M. Drug development: Raise standards for preclinical cancer research. **Nature**, v. 483, n. 7391, p. 531, 2012.

BUEHRING, G. C.; EBY, E. A.; EBY, M. J. Cell line cross-contamination: how aware are Mammalian cell culturists of the problem and how to monitor it?. In: **Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 40, n. 7, p. 211-215, 2004.

BUTLER, M. Animal cell culture and technology. New York: Taylor & Francis, 2004. p. 78-110.

BUTLER, J. M. **Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers**. Academic Press, 2005.

BUTLER, J. M. et al. Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. **Biotechniques**, v. 43, n. 4, p. 2-5, 2007.

BRASIL. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente

modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB, revoga a Lei no 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória no 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5o, 6o, 7o, 8o, 9o, 10 e 16 da Lei no 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 de mar. 2005.

\_\_\_\_\_. Resolução – RDC nº 33, de 17 de fevereiro de 2006. Aprova o Regulamento técnico para o funcionamento dos bancos de células e tecidos germinativos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 fev. 2010.

\_\_\_\_\_. Resolução – RDC nº 55, de 16 de dezembro de 2010. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 dez. 2010.

\_\_\_\_\_. Resolução – RDC nº 49, de 20 de setembro de 2010. Dispõe sobre a realização de alterações e inclusões pós-registro, suspensão e reativação de fabricação e cancelamentos de registro de produtos biológicos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 2010.

\_\_\_\_\_. Resolução – RDC nº 23, de 27 de maio de 2010. Dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento dos Bancos de Células e Tecidos Germinativos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 maio. 2010.

\_\_\_\_\_. Resolução – CNS nº 441, de 12 de maio de 2011. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 set. 2011.

\_\_\_\_\_. Portaria nº 2.201, de 14 de setembro de 2011. Estabelece as Diretrizes Nacionais para Biorrepositório e Biobanco de Material Biológico Humano com Finalidade de Pesquisa. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 set. 2011.

\_\_\_\_\_. Resolução – RDC nº 69, de 08 de dezembro de 2014. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 08 dez. 2014.

\_\_\_\_\_. Resolução – RDC nº 60, de 10 de outubro de 2014. Dispõe sobre os critérios para a concessão e renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 out. 2014.

\_\_\_\_\_. Resolução – RDC nº 55, de 11 de dezembro de 2015. Dispõe sobre as Boas Práticas em Tecidos humanos para uso terapêutico. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 dez. 2015.

\_\_\_\_\_. Lei nº 13.243, de 11 de janeiro de 2016. Dispõe sobre estímulos ao desenvolvimento científico, à pesquisa, à capacitação científica e tecnológica e à inovação e altera a Lei no 10.973, de 2 de dezembro de 2004, a Lei no 6.815, de 19 de agosto de 1980, a Lei no 8.666, de 21 de junho de 1993, a Lei no 12.462, de 4 de agosto de 2011, a Lei no 8.745, de 9 de dezembro de 1993, a Lei no 8.958, de 20 de dezembro de 1994, a Lei no 8.010, de 29 de março de 1990, a Lei no 8.032, de 12 de abril de 1990, e a Lei no 12.772, de 28 de dezembro de 2012, nos termos da Emenda Constitucional no 85, de 26 de fevereiro de 2015. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 jan. 2016.

\_\_\_\_\_. Resolução – RDC nº 72, de 30 de março de 2016. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 23, de 27 de maio de 2011, que dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento dos Bancos de Células e Tecidos Germinativos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 mar. 2016.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. **Guia de Gestão por processos**. 2014. Disponível em: <[https://intranet.fiocruz.br/ger\\_arquivo/arquivos/dab83.pdf](https://intranet.fiocruz.br/ger_arquivo/arquivos/dab83.pdf)>. Acesso em: 6 dez. 2018.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. **Manual de Modelagem de Processos em BPMN**. Instituto de Tecnologia em Fármacos, Rio de Janeiro, 2016.

CANHOS, V. P.; VAZOLLER, R. F. **Coleções de culturas de serviços e centros de recursos biológicos**. Brasília, DF: Centro de Referência em Informação Ambiental, 2005.

CAPES-DAVIS, A. et al. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. **International Journal of Cancer**, v. 127, n. 1, p. 1-8, 2010.

CAPES-DAVIS, A. et al. Match criteria for human cell line authentication: where do we draw the line?. **International Journal of Cancer**, v. 132, n. 11, p. 2510-2519, 2013.

CAPONIGRO, G.; SELLERS, W. R. Advances in the preclinical testing of cancer therapeutic hypotheses. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 3, p. 179, 2011.

CERRI, D. et al. O Pavilhão Mourisco e a Coleção Entomológica do Instituto Oswaldo Cruz: conservação preventiva e interdisciplinaridade. **Museologia e Patrimônio**, v. 7, n. 2, p. 107-121, 2014.

CHANG-LIU, C.; WOLOSCHAK, G. E. Effect of passage number on cellular response to DNA-damaging agents: cell survival and gene expression. **Cancer Letters**, v. 113, n. 1, p. 77-86, 1997.

COECKE, S. et al. Guidance on good cell culture practice: A report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. **Alternatives to laboratory animals: ATLA**, v. 33, n. 3, p. 261, 2005.

COECKE, S. et al. Guidance on good cell culture practice. In: **Cell technology for cell products**. Springer, Dordrecht, 2007. p. 313-315.

CONSELHO NACIONAL DO MINISTÉRIO PÚBLICO (CNMP). **Metodologia de gestão de processos: Projeto fomento à gestão de processos nos MPs**. Conselho Nacional do Ministério Público. Brasília. 2013. Disponível em: [http://www.planejamento.mppr.mp.br/arquivos/File/gerenc\\_processos/metodologia\\_cnm p.pdf](http://www.planejamento.mppr.mp.br/arquivos/File/gerenc_processos/metodologia_cnm p.pdf) Acesso em: 09 de janeiro de 2019.

COSME, B. et al. Are your results valid? Cellular authentication a need from the past, an emergency on the present. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 53, n. 5, p. 430-434, 2017.

DAVENPORT, T. H. A Natureza da Reengenharia de Processos. Reengenharia de Processos, Harvard Business School Press, Boston, 1993.

DE SOUZA, R. A. et al. Implementation of Good Laboratory Practices (NIT-DICLA-035, Inmetro) in a technological platforms network: the Fiocruz experience. *Accreditation and Quality Assurance*, v. 17, n. 3, p. 331-339, 2012

DOS SANTOS, E. R. et al. Panorama Brasileiro do Programa de Boas Práticas de Laboratório. Impacto na redução do uso de animais. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 3, n. 2, p. 20-28, 2015.

EDITORIAL NATURE, Announcement: Time to tackle cells' mistaken identity. **Nature**, v. 520, n. 264, 2015.

ELTONSY, N. et al. Detection algorithm for the validation of human cell lines. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 6, 2012.

FDA, CBER. Guidance for industry. Characterization and qualification of cell substrates and other biological materials used in the production of viral vaccines for infectious disease indications. **UCM202439. pdfmBio**, 2010. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/UCM202439.pdf>>. Acesso em: 23 out. 2017.

FOLGUERAS-FLATSCHART, A. V. et al. A importância do controle de qualidade de culturas utilizadas em ensaios biológicos e no desenvolvimento de pesquisas na área de saúde. **Vigil. Saint. Debate**, v. 6, n. 1, p. 96-108, 2018.

FREEDMAN, L. P. et al. The culture of cell culture practices and authentication-- Results from a 2015 Survey. **Biotechniques**, v. 59, n. 4, p. 189-90, 192, 2015.

FREEDMAN, L. P.; VENUGOPALAN, G.; WISMAN, R. Reproducibility2020: progress and priorities. **F1000Research**, v. 6, 2017.

FRESHNEY, R. I. Cell line provenance. **Cytotechnology**, v. 39, n. 2, p. 55-67, 2002.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. 6. ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2010.

FRESHNEY, R. I. Database of misidentified cell lines. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 1, p. 302-302, 2010.

FUSENIG, N. E. et al. The need for a worldwide consensus for cell line authentication: experience implementing a mandatory requirement at the International Journal of Cancer. **PLoS biology**, v. 15, n. 4, p. e2001438, 2017.

GERAGHTY, R. J.; CAPES-DAVIS, A.; DAVIS, J. M.; DOWNWARD, J.; FRESHNEY, R. I.; KNEZEVIC, I.; LOVELL-BADGE, R.; MASTERS, J. R.; MEREDITH, J.; STACEY, G. N.; THRAVES, P. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. **British Journal of Cancer**. v. 111, n. 6, p. 1021-1977, 2014.

HARTUNG, T. Food for thought look back in anger—What clinical studies tell us about preclinical work. **ALTEX**, v. 30, n. 3, p. 275, 2013.

HARTUNG, T. et al. Good cell culture practice. **ATLA**, v. 30, p. 407-414, 2002.

HEIDEMANN, R. et al. Characterization of cell-banking parameters for the cryopreservation of mammalian cell lines in 100-mL cryobags. **Biotechnology progress**, v. 26, n. 4, p. 1154-1163, 2010

HUGHES, P. et al. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need?. **Biotechniques**, v. 43, n. 5, p. 575-588, 2007.

HORBACH, S. PJM; HALFFMAN, W. The ghosts of HeLa: How cell line misidentification contaminates the scientific literature. **PloS one**, v. 12, n. 10, p. 1-16, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, DOQ-CGCRE-034. Versão Brasileira do Documento Diretrizes da OCDE de Boas Práticas para Centros de Recursos Biológicos.. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa\\_link.asp?seq\\_tipo\\_documento=5&cod\\_uo\\_numeracao=00774&num\\_documento=034](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=5&cod_uo_numeracao=00774&num_documento=034)>. Acesso em: 11 de mar. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, NIT DICLA-035. Requisitos Gerais para Laboratórios segundo os Princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL), 2009. Disponível em: [www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa\\_link.asp?seq\\_tipo\\_documento=4&cod\\_uo\\_numeracao=00587&num\\_documento=035](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=4&cod_uo_numeracao=00587&num_documento=035). Acesso em: 13 de dez. 2018.

The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products. 29 oct. 2009. Disponível em:

<[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q5D/Step4/Q5D\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5D/Step4/Q5D_Guideline.pdf)>. Acesso em: 11 fev. 2017.

ISO, ABNT NBR. 9000: 2000 Sistemas de gestão da qualidade. Fundamentos e vocabulário. Rio de Janeiro, 2000.

KIPPER, L. M. et al. Gestão por processos: Comparação e análise entre metodologias para implantação da gestão orientada a processos e seus principais conceitos. **Tecno-Lógica**, v. 15, n. 2, p. 89-99, 2011.

LANGDON, S. P. Characterization and Authentication of Cancer Cell Lines. In: Cancer Cell Culture. **Humana Press**, 2004. p. 33-42.

LÉO, P.; GALES, A. L. L.; SUAZO, C. A. T.; MORAES, A. M. Células animais: conceitos básicos. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. (Orgs). **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica**. São Paulo: Roca; 2008. p. 15-41.

LONGARAY, A. A. et al. Proposta de mapeamento de processos usando a BPMN: Estudo de caso em uma indústria da construção naval brasileira. **Revista Eletrônica de Estratégia & Negócios**, v. 10, p. 247-275, 2017

MASTERS, J. R. et al. Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 14, p. 8012-8017, 2001.

MASTERS, J. R. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 315, 2002.

MOGILYANSKIY, L.; BYER, H.; WANG, W. Mastering cell bank production. **BioPharm Int**, v. 28, n. 8, p. 20-24, 2015

MORAES, A. M.; MENDONÇA, R.Z.; SUAZO, C. A. T. Meios de cultura para células animais. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. (Orgs). **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica**. São Paulo: Roca; 2008. p. 105-21.

NELSON-REES, W. A.; FLANDERMEYER, R. R.; HAWTHORNE, P. K. Banded marker chromosomes as indicators of intraspecies cellular contamination. **Science**, v. 184, n. 4141, p. 1093-1096, 1974.

NELSON-REES, W. A. Responsibility for truth in research. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 356, n. 1410, p. 849-851, 2001.

NIKFARJAM, L.; FARZANEH, P. Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture. **Cell Journal (Yakhteh)**, v. 13, n. 4, p. 203, 2012.

NIMS, R. W.; HARBELL, J. W. Best practices for the use and evaluation of animal serum as a component of cell culture medium. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, v. 53, n. 8, p. 682-690, 2017.

NIMS, R. W.; PRICE, P. J. Best practices for detecting and mitigating the risk of cell culture contaminants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, v. 53, n. 10, p. 872-879, 2017

NIMS, R. W.; REID, Y. Best practices for authenticating cell lines. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal***, v. 53, n. 10, p. 880-887, 2017.

OLIVEIRA, T. F. P. *et al.* Detection of contaminants in cell cultures, sera and trypsin. ***Biologicals***, v. 41, n. 6, p. 407-414, 2013.

Organização Mundial de Saúde (OMS) Quality Practices in Basic Biomedical Research. Geneva: WHO; 2006. Disponível em:  
[https://www.who.int/tdr/publications/documents/quality\\_practices.pdf?ua=1](https://www.who.int/tdr/publications/documents/quality_practices.pdf?ua=1)

Organização Mundial de Saúde (OMS) 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: WHO; mai 2010. Disponível em:  
<[http://www.who.int/biologicals/Cell\\_Substrates\\_clean\\_version\\_18\\_April.pdf](http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf)>. Acessado em 09 mar. 2017.

Organization for Economic Co-operation and Development – OECD, **OECD Series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring**. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development; 1998.

PAMIES, D. et al. Good cell culture practice for stem cells and stem-cell-derived models. *Alternatives to Animal Experimentation: ALTEX*, v. 34, n. 1, p. 95-132, 2017.

PARSON, W. et al. Cancer cell line identification by short tandem repeat profiling: power and limitations. ***The FASEB journal***, v. 19, n. 3, p. 434-436, 2005.

PIRMEZ, C. CRB – Saúde Fiocruz e Rede Brasileira de Centros de Recursos Biológicos. **II Encontro das Coleções Biológicas da Fiocruz**, p. 24, 2015.

PRESOT, Ivanete Milagres et al. Educação permanente em sistema de gestão da qualidade: diagnóstico e desenvolvimento de uma proposta para laboratórios de pesquisa. 2013. Tese de Doutorado.

PRESOT, I. M. et al. A percepção da qualidade em laboratórios de pesquisa da Fiocruz após a implementação do SGQ. ***Revista de Administração Pública***, v. 48, n. 1, p. 237-252, 2014.

PRICE, P. J. Best practices for media selection for mammalian cells. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal***, v. 53, n. 8, p. 673-681, 2017.

REID, Y. A. Characterization and authentication of cancer cell lines: an overview. In: **Cancer Cell Culture**. Humana Press, 2011. p. 35-43.

ROMANO, P. et al. Cell Line Data Base: structure and recent improvements towards molecular authentication of human cell lines. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. suppl\_1, p. D925-D932, 2008.

STACEY, G. N. et al. Cryopreservation and banking of mammalian cell lines. **Nature Protocols**, v. 3, n. 12, p.1981-1989, 2008.

TERWEE, J. A. et al. Increased consistency and efficiency in routine potency testing by bioassay with direct use of cryopreserved (ready-to-plate) cells. **Journal of immunological methods**, v. 370, n. 1-2, p. 65-74, 2011.

UNCHERN, S. Basic techniques in animal cell culture. In: **Drug Delivery System Workshop**. 1999, p. 19-20.

VACCARI, A. E. et al. A aplicação da gestão de processos em uma organização tipicamente funcional. XXVIII Encontro Nacional de Engenharia de Produção, Rio de Janeiro, 2008.

WILDING, J. L.; BODMER, W. F. Cancer cell lines for drug discovery and development. **Cancer Research**, v. 74, n. 9, p. 2377-2384, 2014.

WINGLEY C.B. The cell culture laboratory. In: DAVIS, J. M. **Basic cell culture: A practical approach**. New York: Oxford University press, 2002. p. 1-26.

WFCC. Site World Federation for Culture Collections. Disponível em: <<http://www.wfcc.info/collections>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

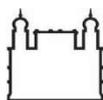
WRIGLEY, J. D. et al. Cell banking for pharmaceutical research. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 10, p. 1518-1529, 2014.

YU, M. et al. A resource for cell line authentication, annotation and quality control. **Nature**, v. 520, n. 7547, p. 307, 2015.

ZAMAN, G. JR et al. Cryopreserved cells facilitate cell-based drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 13-14, p. 521-526, 2007.



## APÊNDICE B – FICHA DE CADASTRAMENTO DE LINHAGEM CELULAR



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



### FICHA DE CADASTRAMENTO DE LINHAGEM CELULAR

Linhagem: **U87-MG** Data de Chegada: 02/12/2014  
 Depósito  Doação  Aquisição  
 Procedência: Banco de Células do Rio de Janeiro

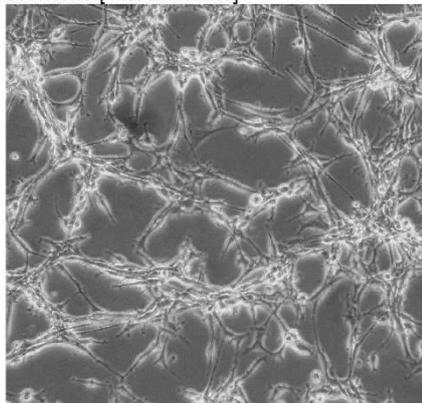
#### Preenchimento no recebimento

**Espécie:** Homo sapiens **Tecido:** Cérebro **Patologia:** Glioblastoma  
**Sexo:** M **Idade:** NI **Autenticada:**  SIM  NÃO  Não Informado **Método Autenticação:**  STR Outro:  
**Nível Biossegurança:** 1 **Micoplasma:**  Pos  Neg  Não Informado  
**Distribuição restrita?**  SIM  NÃO  
**Crescimento:** Aderente **Meio de Criopreservação:** Soro bovino fetal 95% + DMSO 5% **Número da passagem celular no recebimento:** 141  
**Manutenção:** Meio: DMEM  
**Antibiótico(s):** penicilina 100U/mL  
 estreptomicina 0,1mg/mL  
 gentamicina 50µg/mL  
**Suplementos:** soro fetal bovino 10%

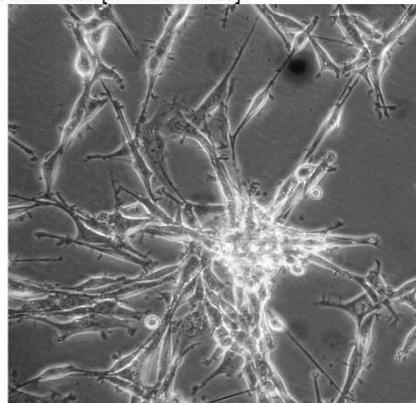
#### Preenchimento complementar após recebimento (se aplicável)

**Autenticação após recebimento** **Método Autenticação:**  
**Data:**  STR Outro:  
**Teste micoplasma após recebimento**  Pos  Neg  
**Data:**  Sim  Não  
**Descontaminada para micoplasma**  
**Status na coleção:**  
 Incorporada  
 Rejeitada - não conformidade:  
**Data:** **Responsável:**

fotomicrografia da linhagem celular em crescimento [10x aumento]



fotomicrografia da linhagem celular em crescimento [20x aumento]



Informações complementares:

NI = não informado

POP FARMOL 013/01

MODELO FARMACOLOGIA MOLECULAR

## APÊNDICE C – FICHA DE AUTENTICAÇÃO



### FICHA DE AUTENTICAÇÃO CELULAR

**Linhagem:**

**Data de Chegada:** Maio/2013

**MCF7**

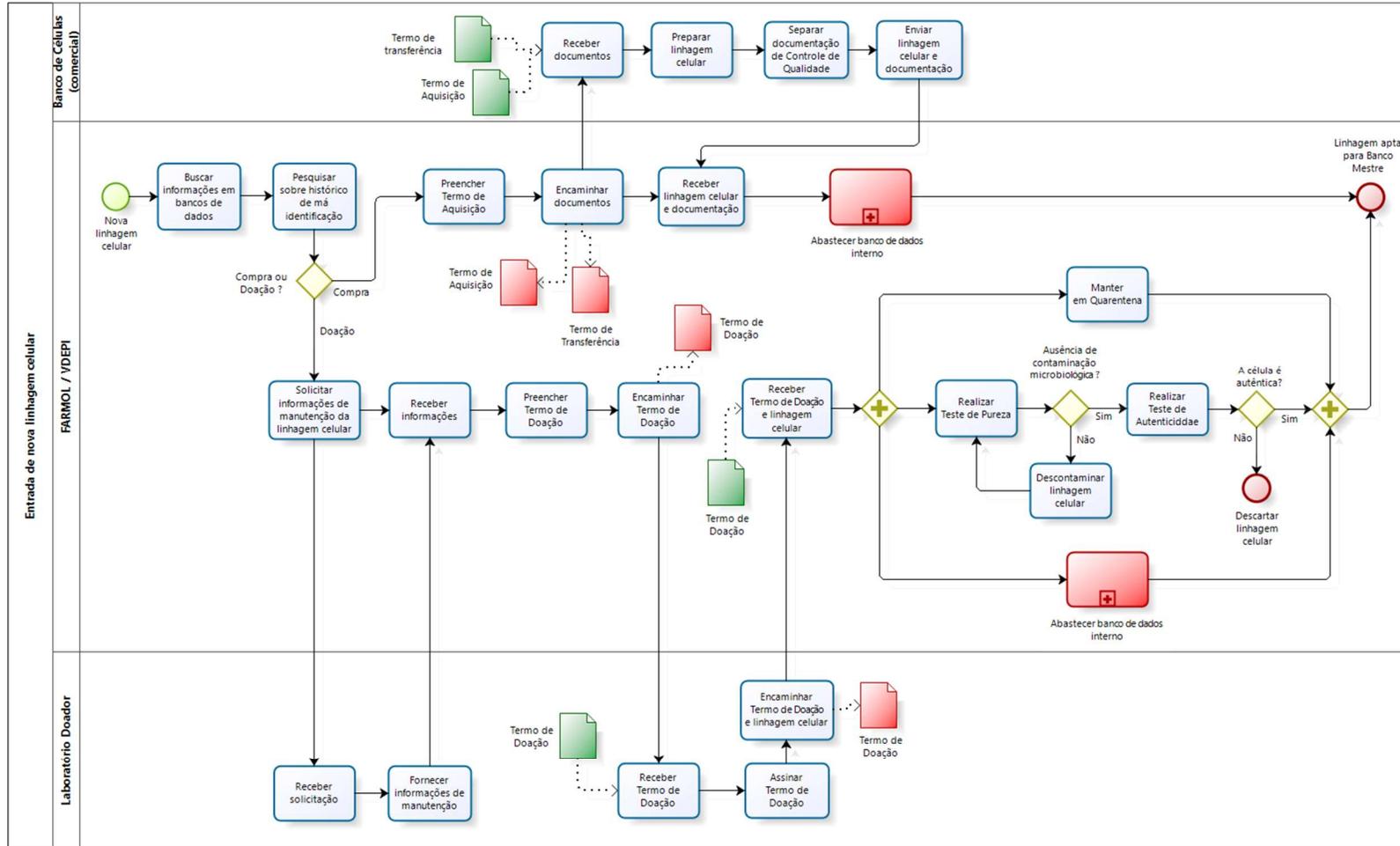
**Procedência:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Echervarria Neves de Lima  
Dep Imunologia – IMPG/ UFRJ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                        |                                          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Data do congelamento                                                                                                                                                                                                                                                            | Data descongelamento                                                                                                                                                                                                                                                 | Número da passagem                                                                                                                                                                                                     |                                          |
| Método de autenticação:<br><input type="checkbox"/> STR – 10 loci<br><input type="checkbox"/> STR – 18 loci<br><input type="checkbox"/> Marcador murino<br><input type="checkbox"/> Cariotipagem<br><input type="checkbox"/> Genotipagem<br><input type="checkbox"/> Isoenzimas | Método complementar de caracterização celular:<br><input type="checkbox"/> Sensibilidade a fármacos<br><input type="checkbox"/> Fotomicrografia<br><input type="checkbox"/> Citometria de fluxo para antígenos específicos<br><input type="checkbox"/> Atividade Pgp | Micoplasma<br><input type="checkbox"/> PCR<br><input type="checkbox"/> Bioluminescência<br><input type="checkbox"/> Microscopia<br>Resultado<br><input type="checkbox"/> Positivo<br><input type="checkbox"/> Negativo |                                          |
| STATUS                                                                                                                                                                                                                                                                          | <input type="checkbox"/> AUTENTICADA                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                        | <input type="checkbox"/> NÃO AUTENTICADA |
| Não conformidades:                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                        |                                          |
| Responsável:                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                      | Data                                                                                                                                                                                                                   |                                          |

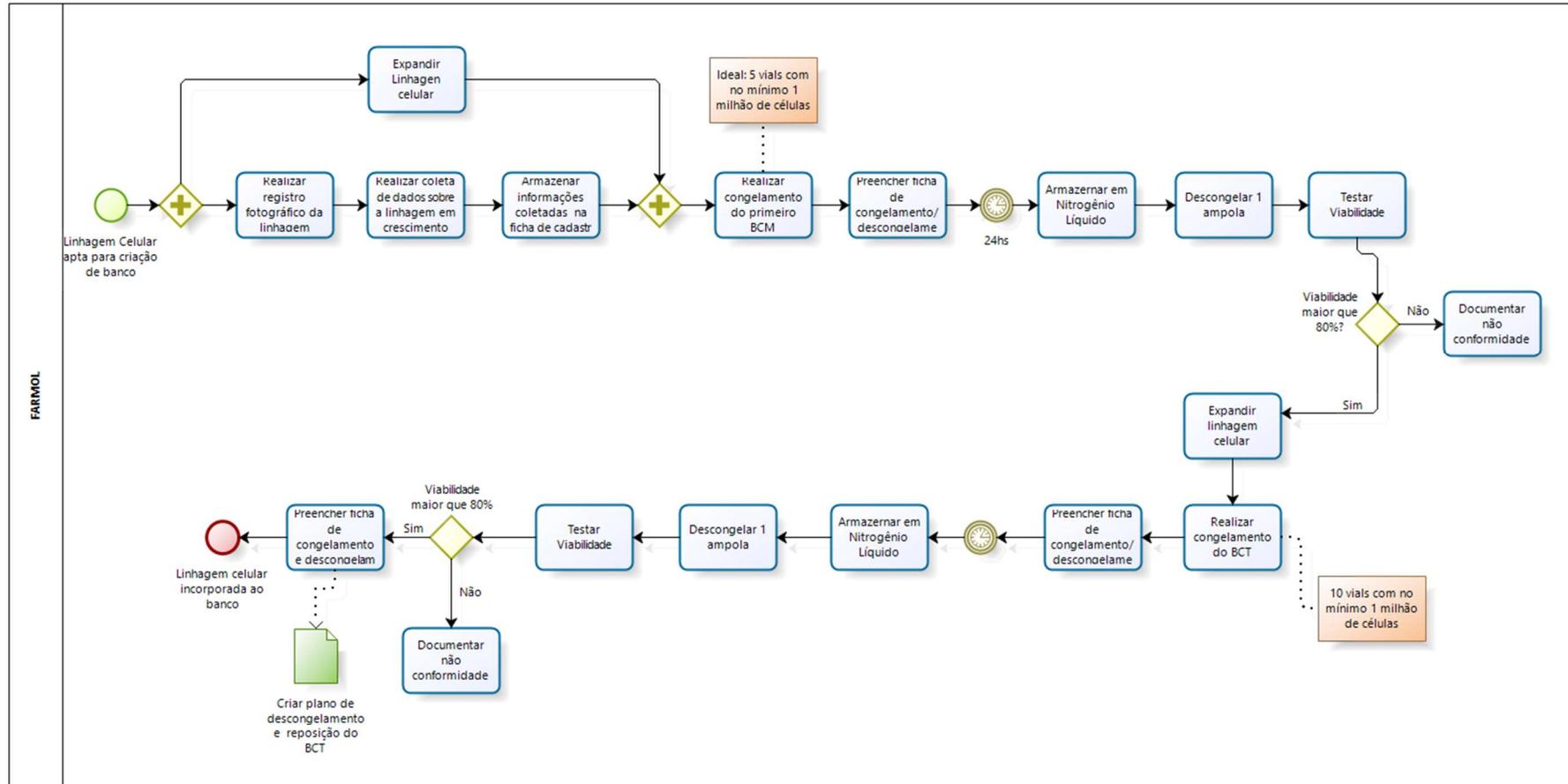
|                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                        |                                          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Data do congelamento                                                                                                                                                                                                                                                            | Data descongelamento                                                                                                                                                                                                                                                 | Número da passagem                                                                                                                                                                                                     | Data da autenticação                     |
| Método de autenticação:<br><input type="checkbox"/> STR – 10 loci<br><input type="checkbox"/> STR – 18 loci<br><input type="checkbox"/> Marcador murino<br><input type="checkbox"/> Cariotipagem<br><input type="checkbox"/> Genotipagem<br><input type="checkbox"/> Isoenzimas | Método complementar de caracterização celular:<br><input type="checkbox"/> Sensibilidade a fármacos<br><input type="checkbox"/> Fotomicrografia<br><input type="checkbox"/> Citometria de fluxo para antígenos específicos<br><input type="checkbox"/> Atividade Pgp | Micoplasma<br><input type="checkbox"/> PCR<br><input type="checkbox"/> Bioluminescência<br><input type="checkbox"/> Microscopia<br>Resultado<br><input type="checkbox"/> Positivo<br><input type="checkbox"/> Negativo |                                          |
| STATUS                                                                                                                                                                                                                                                                          | <input type="checkbox"/> AUTENTICADA                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                        | <input type="checkbox"/> NÃO AUTENTICADA |
| Não conformidades:                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                        |                                          |
| Responsável:                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                      | Data                                                                                                                                                                                                                   |                                          |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                        |                                          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Data do congelamento                                                                                                                                                                                                                                                            | Data descongelamento                                                                                                                                                                                                                                                 | Número da passagem                                                                                                                                                                                                     | Data da autenticação                     |
| Método de autenticação:<br><input type="checkbox"/> STR – 10 loci<br><input type="checkbox"/> STR – 18 loci<br><input type="checkbox"/> Marcador murino<br><input type="checkbox"/> Cariotipagem<br><input type="checkbox"/> Genotipagem<br><input type="checkbox"/> Isoenzimas | Método complementar de caracterização celular:<br><input type="checkbox"/> Sensibilidade a fármacos<br><input type="checkbox"/> Fotomicrografia<br><input type="checkbox"/> Citometria de fluxo para antígenos específicos<br><input type="checkbox"/> Atividade Pgp | Micoplasma<br><input type="checkbox"/> PCR<br><input type="checkbox"/> Bioluminescência<br><input type="checkbox"/> Microscopia<br>Resultado<br><input type="checkbox"/> Positivo<br><input type="checkbox"/> Negativo |                                          |
| STATUS                                                                                                                                                                                                                                                                          | <input type="checkbox"/> AUTENTICADA                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                        | <input type="checkbox"/> NÃO AUTENTICADA |
| Não conformidades:                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                        |                                          |
| Responsável:                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                      | Data                                                                                                                                                                                                                   |                                          |

### APÊNDICE D – Mapa do processo “ENTRADA DE NOVA LINHAGEM CELULAR”



### APÊNDICE E – Mapa do processo “FORMAÇÃO DO BANCO DE CÉLULAS MESTRE E DO BANCO DE CÉLULA DO TRABALHO”



## APÊNDICE F – CHECK LIST PARA CRIAÇÃO DE BANCO DE CÉLULAS DE LINHAGENS CELULARES DE MAMÍFEROS

Com base em documentos legais e normativos nacionais e internacionais, são necessários para a estruturação e funcionamento de um banco de células de mamíferos em um laboratório de estudos não clínicos:

### DIRETRIZES DE FUNCIONAMENTO DO BANCO E BOAS PRÁTICAS DE CULTURA DE CÉLULAS

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | <p>O Banco de células deve ser estruturado em dois estágios:</p> <p><b>Banco mestre</b> – Conjunto de no mínimo 5 ampolas, com pelo menos <math>1 \times 10^6</math> células/ampola.</p> <p><b>Banco de trabalho</b> – Conjunto de no mínimo 10 ampolas, com pelo menos <math>1 \times 10^6</math> células/ampola.</p> |
| 2 | <p>É aconselhável a criação de um “arquivo da linhagem celular” (pelo menos 3 ampolas) para ser estocado em local fisicamente diferente do banco mestre.</p>                                                                                                                                                           |
| 3 | <p>É recomendável conservar as células em temperatura ultra baixa, sendo o nitrogênio líquido o mais utilizado para armazenamento. Apesar da possibilidade de contaminação cruzada, o armazenamento na fase líquida do nitrogênio líquido é a mais utilizada e bem aceita.</p>                                         |
| 4 | <p>O crioprotetor bem aceito e universalmente utilizado, é o DMSO (5 a 10%) em soro bovino fetal.</p>                                                                                                                                                                                                                  |
| 5 | <p>O método de congelamento celular pode ser adaptado de acordo com a disponibilidade de equipamentos para assegurar a taxa de congelamento (decaimento de <math>1^\circ\text{C}/\text{min}</math>).</p>                                                                                                               |
| 6 | <p>Criar para cada linhagem um formulário de acompanhamento de congelamento e descongelamento, para registro do histórico de armazenamento de cada linhagem mantida no Banco de células.</p>                                                                                                                           |

|    |                                                                                                                                                                                                                 |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7  | Faz-se necessário criar um plano de descongelamento e reposição do Banco mestre e do Banco de Trabalho.                                                                                                         |
| 8  | Utilizar na rotina laboratorial, e em toda documentação, o nome oficial de acordo com a notação ICLAC (iclac.org).                                                                                              |
| 9  | É imprescindível buscar informações da linhagem a ser adquirida como: biologia, patologia, meios de cultivo e suplementos, manutenção e criopreservação.                                                        |
| 10 | É recomendável buscar informações sobre erros de identificação, no site da ICLAC (iclac.org) ou cellosaurus (web.expasy.org/cellosaurus) antes da aquisição da linhagem celular.                                |
| 11 | Criar para cada linhagem um formulário de cadastro de linhagem, para registro das características do cultivo da referida linhagem celular.                                                                      |
| 12 | Observar as necessidades nutricionais e funcionais de cada linhagem celular para a determinação do meio de cultura e suplementos a serem utilizados para o melhor crescimento e manutenção do fenótipo celular. |
| 13 | Criar para cada linhagem um formulário de autenticação celular, para registro do histórico de autenticação de cada linhagem mantida no Banco de células.                                                        |
| 14 | Para autenticação celular é recomendada a utilização da metodologia STR combinada ou não com cariotipagem e avaliação de isoenzimas.                                                                            |
| 15 | Para controle de contaminação de micoplasma os métodos de PCR e bioluminescência são recomendados.                                                                                                              |
| 16 | Em caso de recebimento por doação, faz-se necessário manter a célula em quarentena até que os testes de controle microbiológico e autenticação sejam realizados.                                                |

|    |                                                                                                                                                            |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 17 | É recomendada realizar fotomicrografia da linhagem celular em crescimento, após o recebimento, para registro e comparação futura.                          |
| 18 | Somente após a realização e aprovação nos testes microbiológicos e de autenticidade, a célula poderá ser liberada para ser incorporada ao Banco de Células |

### GESTÃO DA QUALIDADE, BIOSSEGURANÇA E AMBIENTE

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | É necessário observar os requisitos de biossegurança para a manipulação das linhagens celulares, com utilização de cabines de segurança biológica, EPI e EPC adequados além de cuidados para o descarte dos resíduos e materiais utilizados.                                                                                                                                         |
| 2 | Definir ou estruturar um sistema de documentação que englobe, dentro de outras questões, o arquivamento de formulários de entrega de linhagem celular, termo de transferência de material biológico e cadastro de linhagem celular além de elaboração, aprovação e distribuição de toda documentação do banco de células.                                                            |
| 3 | É importante elaborar procedimento operacional padrão (POP) para as principais rotinas incluindo, sem prejuízo de outras rotinas, as atividades de congelamento e descongelamento celular, manufatura e suplementação de meio de cultura, limpeza de cabines de segurança biológica e estufas e, finalmente, POP para os testes de autenticação celular e detecção de contaminantes. |
| 4 | Realizar o treinamento da equipe nas atividades supracitadas, seguindo diretrizes do setor da Qualidade de cada Instituto.                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 5 | Faz-se necessário manter registro de uso dos equipamentos e de condições ambientais como atmosfera (CO <sub>2</sub> ) e temperatura da estufa, geladeira e ambiente.                                                                                                                                                                                                                 |
| 6 | É fundamental manter um plano de calibração e manutenção periódica de equipamentos.                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7 | Observar e respeitar o prazo de validade dos insumos para cultura de células (meios de cultura, suplementos e reagentes).                                                                                                                                                                        |
| 8 | Informar o responsável pelo Banco de células, por escrito, sobre qualquer situação adversa ou de não conformidade (resistência a fármacos, alteração de fenótipo, alteração da proliferação) que ocorra nos experimentos realizados com as linhagens celulares fornecidas pelo Banco de células. |