

Certificação de Linhagens Celulares por Análise Molecular

Maria Judite Bittencourt Fernandes
judite@biologico.sp.gov.br
Centro de P&D de Sanidade Animal

Número 205 - 27/05/2014

Os artigos científicos fundamentam-se na autenticidade e ineditismo de dados, isto é, sem fraude e/ou plágio, pautados, assim, na ética em publicação científica. Dessa forma, os periódicos científicos, para o aceite da publicação desses artigos, requisitam dos pesquisadores/autores algumas declarações e/ou informações que embasem esses dados. Para pesquisas que utilizam animais de experimentação, por exemplo, sempre é necessária uma declaração e respectivo número do processo e da aprovação desse trabalho/projeto pelo Comitê de Ética da respectiva instituição. Alguns periódicos exigem a marca e origem dos reagentes químicos utilizados nos trabalhos para indicar a pureza desses reagentes e, conseqüentemente, corroborar os resultados oriundos do seu uso. Entretanto, quase nenhum periódico solicita desses mesmos pesquisadores/autores, quando do uso de linhagens celulares (de origem animal e/ou humana) em seus experimentos, uma autenticação dessas linhagens (certificação de origem de espécie), que indicaria um mesmo controle de qualidade acima citado.

O que significaria essa autenticidade especificamente? Seria a garantia da origem de espécie da linhagem celular citada no trabalho e que embasaria os dados gerados a partir de sua utilização. Assim, a autenticação ou certificação das linhagens celulares evitaria a geração e publicação de dados científicos errôneos, que infelizmente vêm crescendo ultimamente, e que indiretamente podem invalidar ou comprometer os resultados de pesquisa. Esses erros ocorrem, muitas vezes, porque os laboratórios que utilizam rotineiramente diversas linhagens celulares estão sujeitos a riscos de identificação errônea ou contaminação cruzada das mesmas, devido a descuidos e manuseio inapropriado durante o cultivo; mas também se deve pelo aumento no desenvolvimento de linhagens celulares e distribuição para a comunidade científica. Essa contaminação das linhagens celulares identificada desde a década de 50, com a linhagem Hela, só começou a ser considerada como um grave problema de contaminação a partir da década de 70. Atualmente, a literatura científica está repleta de artigos e revisões documentando contaminações cruzadas inter e intraespécies, mas ainda assim não se tem dado o devido valor a esse problema.

Para evitar ou solucionar esse problema, os laboratórios utilitários dessas linhagens celulares devem obter as mesmas de fontes autenticadas e/ou adotarem procedimentos rigorosos de controle de qualidade. Dentro desse último tópico, devem se utilizar de técnicas de detecção dessa contaminação de culturas celulares para autenticação/certificação, de uma forma rotineira e permanente, seja em seus próprios laboratórios ou utilizar-se dos serviços de Banco de células ou de laboratórios capacitados para tal procedimento. Um monitoramento contínuo no controle de qualidade das linhagens celulares feito regularmente por esses laboratórios de pesquisa ou de produção garantirão a geração de dados confiáveis.

O Laboratório de Biologia Celular do Instituto Biológico, vinculado à Secretaria da Agricultura, trabalha com linhagens celulares de longa data e também com a respectiva certificação de linhagens celulares, por meio da identificação de espécies pela análise eletroforética de isoenzimas celulares e está implantando técnicas moleculares para a averiguação da identidade de espécie das linhagens, com apoio de projeto de auxílio à pesquisa (FAPESP-N. 2012/04164-5).

Vários métodos são utilizados para verificação da espécie das linhagens celulares, como cariotipagem e análises imunológica, isoenzimática ou molecular. A análise eletroforética das isoenzimas é o método padrão utilizado pelos principais centros certificadores internacionais, mas a identificação molecular ou genética para a determinação da espécie de origem, que é mais conhecida e utilizada em uso forense, vem sendo aplicada também para a identificação de espécie das linhagens celulares.

Dentre as diversas técnicas moleculares, têm-se aquelas direcionadas para o DNA mitocondrial (mtDNA). A razão da escolha do mtDNA como alvo é porque ele está presente em grande quantidade em todas as células, e sua identificação pode ser feita a partir de uma pequena quantidade de material e com menor risco de degradação em relação ao DNA nuclear. Os dois genes mitocondriais internacionalmente recomendados para identificação de espécie na área forense, quando não há material genético genômico adequado ou apresenta alto grau de degradação, são o gene do citocromo b (*cyt b*) e o gene mitocondrial da subunidade I do citocromo c oxidase (*cox I*). Os estudos referentes à identificação de espécie das linhagens celulares também podem se basear nesses mesmos genes, *cyt b* e *cox I*.

A metodologia inicialmente implantada pelo laboratório de Biologia Celular foi a extração do DNA mitocondrial das linhagens celulares utilizadas no laboratório, por meio de kits comerciais e a amplificação foi feita com o foco nos genes *cox I*.

A Figura 1 apresenta os produtos de PCR dessas linhagens celulares. Cada linhagem teve um fragmento de tamanho diferenciado e compatível com a literatura, que identificou e caracterizou cada uma como sendo de sua espécie de origem. Assim, foi feita a autenticação dessas linhagens por meio de uma metodologia facilmente disponível e reproduzível, além de mais sensível, rápida e conveniente.

Esse monitoramento das linhagens celulares, feito pelo Laboratório de Biologia Celular, para garantir um controle de qualidade dessas linhagens celulares (origem de espécie e isenção de contaminação inter- espécie), favorecerá o Instituto como futuro prestador de serviços e certificação das linhagens celulares para diversos centros mantenedores de linhagens celulares de todo o país, seja em setores científico-tecnológicos farmacêuticos, de produção de vacinas ou insumos biológicos. Também, contribuirá para a conscientização da comunidade científica, que se utiliza das culturas celulares como ferramenta de trabalho, da importância do uso de linhagens celulares seguras e confiáveis, isto é, que elas sejam autenticadas, além de isentas de quaisquer contaminações.

Referências

American Type Culture Collection (ATCC). Cell line verification test recommendations. *ATCC Technical Bulletin* no.8, 2007.

ATCC © SDO Workgroup ASN-0002. Cell line misidentification: the beginning of the end. *Nature Reviews Cancer*, v.10, p.441-448, 2010

Fernandes, M.J.B.; Simoni, I.C. Caracterização de linhagens celulares. I-Identificação de espécies por análise isoenzimática. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.62, p.59-63, 1995.

Markovic, O.; Markovic, N. Cell cross- contamination in cell cultures: the silent and neglected danger. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, v.34, n.1, p.1-8, 1998.

Nelson-Rees, W.A.; Daniels, D.W.; Flandermeyer, R.R. Cross-contamination of cells in culture. *Science*, v.212, p.446-452, 1981.

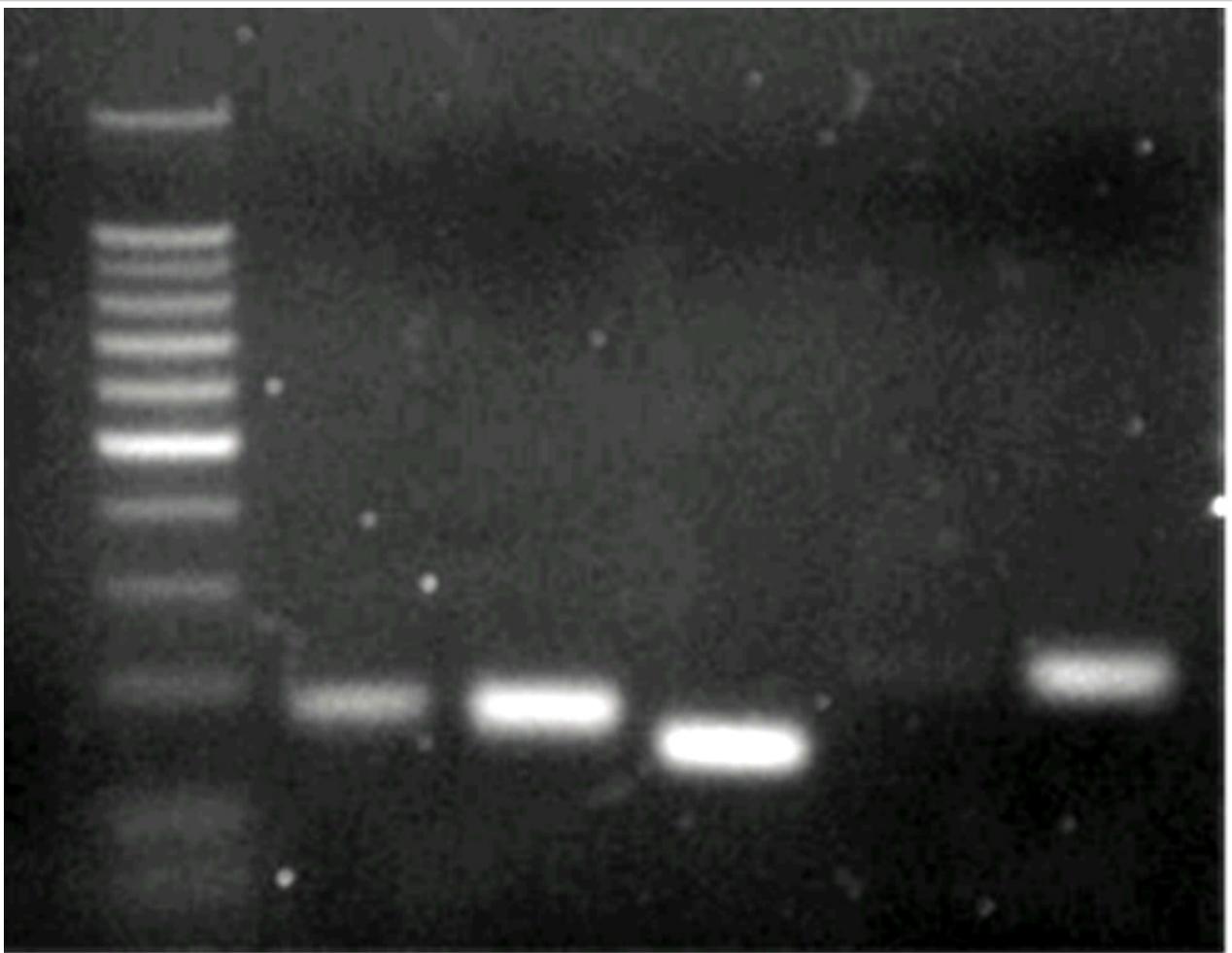


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR das linhagens celulares de rim felino-CRFK (linha 1 e 2); linhagem de rim canino, MDCK (linha 3); de rim de macaco verde, Vero (linha 4).

(uploads/artigos/205/1.jpg)