

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Milena Glória Carvalho

**ESTUDO COMPARATIVO DA CONTAGEM CELULAR DAS LINHAGENS VERO E
L-929 UTILIZANDO OS CORANTES AZUL DE TRIPAN E ERITROSINA B**

Rio de Janeiro

2024

Milena Glória Carvalho

ESTUDO COMPARATIVO DA CONTAGEM CELULAR DAS LINHAGENS VERO E L-929
UTILIZANDO OS CORANTES AZUL DE TRIPAN E ERITROSINA B

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Tutora: Renata Faria de Carvalho

Preceptora: Anna Christina Rosa Guimarães

Rio de Janeiro

2024

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Carvalho, Milena Glória

Estudo comparativo da contagem celular das linhagens Vero e L-929 utilizando os corantes azul de Tripán e Eritrosina B. / Milena Glória Carvalho. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2024.

52 f. : fig.

Monografia (Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2024.

Tutora: Renata Faria de Carvalho

Preceptora: Anna Christina Rosa Guimarães

1. Cultura de Células. 2. Azul Tripano. 3. Eritrosina. I. Título.

Comparative study of cell counts of VERO and L-929 lines using the Dyes Trypan blue and Erythrosine B

Milena Glória Carvalho

ESTUDO COMPARATIVO DA CONTAGEM CELULAR DAS LINHAGENS VERO E L-929
UTILIZANDO OS CORANTES AZUL DE TRIPAN E ERITROSINA B

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em: 06 / 02 / 2024.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Fausto Klabund Ferraris

Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Wlamir Corrêa de Moura

Fundação Oswaldo Cruz

Msc. Antônio Alves Pereira Júnior

Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Renata Faria de Carvalho – (Tutora)

Fundação Oswaldo Cruz

MSc Anna Christina Rosa Guimarães – (Preceptora)

Fundação Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho a minha mãe, que sempre esteve ao meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis, que sempre me apoiou e guiou quando achei que não havia mais alternativas.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Leila Carvalho, por sempre acreditar em mim e me apoiar nos momentos mais difíceis.

A minha irmã, Michelle Natalie Carvalho, por sempre me fazer rir nos momentos mais complicados da minha jornada.

Ao meu namorado, Renan Rodrigues Ribeiro, por ter ficado ao meu lado nos fins de semana, enquanto eu escrevia esse trabalho, sempre me apoiando e incentivando a continuar dizendo que o esforço valeria a pena.

A minha tutora, Renata Faria de Carvalho, que me recebeu de braços abertos no laboratório e me ajudou na adaptação.

A minha preceptora, Anna Christina Rosa Guimarães, que me ensinou tudo sobre cultura de células, e possibilitou que esse trabalho fosse desenvolvido.

A equipe do Laboratório de Vacinas Virais, Biofármacos e Cultura de Células: Katarine, Caique, Sophia, Karen, Jessica, Thais e Lucas, que me acompanharam e me acolheram no laboratório durante a residência.

Ao Professor Sérgio Silva, por ter me auxiliado em toda a parte estatística do trabalho, sem ele não teria conseguido.

“Eu acredito muito na sorte, e descobri que, quanto mais eu trabalho, mais sorte eu tenho.”

- Thomas Jefferson

RESUMO

Atualmente, são complexas as ações que envolvem as práticas de Vigilância Sanitária, necessitando de políticas públicas estabelecidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) de promoção, prevenção e proteção da saúde. O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) tem como objetivo contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, além de atuar como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços no âmbito da Vigilância Sanitária. O Setor de Cultura de Células (SCC) do INCQS participa dos processos de manutenção e fornecimento do acervo de linhagens celulares animais. Essas linhagens são amplamente empregados no controle da qualidade de cosméticos e imunobiológicos, em isolamento e pesquisa de vírus, bem como em métodos alternativos em substituição ao uso de animais. Logo é fundamental avaliar a conformidade de todo material biológico utilizado. A contagem de células viáveis de células eucarióticas é o primeiro passo na manutenção e expansão de culturas celulares *in vitro*, sendo importante para o monitoramento rotineiro da saúde celular e da taxa de proliferação, e para a semeadura de células para uso em experimentos subsequentes. Existem vários corantes utilizados na contagem das células, o mais usado é o Azul de Tripán, porém já foi constatado que apresenta efeito teratogênico. A Eritrosina B é utilizada principalmente como corante alimentar, porém já foi demonstrado que pode servir como meio alternativo para a contagem de células. Como a biossegurança no INCQS é uma preocupação crescente, o uso da Eritrosina B é uma opção para diminuir o uso do Azul de Tripán. O objetivo do trabalho é realizar um estudo comparativo com o corante Azul de Tripán e a Eritrosina B por meio das contagens das linhagens celulares VERO e L-929 em câmara de Neubauer. Foi realizado o cultivo celular das linhagens VERO segundo o POP 65.3430.031 e NCTC 929 segundo o PU.3430.055. A contagem e a verificação da viabilidade das células foram feitas utilizando os corantes Azul de Tripán e a Eritrosina B seguindo o PU.3430.053. A análise estatística foi realizada para avaliar a normalidade dos resultados e constatando a não normalidade, foi aplicado um teste não paramétrico. A partir da análise estatística, constatamos que o teste de equivalência referente a comparação das médias das concentrações da célula VERO e L-929 com os dois corantes não detectou diferenças estatísticas significativas. Porém, a comparação das médias das viabilidades da célula VERO e L-929 com os dois corantes houve diferença estatística significativa. Apesar de a Eritrosina B não ser estatisticamente similar ao Azul de Tripán, pode vir

a ser utilizado como corante de cultura celular, desde que seja estabelecido um método confiável para que se obtenha um resultado fidedigno de concentração e viabilidade.

Palavras-chaves: Cultura de Células. Eritrosina B. Azul de Tripan.

ABSTRACT

Currently, actions involving Health Surveillance practices are complex, requiring public policies established by the Unified Health System (SUS) for health promotion, prevention and protection. The National Institute for Health Quality Control (INCQS) aims to contribute to the promotion and recovery of health and disease prevention, in addition to acting as a national reference for scientific and technological issues relating to quality control of products, environments and services within the scope of Health Surveillance. The INCQS Cell Culture Sector (SCC) participates in the maintenance and supply processes of the collection of animal cell lines. These strains are widely used in the quality control of cosmetics and immunobiologicals, in virus isolation and research, as well as in alternative methods to replace the use of animals. Therefore, it is essential to evaluate the conformity of all biological material used. Counting viable cells of eukaryotic cells is the first step in maintaining and expanding in vitro cell cultures and is important for routine monitoring of cellular health and proliferation rate, and for seeding cells for use in subsequent experiments. There are several dyes used in cell counting, the most used is Trypan Blue, but it has been found to have a teratogenic effect. Erythrosine B is mainly used as a food coloring, but it has been shown that it can serve as an alternative means for cell counting. As biosafety at INCQS is a growing concern, the use of Erythrosin B is an option to reduce the use of Trypan Blue. The objective of the work is to carry out a comparative study with the dye Trypan Blue and Erythrosin B by counting VERO and L-929 cell lines in a Neubauer chamber. Cell culture of VERO lines was carried out as described in POP 65.3430.031 and NCTC 929 as described in PU.3430.055. The counting and verification of cell viability were carried out using the dyes Trypan Blue and Erythrosin B following PU.3430.053. Statistical analysis was performed to evaluate the fit of data to the normal distribution and, upon confirming non-normality, a non-parametric test was applied. From the statistical analysis, we found that the equivalence test referring to the comparison of the mean concentrations of the VERO and L-929 cells with the two dyes no statistically significant differences. However, the comparison of the mean viability of VERO and L-929 cells with the two dyes demonstrated statistically significant differences. Although Erythrosin B is not statistically similar to Trypan Blue, it can be used as a cell culture dye, as long as a reliable method is established to obtain a reliable concentration and viability result.

Keywords: Cell Culture. Erythrosine B. Tripan Blue.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Célula VERO.....	19
Figura 2 - Célula L-929.....	20
Figura 3 - Representação da Câmara de Neubauer.....	22
Figura 4 - Quadrante da Câmara de Neubauer com células VERO coradas com Azul de Tripan...23	
Figura 5 - Quadrante da Câmara de Neubauer com células VERO coradas com Eritrosina B.....23	
Figura 6 - Estrutura Química do corante Azul de Tripan.....	24
Figura 7 - Estrutura Química do corante Eritrosina B.....	24
Figura 8 - <i>Boxplot</i> da concentração da célula VERO comparando o corante Azul de Tripan e a Eritrosina B.....	29
Figura 9 - Histogramas da concentração da célula VERO corada com o corante Azul de Tripan e com a Eritrosina B.....	30
Figura 10 - <i>Boxplot</i> da viabilidade da célula VERO comparando o corante Azul de Tripan e a Eritrosina B.....	33
Figura 11 - Histogramas da viabilidade da célula VERO corada com o corante Azul de Tripan e com a Eritrosina B.....	34
Figura 12 - <i>Boxplot</i> da concentração da célula L-929 comparando o corante Azul de Tripan e a Eritrosina B.....	36
Figura 13 - Histogramas da concentração da célula L-929 corada com o corante Azul de Tripan e com a Eritrosina B.....	37
Figura 14 - <i>Boxplot</i> da viabilidade da célula L-929 comparando o corante Azul de Tripan e a Eritrosina B.....	40
Figura 15 - Histogramas da viabilidade da célula L-929 corada com o corante Azul de Tripan e com a Eritrosina B.....	41
Figura 16 - Quadrante da Câmara de Neubauer com células L-929 coradas com Azul de Tripan..45	
Figura 17 - Quadrante da Câmara de Neubauer com células L-929 coradas com Eritrosina B.....45	

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk referente a concentração da célula VERO entre os corantes Azul de Tripan e Eritrosina B.....	31
Quadro 2 - Teste de Equivalência Mann-Whitney-Wilcoxon referente a concentração da célula VERO entre os corantes Azul de Tripan e Eritrosina B.....	32
Quadro 3 - Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk referente a viabilidade da célula VERO entre os corantes Azul de Tripan e Eritrosina B.....	35
Quadro 4 - Teste de Equivalência Mann-Whitney-Wilcoxon referente a viabilidade da célula VERO entre os corantes Azul de Tripan e Eritrosina B.....	35
Quadro 5 - Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk referente a concentração da célula L-929 entre os corantes Azul de Tripan e Eritrosina B.....	38
Quadro 6 - Teste de Equivalência Mann-Whitney-Wilcoxon referente a concentração da célula L-929 entre os corantes Azul de Tripan e Eritrosina B.....	39
Quadro 7 - Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk referente a viabilidade da célula L-929 entre os corantes Azul de Tripan e Eritrosina B.....	42
Quadro 8 - Teste de Equivalência Mann-Whitney-Wilcoxon referente a viabilidade da célula L-929 entre os corantes Azul de Tripan e Eritrosina B.....	42

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BHK-21	Célula de rim de hamster (do inglês: <i>kidney fibroblast cells extracted from an hamster</i>)
DFT	Departamento de Farmacologia e Toxicologia
DI	Departamento de Imunologia
DM	Departamento de Microbiologia
DQ	Departamento de Química
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ECACC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>
HEK-293	Célula de rim humano (do inglês: <i>kidney epithelial cells extracted from an human</i>)
HEP-2C	Célula de carcinoma humano (do inglês: <i>Human cervix carcinoma</i>)
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LACENS	Laboratórios de Saúde Pública
LCCDMA	Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos
L-929	Célula de tecido conjuntivo de rato (do inglês: <i>Subcutaneous connective tissue from a mouse</i>)
MA-104	Célula de rim de macaco (do Inglês: <i>kidney epithelial cells extracted from a monkey</i>)
MRC-5	Célula de pulmão humano (do inglês: <i>lung fibroblast cells extracted from a human</i>)
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato (do inglês: <i>phosphate buffered saline</i>)
PNI	Programa Nacional de Imunização
POP	Procedimento Operacional Padrão
PU	Procedimento de Uso
RK-13	Célula de rim de coelho (do Inglês: <i>kidney epithelial cells extracted from a rabbit</i>)
SCC	Setor de Cultura de Células
SFB	Soro Fetal Bovino

U937 Célula de derrame pleural (do inglês: *pleural effusion cells*)

VERO Célula de rim de macaco verde Africano (do Inglês: *kidney epithelial cells extracted from an African green monkey*)

VISAS Vigilâncias Sanitárias Estaduais e Municipais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Vigilância Sanitária.....	15
1.2	Agência Nacional de Vigilância Sanitária.....	15
1.3	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.....	16
1.3.1	Departamento de Imunologia.....	16
1.3.1.1	<i>Setor de Cultura de Células.....</i>	17
1.3.1.1.1	<i>Célula VERO.....</i>	18
1.3.1.1.2	<i>Célula L-929.....</i>	19
1.4	Importância do uso de cultura de células.....	20
1.5	Contagem Celular.....	21
1.5.1	Corantes utilizados na contagem celular.....	22
1.6	Justificativa.....	25
2	OBJETIVOS.....	26
2.1	Objetivo Geral.....	26
2.2	Objetivos específicos.....	26
3	METODOLOGIA.....	27
3.1	Cultivo Celular.....	27
3.2	Contagem celular.....	27
3.3	Avaliação Estatística.....	28
4	RESULTADOS.....	29
4.1	Análise Estatística da Concentração da Célula VERO.....	29
4.1.1	<i>Boxplot da Concentração da Célula VERO.....</i>	29
4.1.2	<i>Histogramas da Concentração da Célula VERO.....</i>	30
4.1.3	<i>Teste de Hipótese de Equivalência.....</i>	31
4.2	Análise Estatística da Viabilidade da Célula VERO.....	32
4.2.1	<i>Boxplot da Viabilidade da Célula VERO.....</i>	32
4.2.2	<i>Histogramas da Viabilidade da Célula VERO.....</i>	33
4.2.3	<i>Teste de Hipótese de Equivalência.....</i>	34
4.3	Análise Estatística da Concentração da Célula L-929.....	36

4.3.1	<i>Boxplot</i> da Concentração da Célula L-929.....	36
4.3.2	Histogramas da Concentração da Célula L-929.....	37
4.3.3	Teste de Hipótese de Equivalência.....	38
4.4	Análise Estatística da Viabilidade da Célula L-929	39
4.4.1	<i>Boxplot</i> da Viabilidade da Célula L-929.....	39
4.4.2	Histogramas da Viabilidade da Célula L-929.....	40
4.4.3	Teste de Hipótese de Equivalência.....	41
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48
	ANEXO	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vigilância Sanitária

Ao longo do tempo, muitos são os avanços na área da saúde pública, e a vigilância sanitária tem se mostrado um campo interdisciplinar de saberes e atua na promoção e proteção da saúde pública (Costa, 2000).

Com a implementação da Lei Orgânica da Saúde n.º 8.080 de 19 de setembro de 1990, no §1º, inciso XI, artigo 6º a vigilância sanitária é definida como:

Um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir, ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse à saúde.

Esta definição introduz o conceito de risco e confere um caráter mais completo ao conjunto das ações, da produção e da prestação de serviços relacionados aos interesses à saúde (Brasil, 1990).

1.2 Agência Nacional de Vigilância Sanitária

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), criada pela Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, regula a produção e comercialização de medicamentos, alimentos, cosméticos, saneantes, derivados do tabaco, produtos e equipamentos médicos, reagentes para diagnóstico, agrotóxicos, sangue e seus derivados, órgãos e tecidos humanos para transplante, incluindo os ambientes, insumos, processos e tecnologias relacionados a esses produtos. Assim como, controla os serviços de saúde, laboratórios de saúde pública e portos, aeroportos e fronteiras, e coordena o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 1999; Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2007).

A regulação da Anvisa é de responsabilidade da União, dos Estados e dos Municípios, além disso, tem importância fundamental para a estruturação do Sistema Único de Saúde. Sua política de desenvolvimento é indicada como instrumento para elevar os investimentos das empresas em inovação e para atrair a produção e centros de pesquisa e desenvolvimento de empresas estrangeiras (Alves; Peci, 2011). A agência atua em estreita relação com o Instituto Nacional de Controle de

Qualidade em Saúde (INCQS), com os laboratórios de saúde pública (LACENS) e as Vigilâncias Sanitárias estaduais e municipais (VISAS).

1.3 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Em 1981, o Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos (LCCDMA) foi transferido para a Fundação Oswaldo Cruz e recebeu um novo nome, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), que se estruturou em divisões especializadas nas áreas administrativas, análises de alimentos, de medicamentos, de cosméticos e de saneantes, com o intuito de promover a saúde e prevenir doenças, atuando como referência no controle de qualidade (Costa *et. al.*, 2000).

O INCQS é responsável pelo controle de qualidade de qualquer produto, substância, processo ou serviço que esteja direta ou indiretamente relacionado à saúde, como: alimentos; medicamentos; produtos biológicos – vacinas, hemoderivados, cultura de células; produtos médico-hospitalares, odontológicos e laboratoriais; saneantes; produtos de higiene, perfumes e cosméticos (Silva *et. al.*, 2018). O Instituto está distribuído em quatro departamentos técnicos, de acordo com a área de conhecimento: Farmacologia e Toxicologia (DFT), Imunologia (DI), Microbiologia (DM) e Química (DQ).

1.3.1 Departamento de Imunologia

O controle da qualidade refere-se às ações relacionadas com a verificação da qualidade de um produto ou serviço, com a finalidade de avaliar se os requisitos básicos estão sendo respeitados (Brasil, 2023).

No Brasil, o INCQS é responsável oficialmente pela liberação de lotes dos imunobiológicos como soros, vacinas e biofármacos, sendo o Departamento de Imunologia (DI) responsável pelas análises documentais e laboratoriais da maior parte destes produtos. Os soros são utilizados na terapia de infecções (causadores de infecções como o botulismo, a raiva, o tétano ou a difteria) ou acidentes com animais peçonhentos (tais como escorpiões, serpentes ou aranhas). As vacinas têm função preventiva no combate às doenças como a poliomielite, a febre amarela, o sarampo, a

rubéola, a covid-19, a dengue entre outras. E os biofármacos possuem função terapêutica (utilizados no enfrentamento de doenças renais e da hepatite C) (INCQS, 2023).

A maiorias dessas demandas são feitas pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI) ou pela Anvisa. No caso dos soros e das vacinas, o PNI, do Ministério da Saúde (MS), faz a solicitação oficial de análise (Brasil, 2008).

A fiscalização dos imunobiológicos utiliza a consistência de produção, onde é feita a análise dos lotes comparando com os lotes utilizados no estudo clínico, por meio de análises documentais e laboratoriais, de acordo com critérios padronizados estabelecidos pela OMS e órgãos reguladores (Brasil, 2008).

1.3.1.1 *Setor de Cultura de Células*

O Setor de Cultura de Células (SCC) do DI possui em seu acervo, dezenas de linhagens celulares animais, inclusive humanas oriundas de Bancos Celulares oficiais, como a ATCC (*American Type Culture Collection*), Coleção Europeia de Culturas de Células Autenticadas (*European Collection of Authenticated Cell Cultures* – ECACC, em inglês) e BCRJ (Banco de Células do Rio de Janeiro), com cada linhagem certificada e autenticada.

Dentre essas linhagens, o setor possui a BHK-21 (célula de rim de hamster) utilizada para determinação da potência *in vitro* para soro antirrábico, HEK-293 (célula de rim humano) utilizada na infectividade da vacina contra covid-19, Hep-2c (célula de carcinoma humano) utilizada na determinação da potência e termoestabilidade de vacinas contra Poliomielite, L-929 (célula de tecido conjuntivo de camundongo) utilizada para determinar a citotoxicidade *in vitro* pelo método de difusão em ágar, MA-104 (célula de rim de macaco) utilizada na determinação da potência e termoestabilidade de vacinas contra Rotavírus, MRC-5 (célula de pulmão humano) na determinação da potência e termoestabilidade de vacinas contra Varicela e Tetra Viral, RK-13 (célula de rim de coelho) utilizada na determinação da potência e termoestabilidade do componente rubéola de vacinas contra Tríplice e Tetra Viral e VERO (célula de rim de macaco verde africano) utilizada na determinação da potência e termoestabilidade de vacinas contra Tríplice Viral; vacinas contra Dengue e Febre Amarela. No ano de 2023, as linhagens mais utilizadas no setor foram a VERO e a L929.

Além disso, o setor tem um conjunto de protocolos e procedimentos padronizados bem estabelecidos para o cultivo de células, manutenção da esterilidade, controle da qualidade dos processos de cultivo e fornecimento do acervo de linhagens celulares de animais, apropriados para fins analíticos, que estão em constante desenvolvimento e atualização por seu corpo técnico especializado, assim como, segue as diretrizes da ISO/IEC 17.025, que garante que todos os equipamentos estão devidamente calibrados. Logo, enquadra-se como um laboratório apropriado para o cultivo de células para fins analíticos, com grande expertise no manejo de linhagens celulares.

1.3.1.1.1 Célula VERO

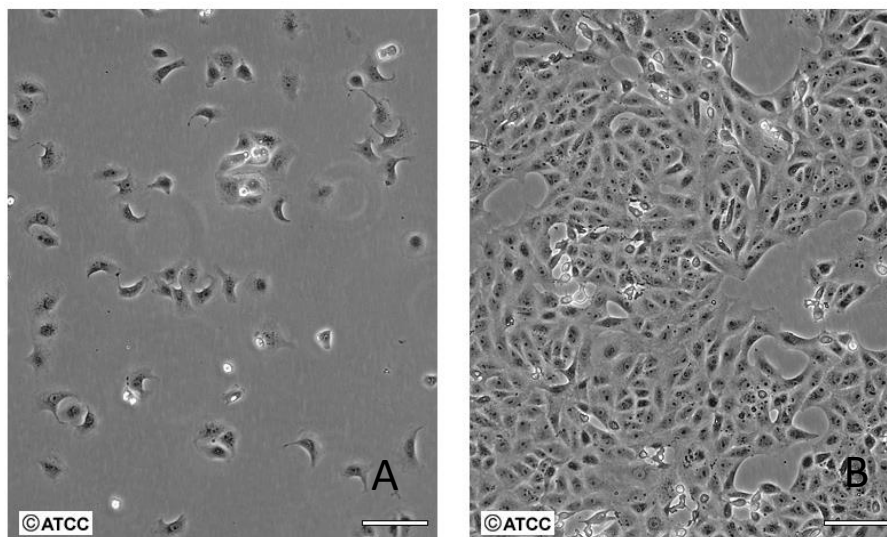
A célula VERO é uma das linhagens mais utilizadas como importante ferramenta da ciência e da indústria farmacêutica na produção de diversos produtos biológicos (Osada *et al.*, 2014). Essa linhagem foi estabelecida em 1962, a partir da cultura de tecido de rins de macaco verde africano (*Chlorocebus aethiops*), na Universidade de Chiba no Japão, (ATCC, 2023).

O uso dessa linhagem está ligado à sua capacidade de interação com uma grande variedade de vírus que estão relacionados com a saúde pública, como sarampo, rubéola, arboviroses, caxumba e adenovírus (Carvalho *et al.*, 2021; ATCC, 2023). Isso se deve a uma deleção dos genes de transcrição de interferon do tipo 1 em resposta às infecções virais (Desmyter; Melnick; Rawls, 1968; Osada *et al.*, 2014).

Notavelmente, a linhagem celular VERO foi a primeira linhagem celular contínua a ser aprovada pela OMS para a fabricação de vacinas virais para uso humano sob diretrizes regulatórias específicas (WHO, 1987a; WHO, 1987b).

Após o estabelecimento e distribuição global dessa linhagem para os mais diversos bancos de células do mundo, suas aplicações tornaram-se extensas, sendo utilizadas em laboratórios de virologia, assim como para produção e testagem de vacinas contra vários agentes etiológicos (Monath *et al.*, 2004).

Figura 1 - Célula VERO



Legenda: A Figura 1 mostra a célula VERO, em que A representa a célula com baixa densidade, ainda em crescimento, e B representa a célula com alta densidade, já com um maior nível de crescimento.

Nota: Escala 100µm.

Fonte: ATCC (2023).

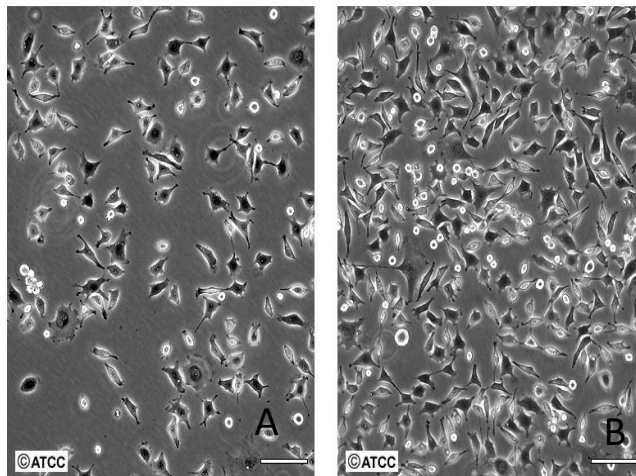
1.3.1.1.2 Célula L-929

A célula L-929 é uma cepa L parental derivada de tecido aureolar e adiposo subcutâneo normal de um camundongo C3H/An macho com 100 dias de idade. O clone da cepa L (Clone NCTC 929) foi derivado em março de 1948 (ATCC, 2023).

A cepa L foi uma das primeiras cepas celulares a ser estabelecida em cultura contínua, e o clone 929 foi a primeira cepa clonada desenvolvida. O clone 929 foi estabelecido (pela técnica capilar para isolamento de célula única) a partir da 95ª geração de subcultura da cepa parental (ATCC, 2023).

Esta linhagem celular é mais comumente usada para testes de citotoxicidade (Santos *et. al*, 2010).

Figura 2 - Célula L-929



Legenda: A Figura 2 mostra a célula L-929, em que A representa a célula com baixa densidade, ainda em crescimento, e B representa a célula com alta densidade, já com um maior nível de crescimento.

Nota: Escala 100µm.

Fonte: ATCC (2023).

1.4 Importância do uso de cultura de células

O cultivo de células se iniciou no século XX com Harrison, em 1907, e Carrel, em 1912. Essa técnica foi desenvolvida como um método para estudar o comportamento de células animais fora do organismo, em um meio ambiente controlado (Alves; Guimarães, 2010).

A técnica de cultura celular é caracterizada pela manutenção de células vivas em laboratório, organizadas e acopladas em recipientes estéreis, permitindo assim a extensão da técnica de cultura em tecido (Migita, 2012).

A possibilidade de se cultivar células e/ou tecidos em laboratório tornou-se um recurso valioso com grande destaque e eficiência tanto para a pesquisa biomédica como para a área de biotecnologia industrial, pois tendem a fornecer respostas simplificadas para investigações biomédicas e científicas mais complexas, uma vez que são modelos biológicos mais simples e de fácil manutenção quando comparados a animais de experimentação (Migita, 2012).

Diversas são as aplicações para a técnica de cultivo, na área da pesquisa básica, as células podem ser empregadas em estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares; na área da virologia, são muito usadas para a obtenção viral e para fins de diagnóstico de doenças; e na área da

biotecnologia, são utilizadas na produção de imunobiológicos, tais como vacinas e anticorpos monoclonais (Freshney, 2006; Migita, 2012).

O emprego de culturas celulares em ensaios biológicos requer condições específicas, apropriadas, com critérios definidos, reprodutíveis e padronizados, a fim de garantir perfeitas condições e adequabilidade para o determinado ensaio a que se propõe realizar (Alves; Guimarães, 2010).

Dessa forma, é fundamental que o laboratório tenha conhecimento prévio e aprofundado das linhagens celulares que utiliza, tenha protocolos e procedimentos padrões de cultivo que atendam às necessidades de cada ensaio específico de cada célula e, por fim, disponha de corpo técnico especializado.

1.5 Contagem Celular

A contagem de células viáveis eucarióticas é o primeiro passo na manutenção e expansão de culturas celulares *in vitro*, sendo importante para o monitoramento rotineiro da saúde celular e da taxa de proliferação, e para a semeadura de células para uso em experimentos subsequentes (Johnston, 2018; Kim *et al.*, 2016).

Existem duas maneiras de se quantificar células em cultura, o método direto e o indireto. Na forma direta, conta-se diretamente o número de células presente na garrafa de cultivo, utilizando uma câmara; e a forma indireta é feita por meio da quantificação de determinadas estruturas celulares, como proteínas, ou pela medição do metabolismo celular (Alves; Guimarães, 2010).

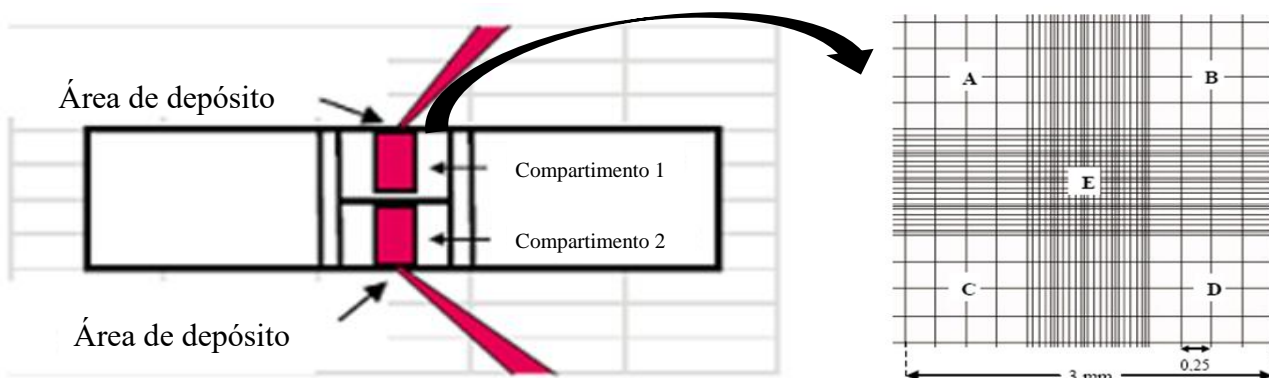
A forma direta, é a mais comum de determinar a concentração e a viabilidade celular, a técnica consiste em usar um hemocitômetro, como a Câmara de Neubauer para contar manualmente as células coradas com um corante vital sob observação microscópica, pois apresenta baixo custo e maior versatilidade (Cadena-Herrera *et al.*, 2015; Johnston, 2018).

Inicialmente desenvolvida para determinação da concentração de células sanguíneas, o hemocitômetro determina o número de células presentes em um volume específico de solução. Possui várias aplicações nas ciências biológicas, sendo utilizada na microbiologia, na contagem de espermatozoides e na urinálise (Silva *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2003; Kliernan, 1962).

As câmaras de contagem consistem em uma lâmina retangular de vidro para microscopia com profundidade específica para acomodar a amostra biológica. Composta por duas câmaras

independentes (superior e inferior) divididas em quadrantes padronizados milimetricamente. Assim é possível visualizar ao microscópio e realizar a contagem determinando o número de células presentes na área do quadrante (Figura 3).

Figura 3 - Representação da Câmara de Neubauer



Legenda: A Figura 3 representa a Câmara de Neubauer utilizada na contagem manual. A área de depósito é a região que se coloca a amostra com o corante, ela é dividida em quadrantes: A, B, C, D e E. Somente as células presentes nos quadrantes A, B, C e D serão contadas.

Fonte: Adaptado de INCQS (2022).

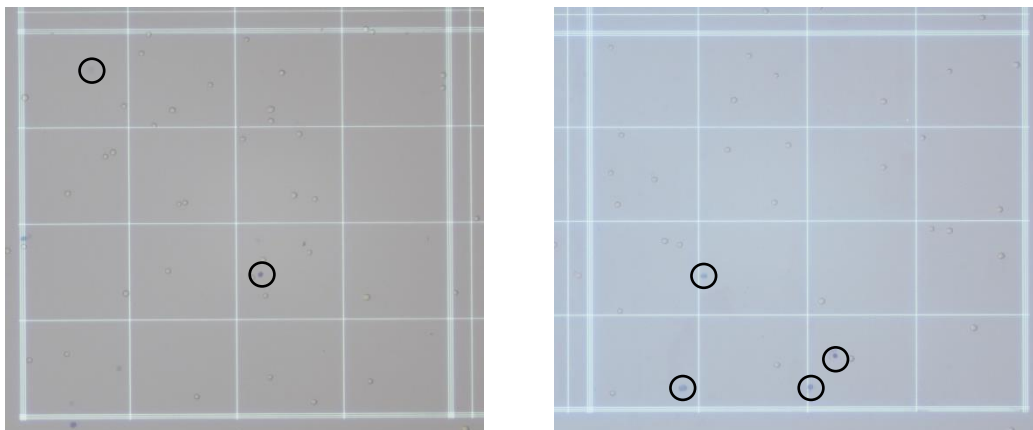
O teste de exclusão de corante é usado para determinar o número de células viáveis e sua concentração em uma suspensão celular. O princípio baseia-se na introdução de corantes, como o Azul de Tripan, ou a Eosina em células mortas, que não possuem a sua membrana celular intacta. Então, uma suspensão de células é misturada com corante e depois examinada visualmente para determinar se as células absorvem ou não o corante (Kim *et al.*, 2016).

No Procedimento de Uso estabelecido pelo Setor de Cultura de Células (P.U 3430.053), a suspensão celular é misturada com o corante Azul de Tripan e realizada visualização ao microscópio óptico invertido, onde as células viáveis terão um citoplasma claro, enquanto as células inviáveis terão um citoplasma azul.

1.5.1 Corantes utilizados na contagem celular

Existem vários corantes utilizados na contagem de culturas celulares, porém, o mais utilizado é o Azul de Tripan tanto na contagem manual, quanto na contagem utilizando contadores automáticos (Johnston, 2018; Cadena-Herrera *et al.*, 2015).

Figura 4 - Quadrante da Câmara de Neubauer com células VERO coradas com Azul de Tripán



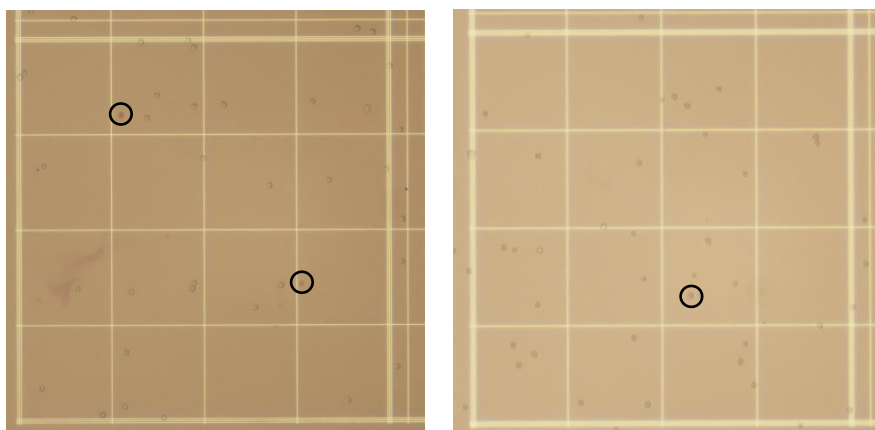
Legenda: A Figura 4 mostra dois quadrantes da câmara de Neubauer com células VERO coradas com o corante Azul de Tripán, marcadas com o círculo preto.

Fonte: A autora.

Desde 1948, sabe-se que o corante Azul de Tripán é extremamente teratogênico (Turbow, 1965). Estudos mostram que este corante acarreta má formação e deformidades devido à distúrbios de desenvolvimento, assim como, deficiências de vitamina A (Turbow, 1965).

A Eritrosina B é comumente utilizada como corante alimentar (Marmio, 1979). Porém, estudos mostram a utilização da Eritrosina B como substituto do Azul de Tripán na contagem celular como forma de prevenção contra as ações teratogênicas do azul de Tripán (Kim *et al.*, 2016, Krause *et al.*, 1984).

Figura 5 - Quadrante da Câmara de Neubauer com células VERO coradas com Eritrosina B

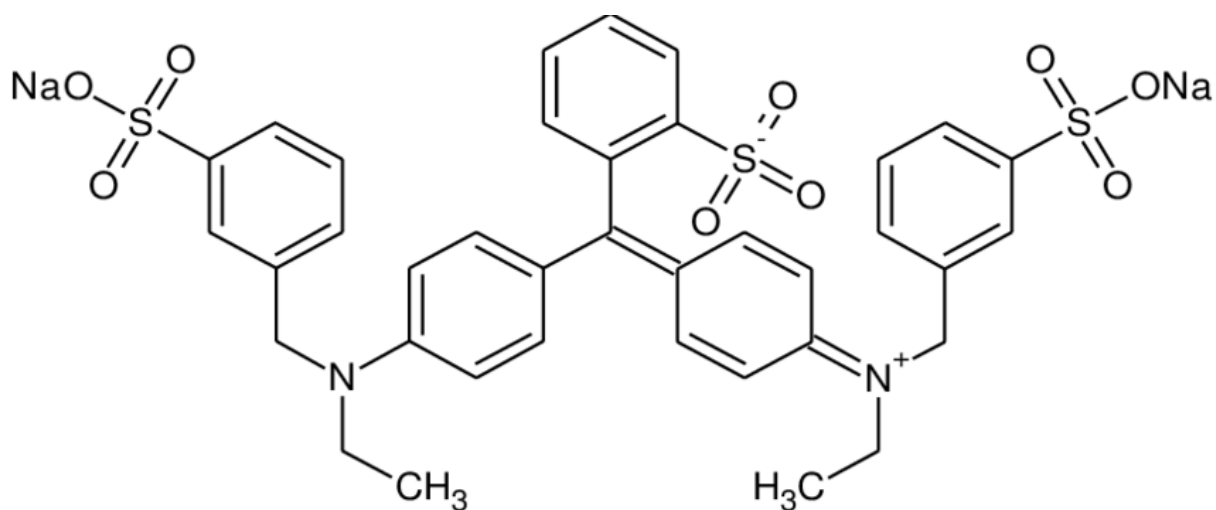


Legenda: A Figura 5 mostra dois quadrantes da câmara de Neubauer com células VERO coradas com o corante Eritrosina B, marcadas com o círculo preto.

Fonte: A autora.

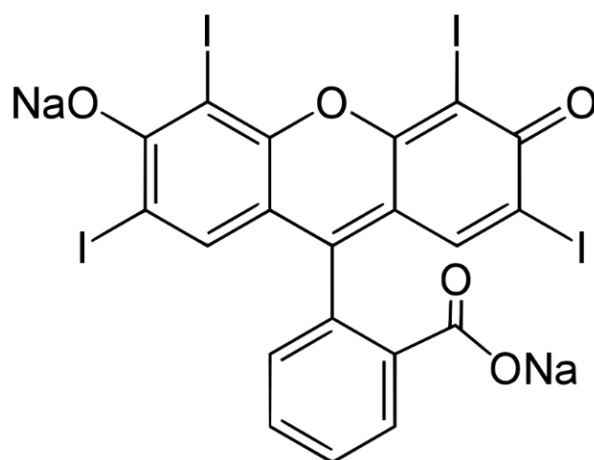
Ambos os corantes são carregados negativamente em pH neutro, o que impede o cruzamento das bicamadas lipídicas, por isso é considerado impermeável à membrana celular. Os corantes são usados para corar seletivamente células "mortas" ou danificadas em culturas de células aderentes: os corantes entram preferencialmente nas células que perderam a integridade da membrana e coram as proteínas citoplasmáticas, tornando essas células azuis intensas (Azul de Tripán) ou rosa (Eritrosina B) (Koksharov, 2022).

Figura 6 - Estrutura Química do corante Azul de Tripán



Legenda: A Figura 4 representa a estrutura química do corante Azul de Tripán.
Fonte: Sá (2020).

Figura 7 - Estrutura Química do corante Eritrosina B



Legenda: A Figura 4 representa a estrutura química do corante Eritrosina B.
Fonte: Sá (2020).

1.6 Justificativa

O Setor de Cultura de Células do Departamento de Imunologia do INCQS é responsável pela manutenção e fornecimento do acervo de linhagens celulares animais e humanas. Essas linhagens são amplamente empregados no controle da qualidade de cosméticos e imunobiológicos, em isolamento e pesquisa de vírus, bem como em métodos alternativos em substituição ao uso de animais (INCQS, 2023). Dentre as diversas aplicabilidades da técnica de cultura de células está a possibilidade de realização de ensaios de potência e citotoxicidade de vacinas utilizando esses substratos biológicos (Migita, 2012).

Logo, é fundamental avaliar a conformidade de todo material biológico utilizado. A contagem de células viáveis de células eucarióticas é o primeiro passo na manutenção e expansão de culturas celulares *in vitro*, sendo importante para o monitoramento rotineiro da saúde celular e da taxa de proliferação, e para a semeadura de células para uso em experimentos subsequentes (Johnston, 2018; Kim *et al.*, 2016).

Existem vários corantes utilizados na contagem das células, o mais usado é o Azul de Tripán, porém já foi constatado que apresenta efeito teratogênico (Kim *et al.*, 2016; Turbow, 1965). A Eritrosina B é utilizada principalmente como corante alimentar, porém já foi demonstrado que pode servir como meio alternativo para a contagem de células (Krause *et al.*, 1984; Kim *et al.*, 2016).

Em conformidade com as Normas de Biossegurança presente no INCQS, há uma crescente preocupação em mitigar o risco do uso de reagentes tóxicos e reduzir a geração de resíduos químicos, e um possível corante alternativo seria a Eritrosina B.

Diante disso, a proposta do trabalho é realizar um estudo comparativo entre os corantes Azul de Tripán e a Eritrosina B, como possível corante alternativo para contagem manual de células.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar um estudo comparativo com o corante Azul de Tripan e a Eritrosina B por meio das contagens das linhagens celulares VERO e L-929 em câmara de Neubauer para a verificação da compatibilidade entre os corantes.

2.2 Objetivos específicos

- a) Realizar contagem em Câmara de Neubauer das linhagens VERO e L-929 utilizando os corantes Azul de Tripan e Eritrosina B;
- b) Avaliar por meio de cálculos estatísticos se os corantes Azul de Tripan e Eritrosina B possuem ou não diferença significativa para possível substituição do corante na rotina do Setor de Cultura de Células.

3 METODOLOGIA

3.1 Cultivo Celular

Para este estudo foram utilizadas as linhagens celulares VERO (células epiteliais de rim de macaco verde africano – ATCC™ CCL-81®) e NCTC clone 929 [L-929] (tecido conjuntivo de camundongo - BCRJ código 0188).

As células foram cultivadas em frasco Corning® de 75cm² e mantidas em estufa umidificada a 37 °C ± 2 °C com atmosfera de 5% ± 1% CO₂, utilizando meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco – D7777), suplementado com L-glutamina 2mM (Gibco – 25030-081), NaHCO₃ 26mM (Sigma – S5761), 10% de SFB (soro fetal bovino) (Gibco – F7524) e antibiótico (estreptomicina 100 UI/ml; penicilina 100 g/ml) (Gibco – 2585893), seguindo as recomendações gerais para manutenção de cultivos celulares POP 65.3430.031 para a linhagem VERO e o PU 3430.055 para a linhagem L-929, seguindo as premissas do ensaio de citotoxicidade *in vitro* pelo método de difusão em ágar.

Por se tratar de um sistema de cultivo aderente, em que as células crescem aderidas ao substrato da garrafa de cultura, houve uma etapa de dissociação enzimática das células na fase logarítmica do crescimento celular.

Removemos e desprezamos o meio de cultura da garrafa, lavamos suavemente a monocamada por até três vezes com: 2-8mL de solução de DPBS (Thermo Fischer – 14190144) para garrafas de 25 cm². Posteriormente acrescentamos entre 1-2mL de solução de tripsina (Thermo Fischer – 1205010) na garrafa e incubamos em temperatura ambiente ou em estufa com temperatura até 37°C±1°C por aproximadamente 3 minutos. Soltamos a monocamada batendo suavemente na lateral da garrafa com a palma da mão e neutralizamos a tripsina adicionando meio de cultura DMEM suplementado. Homogeneizamos com a pipeta até obter uma suspensão celular.

3.2 Contagem Celular

As suspensões celulares de VERO e L-929 foram diluídas no fator 1:5 (diluindo 20µL de suspensão celular em 80µL de corante) nos corantes Azul de Tripán 0,4% (Gibco – 2679081) e Eritrosina B 0,1% (p/v) (Sigma – 198269) criando amostras independentes.

A contagem celular foi realizada manualmente em Câmara de Neubauer, da Opitk Labor; com quadrantes de $0,0025\text{mm}^2$ de área. Com a contagem dos quatro quadrantes laterais por meio da observação ao microscópio ótico invertido com aumento de 400x foi obtido o número total de células em cada compartimento da câmara. O cálculo da concentração e da viabilidade celular foi realizada conforme PU 3430.053.

3.3 Avaliação Estatística

Para realização das análises estatísticas dos resultados obtidos com as contagens celulares utilizando as linhagens VERO e L-929 e os corantes Azul de Tripan e Eritrosina B foi feita uma planilha no Excel com os valores da concentração e viabilidade.

Foi alimentada uma planilha que contém 160 contagens para célula VERO, 80 contagens são com o corante Azul de Tripan e 80 com a Eritrosina B, sendo contagens pareadas, de uma mesma alíquota cada contagem, gerando os valores de concentração e viabilidade. Assim como, contém 160 contagens para a célula L-929, 80 contagens são com o corante Azul de Tripan e 80 com a Eritrosina B, sendo contagens pareadas, de uma mesma alíquota cada contagem, gerando os valores de concentração e viabilidade.

A partir desses dados da planilha, foi realizado um *Boxplot* e um Histograma das células VERO e L-929 com os corantes Azul de Tripan e Eritrosina B para verificar a distribuição e o comportamento dos corantes referente a concentração e a viabilidade.

Para a verificação das hipóteses de equivalência entre os corantes, inicialmente foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos dados. Constatando que os dados não possuíam normalidade, aplicamos o teste não paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon para a comparação entre os grupos da concentração e viabilidade das células VERO e L-929 com os corantes Azul de Tripan e Eritrosina B.

4 RESULTADOS

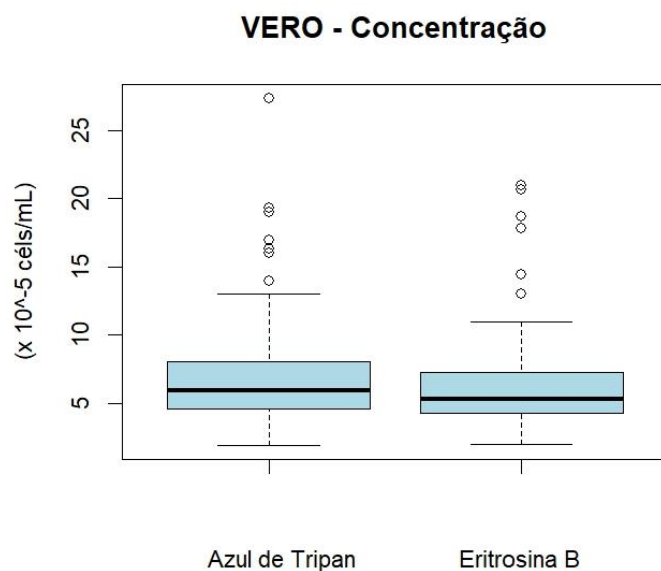
4.1 Análise Estatística da Concentração da Célula VERO

4.1.1 *Boxplot* da Concentração da Célula VERO

A partir dos dados das contagens, foi realizado um *Boxplot* da linhagem VERO, comparando os dados da concentração das células coradas com os corantes Azul de Tripan e Eritrosina B.

Podemos observar na Figura 8 o comportamento dos dados da concentração da célula VERO corada com o corante Azul de Tripan e Eritrosina B. O *Boxplot* calculou as medianas das 80 contagens com a célula VERO, tanto com o corante Azul de Tripan quanto com a Eritrosina B, criando os intervalos inter-quartílicos, definindo os valores máximos e mínimos e marcando os outliers.

Figura 8 - *Boxplot* da concentração da célula VERO comparando o corante Azul de Tripan e a Eritrosina B



Legenda: A Figura 8 representa o comportamento dos dados da concentração da célula VERO coradas com o Azul de Tripan e a Eritrosina B, criando os intervalos inter-quartílicos, definindo os valores máximos e mínimos e marcando os outliers que estão fora dos limites.

Fonte: A autora.

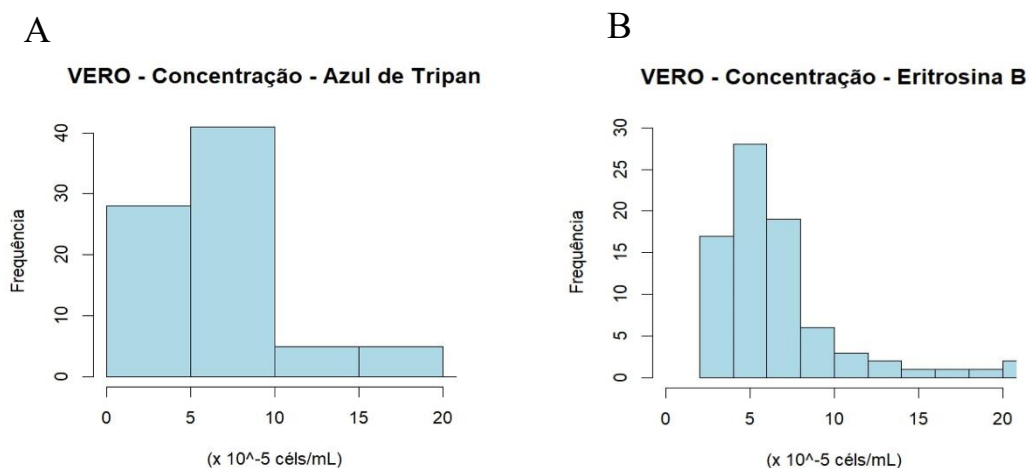
Analisando o *Boxplot* referente aos dados da concentração da célula VERO observamos que os intervalos inter-quartílicos e os valores máximos e mínimos quase se sobrepõem, indicando que a distribuição dos dados não é tão diferente quando comparamos os dados da concentração dos corantes Azul de Tripán e Eritrosina B, tornando o diagrama similar.

Além disso, observamos que ambos os corantes apresentaram outliers com concentrações maiores que aproximadamente 13×10^5 céls/mL.

4.1.2 Histogramas da Concentração da Célula VERO

Posteriormente a análise dos *Boxplot* da concentração da célula VERO comparando os dados do corante Azul de Tripán e da Eritrosina B, produzimos um gráfico de frequência para verificarmos a distribuição dos dados (Figura 9).

Figura 9 - Histogramas da concentração da célula VERO corada com o corante Azul de Tripán e com a Eritrosina B



Legenda: A Figura 9 representa os Histogramas dos dados da Concentração da célula VERO corada com o corante Azul de Tripán e com a Eritrosina B. Em A temos o gráfico de frequência da concentração da célula VERO corada com o Azul de Tripán e em B temos o gráfico de frequência da concentração da célula VERO corada com a Eritrosina B.

Fonte: A autora.

Após a análise dos Histogramas A e B da figura 9, constatamos uma similaridade no gráfico de frequência de ambos os corantes. Verificamos que a maior frequência da concentração de células VERO coradas com o Azul de Tripán está entre 5×10^5 céls/mL e 10×10^5 céls/mL, totalizando 40

contagens. E a maior frequência da concentração de células VERO coradas com a Eritrosina B foi de 5×10^5 céls/mL, totalizando quase 30 contagens.

Os Histogramas A e B mostram uma assimetria no conjunto de dados, para altas concentrações, apresenta baixa frequência, enquanto em baixas concentrações, apresenta alta frequência. No gráfico A a frequência varia de zero a 10×10^5 , e no B a frequência varia em torno de 2,5 a 10×10^5 céls/mL.

4.1.3 Teste de Hipótese de Equivalência

Para a verificação das hipóteses de equivalência referente aos dados da concentração da célula VERO entre os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B, inicialmente foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$), para avaliar a normalidade dos dados (Quadro 1).

Quadro 1 - Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk referente a concentração da célula VERO entre os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B

Dados da Concentração	p-valor
Azul de Tripán	$1,479 \times 10^{-09}$
Eritrosina B	$9,743 \times 10^{-10}$

Legenda: O Quadro 1 representa o resultado do teste de normalidade de Shapiro-Wilk referente aos dados da concentração da célula VERO entre os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B, em que o p-valor de ambos os corantes estão abaixo do nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

Fonte: A autora.

A partir dos dados do Quadro 1 verificamos que o p-valor referente as contagens com o corante Azul de Tripán e com a Eritrosina B encontram-se menores que o nível de significância de 5% estabelecido pelo teste Shapiro-Wilk, constatando que não temos evidências estatística para apresentarem uma tendência à Distribuição Normal.

Devido à não normalidade das contagens de célula VERO referente a concentração com os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B foi aplicado o teste não paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon, com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$) (Quadro 2).

Quadro 2 - Teste de Equivalência Mann-Whitney-Wilcoxon referente a concentração da célula VERO entre os corantes Azul de Tripan e Eritrosina B

Dado da Concentração	p-valor
Azul de Tripan x Eritrosina B	0,2542

Legenda: O Quadro 2 representa o resultado do teste de Equivalência Mann-Whitney-Wilcoxon referente aos dados da concentração da célula VERO entre os corantes Azul de Tripan e Eritrosina B, em que o p-valor é maior do que o nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

Fonte: A autora.

A partir dos dados do Quadro 2 verificamos que o p-valor referente as medianas da comparação entre os corantes Azul de Tripan e a Eristrosina B encontra-se maior que o nível de significância de 5% estabelecido pelo teste Mann-Whitney-Wilcoxon. Então, o teste de equivalência referente a comparação das medianas das concentrações da célula VERO com os dois corantes não apresenta diferença estatisticamente.

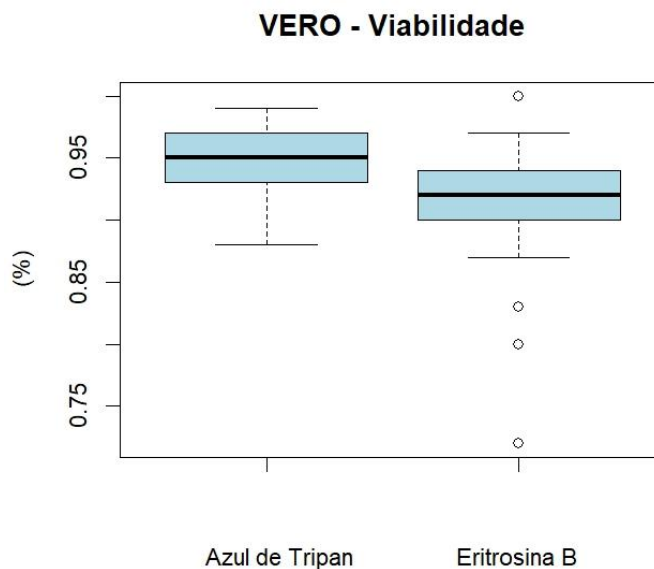
4.2 Análise Estatística da Viabilidade da Célula VERO

4.2.1 *Boxplot* da Viabilidade da Célula VERO

Com base nos dados da planilha elaborada, foi realizado um *Boxplot* da linhagem VERO, comparando os dados da viabilidade das células coradas com os corantes Azul de Tripan e Eritrosina B.

Na figura 10, podemos verificar o comportamento dos dados da viabilidade da célula VERO corada com o corante Azul de Tripan e Eritrosina B. O *Boxplot* criou os intervalos inter-quartílicos, definiu os valores máximos e mínimos e marcou os outliers calculando as medianas das 80 contagens com a célula VERO, tanto com o corante Azul de Tripan e quanto com a Eritrosina B.

Figura 10 - *Boxplot* da viabilidade da célula VERO comparando o corante Azul de Tripan e a Eritrosina B



Legenda: A Figura 10 representa o comportamento dos dados da viabilidade da célula VERO coradas com o Azul de Tripan e a Eritrosina B, criando os intervalos inter-quartílicos, definindo os valores máximos e mínimos e marcando os outliers que estão fora dos limites.

Fonte: A autora.

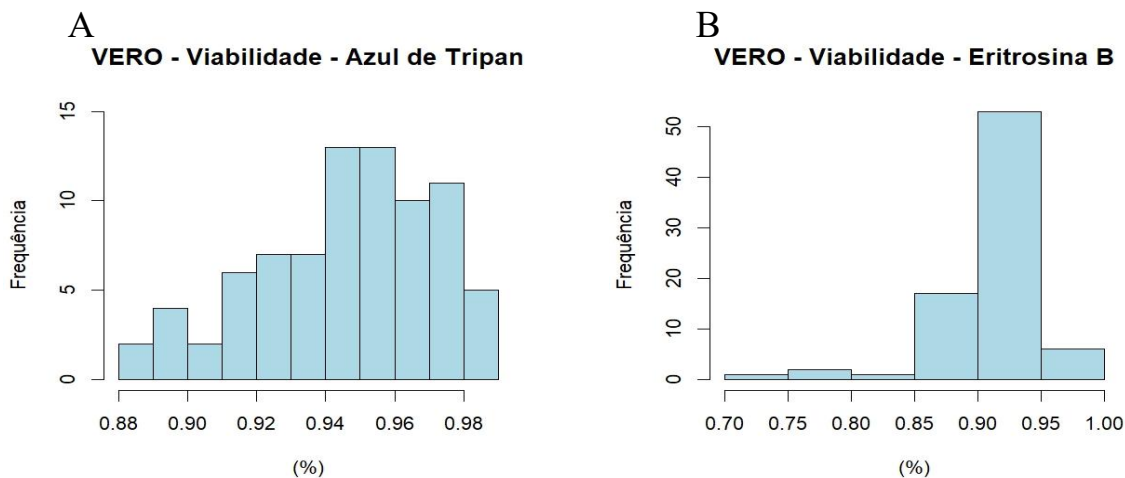
Após análise do *Boxplot* da viabilidade da célula VERO (Figura 10), verificamos que os intervalos inter-quartílicos não estão tão sobrepostos quando comparado com o *Boxplot* referente a concentração da célula VERO (Figura 8), porém, ainda assim, observamos uma similaridade nos intervalos inter-quartílicos e nos valores máximos e mínimos, mostrando que a variação das porcentagens dos corantes Azul de Tripan e Eritrosina B não é significativa.

Além disso, descontando os outliers presentes no diagrama do corante Eritrosina B, todas as viabilidades encontram-se acima de 85%, que é o valor preconizado pelo Setor de Cultura de Células/DI para realizar o fornecimento da célula, conforme o PU 3430.057 e PU 3430.055.

4.2.2 Histogramas da Viabilidade da Célula VERO

Após a análise dos *Boxplot* da viabilidade da célula VERO comparando os dados do corante Azul de Tripan e da Eritrosina B, produzimos um gráfico de frequência para verificarmos a distribuição dos dados (Figura 11).

Figura 11 - Histogramas da viabilidade da célula VERO corada com o corante Azul de Tripán e com a Eritrosina B



Legenda: A Figura 11 representa os Histogramas dos dados da Viabilidade da célula VERO corada com o corante Azul de Tripán e com a Eritrosina B. Em A temos o gráfico de frequência da viabilidade da célula VERO corada com o Azul de Tripán e em B temos o gráfico de frequência da viabilidade da célula VERO corada com a Eritrosina B.

Fonte: A autora.

A partir da Figura 11 podemos verificar no gráfico A que todas as contagens referentes a célula VERO coradas com o Azul de Tripán apresentaram uma porcentagem acima de 88%, assim como, observamos uma simetria maior nesse Histograma, uma vez que a frequência de contagens não possui uma variação tão grande quando olhamos os valores da viabilidade. Já no gráfico B, vemos que a célula VERO corada com a Eritrosina B possui porcentagens abaixo de 85%, que são os outliers representados no *Boxplot* da viabilidade (Figura 10). Além disso, vemos uma assimetria com relação as contagens quando olhamos os valores da viabilidade.

Se observamos ambos os gráficos, verificamos que as maiores frequências em A estão em torno de 94% a 98% e em B de 90% a 95%. Contudo, como o Histograma A apresenta uma simetria, existem contagens frequentes em torno de 91% a 94% que mostra que a variação da viabilidade entre o gráfico A e B não é tão grande.

4.2.3 Teste de Hipótese de Equivalência

Para a verificação das hipóteses de equivalência referente aos dados da viabilidade da célula VERO entre os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B, inicialmente foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$), para avaliar a normalidade dos dados (Quadro 3).

Quadro 3 - Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk referente a viabilidade da célula VERO entre os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B

Dados da Viabilidade	p-valor
Azul de Tripán	$3,108 \times 10^{-3}$
Eritrosina B	$6,299 \times 10^{-8}$

Legenda: O Quadro 3 representa o resultado do teste de normalidade de Shapiro-Wilk referente aos dados da viabilidade da célula VERO entre os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B, em que o p-valor de ambos os corantes estão abaixo do nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

Fonte: A autora.

A partir dos dados do Quadro 3 verificamos que o p-valor referente as contagens com o corante Azul de Tripán e com a Eritrosina B encontram-se menores que o nível de significância de 5% estabelecido pelo teste Shapiro-Wilk, constatando que não temos evidências estatística para apresentarem uma tendência à Distribuição Normal.

Devido à não normalidade das contagens de célula VERO referente a viabilidade com os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B foi aplicado o teste não paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon (Quadro 4).

Quadro 4 - Teste de Equivalência Mann-Whitney-Wilcoxon referente a viabilidade da célula VERO entre os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B

Dado da Viabilidade	p-valor
Azul de Tripán x Eritrosina B	$1,888 \times 10^{-10}$

Legenda: O Quadro 4 representa o resultado do teste de Equivalência Mann-Whitney-Wilcoxon referente aos dados da viabilidade da célula VERO entre os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B, em que o p-valor é menor do que o nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

Fonte: A autora.

A partir dos dados do Quadro 4 verificamos que o p-valor referente as medianas da comparação entre os dados dos corantes Azul de Tripán e a Eritrosina B encontra-se menores que o nível de

significância de 5% estabelecido pelo teste Mann-Whitney-Wilcoxon. Então, o teste de equivalência referente a comparação das medianas das viabilidades da célula VERO com os dois corantes apresenta diferenças estatisticamente.

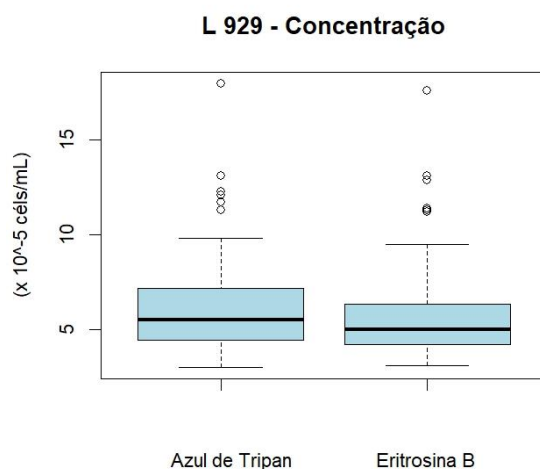
4.3 Análise Estatística da Concentração da Célula L-929

4.3.1 *Boxplot* da Concentração da Célula L-929

A partir dos dados da planilha elaborada, foi realizado um *Boxplot* da linhagem L-929, comparando os dados da concentração das células coradas com os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B.

Podemos observar na Figura 12 o comportamento dos dados da concentração da célula L-929 corada com o Azul de Tripán e com a Eritrosina B. O *Boxplot* calculou as medianas das 80 contagens com a célula L-929, tanto com o corante Azul de Tripán quanto com a Eritrosina B, criando os intervalos inter-quartílicos, definindo os valores máximos e mínimos e marcando os outliers.

Figura 12 - *Boxplot* da concentração da célula L-929 comparando o corante Azul de Tripán e a Eritrosina B



Legenda: A Figura 12 representa o comportamento dos dados da concentração da célula L-929 coradas com o Azul de Tripán e a Eritrosina B, criando os intervalos inter-quartílicos, definindo os valores máximos e mínimos e marcando os outliers que estão fora dos limites.

Fonte: A autora.

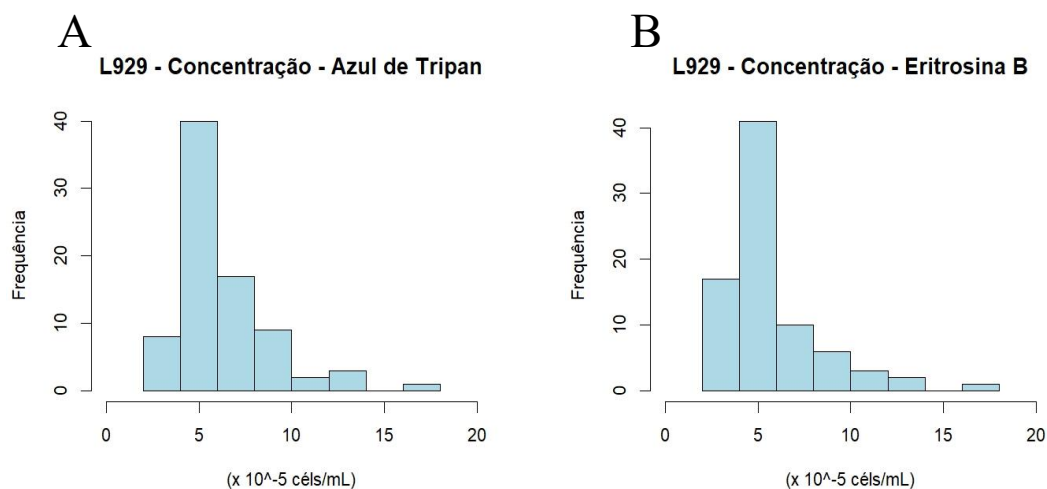
Analisando o *Boxplot* referente aos dados da concentração da célula L-929 observamos que os intervalos inter-quartílicos e os valores máximos e mínimos quase se sobrepõem (Figura 12), assim como o *Boxplot* da concentração da célula VERO (Figura 8). Isso indica que a distribuição dos dados não é tão diferente quando comparamos os dados da concentração dos corantes Azul de Tripán e Eritrosina B, tornando o diagrama similar.

Além disso, observamos ambos os corantes apresentaram outliers com concentrações maiores que aproximadamente 10×10^5 céls/mL.

4.3.2 Histogramas da Concentração da Célula L-929

Posteriormente a análise dos *Boxplot* da concentração da célula L-929 comparando os dados do corante Azul de Tripán e da Eritrosina B, produzimos um gráfico de frequência para verificarmos a distribuição dos dados (Figura 13).

Figura 13 - Histogramas da concentração da célula L-929 corada com o corante Azul de Tripán e com a Eritrosina B



Legenda: A Figura 13 representa os Histogramas dos dados da Concentração da célula L-929 corada com o corante Azul de Tripán e com a Eritrosina B. Em A temos o gráfico de frequência da concentração da célula L-929 corada com o Azul de Tripán e em B temos o gráfico de frequência da concentração da célula L-929 corada com a Eritrosina B.

Fonte: A autora.

Após a análise dos Histogramas A e B, constatamos uma similaridade no gráfico de frequência de ambos os corantes. Verificamos que a maior frequência da concentração de células L-929 coradas com o Azul de Tripán e com a Eritrosina B é 5×10^5 céls/mL, totalizando 40 contagens cada.

Os histogramas A e B (Figura 13) mostram uma assimetria no conjunto de dados, para altas concentrações, apresenta baixa frequência, enquanto em baixas concentrações, apresenta alta frequência, assim como visto no Histograma de concentração da célula VERO (Figura 9).

4.3.3 Teste de Hipótese de Equivalência

Para a verificação das hipóteses de equivalência referente aos dados da concentração da célula L-929 entre os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B, inicialmente foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$), para avaliar a normalidade dos dados (Quadro 5).

Quadro 5 - Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk referente a concentração da célula L-929 entre os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B

Dados da Concentração	p-valor
Azul de Tripán	$1,301 \times 10^{-08}$
Eritrosina B	$1,221 \times 10^{-09}$

Legenda: O Quadro 5 representa o resultado do teste de normalidade de Shapiro-Wilk referente aos dados da concentração da célula L-929 entre os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B, em que o p-valor de ambos os corantes estão abaixo do nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

Fonte: A autora.

A partir dos dados do Quadro 5 verificamos que o p-valor referente as contagens com o corante Azul de Tripán e com a Eritrosina B encontram-se menores que o nível de significância de 5% estabelecido pelo teste Shapiro-Wilk, constatando que não temos evidências estatística para apresentarem uma tendência à Distribuição Normal.

Devido à não normalidade das contagens de célula L-929 referente aos dados da concentração com os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B foi aplicado o teste não paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon, com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$) (Quadro 6).

Quadro 6 - Teste de Equivalência Mann-Whitney-Wilcoxon referente a concentração da célula L-929 entre os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B

Dado da Concentração	p-valor
Azul de Tripán x Eritrosina B	0,1274

Legenda: O Quadro 6 representa o resultado do teste de Equivalência Mann-Whitney-Wilcoxon referente aos dados da concentração da célula L-929 entre os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B, em que o p-valor é maior do que o nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

Fonte: A autora.

A partir dos dados do Quadro 6 verificamos que o p-valor referente as medianas da comparação entre os dados dos corantes Azul de Tripán e a Eristrosina B encontra-se maior que o nível de significância de 5% estabelecido pelo teste Mann-Whitney-Wilcoxon. Então, o teste de equivalência referente a comparação das medianas dos dados das concentrações da célula L-929 com os dois corantes não apresenta diferença estatisticamente, assim como ocorre no teste de equivalência da célula VERO (Quadro 2).

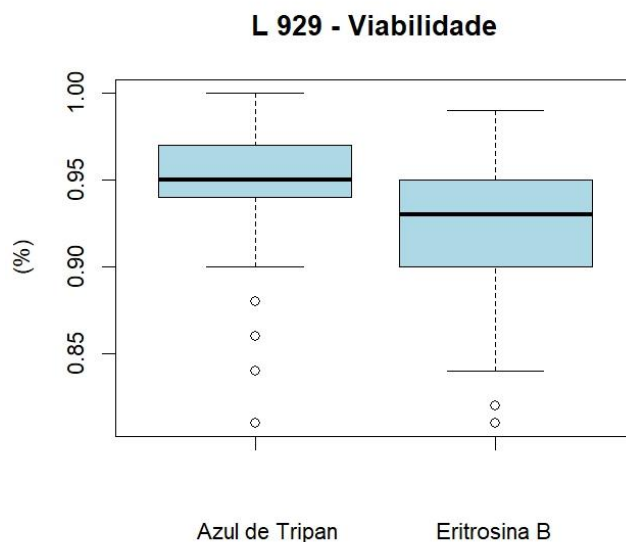
4.4 Análise Estatística da Viabilidade da Célula L-929.

4.4.1 *Boxplot* da Viabilidade da Célula L-929

Com base nos dados da planilha, foi realizado um *Boxplot* da linhagem L-929, comparando aos dados da viabilidade das células coradas com os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B.

Na figura 14, podemos verificar o comportamento dos dados da viabilidade da célula L-929 corada com o corante Azul de Tripán e Eritrosina B. O *Boxplot* criou os intervalos inter-quartílicos, definiu os valores máximos e mínimos e marcou os outliers calculando as medianas das 80 contagens com a célula L-929, tanto com o corante Azul de Tripán e quanto com a Eritrosina B.

Figura 14 - *Boxplot* da viabilidade da célula L-929 comparando o corante Azul de Tripan e a Eritrosina B



Legenda: A Figura 14 representa o comportamento dos dados da viabilidade da célula L-929 coradas com o Azul de Tripan e a Eritrosina B, criando os intervalos inter-quartílicos, definindo os valores máximos e mínimos e marcando os outliers que estão fora dos limites.

Fonte: A autora.

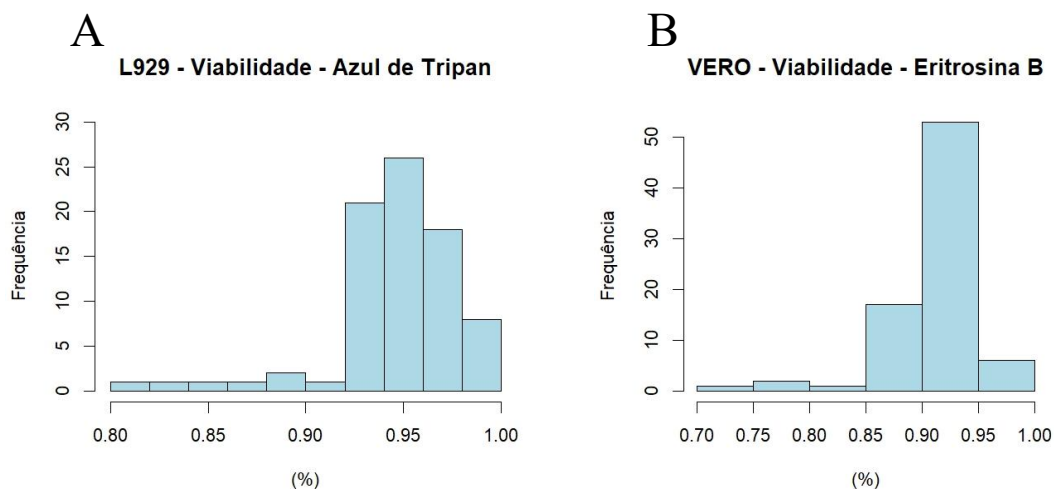
Após análise do *Boxplot* referente aos dados da viabilidade da célula L-929, verificamos que os intervalos inter-quartílicos não estão tão sobrepostos quando comparado com os dados da concentração da célula L-929 (Figura 12). Observamos uma similaridade nos intervalos inter-quartílicos e nos valores máximos, porém, quando analisamos os valores mínimos estabelecidos pelo programa, a porcentagem do corante Azul de Tripan é acima de 90% e a da Eritrosina B é de 85%.

Além disso, mesmo a Eritrosina B tendo limites mínimos de 85%, que é o valor preconizado pelo Setor de Cultura de Células/DI para realizar o fornecimento da célula, sua variação é um pouco maior que a do Azul de Tripan, o que acarreta a sobreposição de pontos que são considerados outliers para o Azul de Tripan.

4.4.2 Histogramas da Viabilidade da Célula L-929

Após a análise dos *Boxplot* da viabilidade da célula L-929 comparando os dados do corante Azul de Tripán e a Eritrosina B, produzimos um gráfico de frequência para verificarmos a distribuição dos dados (Figura 15).

Figura 15 - Histogramas da viabilidade da célula L-929 corada com o corante Azul de Tripán e com a Eritrosina B



Legenda; A Figura 15 representa os Histogramas dos dados da Viabilidade da célula L-929 corada com o corante Azul de Tripán e com a Eritrosina B. Em A temos o gráfico de frequência da viabilidade da célula L-929 corada com o Azul de Tripán e em B temos o gráfico de frequência da viabilidade da célula L-929 corada com a Eritrosina B.

Fonte: A autora.

A partir da Figura 15 podemos verificar no gráfico A que todas as contagens referentes a célula L-929 coradas com o Azul de Tripán apresentaram uma porcentagem acima de 80%, e que a célula L-929 corada com a Eritrosina B possui porcentagens acima de 70%.

No Histograma A percebemos que maior frequência é de 95%, com 25 contagens com a célula L-929 corada com o Azul de Tripán e, no Histograma B, a maior frequência está entre 90% e 95%, com 50 contagens com a célula L-929 corada com a Eritrosina B.

Além disso, podemos perceber que os pontos de menor repetição em ambos os corantes, abaixo de 92% para o corante Azul de Tripán e abaixo de 85% para a Eritrosina B, são os outliers mostrados no *Boxplot* da viabilidade da célula L-929 (Figura 14).

4.4.3 Teste de Hipótese de Equivalência

Para a verificação das hipóteses de equivalência referente aos dados da viabilidade da célula L-929 entre os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B, inicialmente foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$), para avaliar a normalidade dos dados (Quadro 7).

Quadro 7 - Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk referente a viabilidade da célula L-929 entre os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B

Dados da Viabilidade	p-valor
Azul de Tripán	$2,069 \times 10^{-07}$
Eritrosina B	$1,931 \times 10^{-4}$

Legenda: O Quadro 7 representa o resultado do teste de normalidade de Shapiro-Wilk referente aos dados da viabilidade da célula L-929 entre os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B, em que o p-valor de ambos os corantes estão abaixo do nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

Fonte: A autora.

A partir dos dados do Quadro 7 verificamos que o p-valor referente as contagens com o corante Azul de Tripán e com a Eritrosina B encontram-se menores que o nível de significância de 5% estabelecido pelo teste Shapiro-Wilk, constatando que não temos evidências estatística para apresentarem uma tendência à Distribuição Normal.

Devido à não normalidade das contagens de célula L-929 referente aos dados da viabilidade com os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B foi aplicado o teste não paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon (Quadro 8).

Quadro 8 - Teste de Equivalência Mann-Whitney-Wilcoxon referente a viabilidade da célula L-929 entre os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B

Dado da Viabilidade	p-valor
Azul de Tripán x Eritrosina B	$1,695 \times 10^{-6}$

Legenda: O Quadro 8 representa o resultado do teste de Equivalência Mann-Whitney-Wilcoxon referente aos dados da viabilidade da célula L-929 entre os corantes Azul de Tripán e Eritrosina B, em que o p-valor é menor do que o nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

Fonte: A autora.

A partir dos dados do Quadro 8 verificamos que o p-valor referente as medianas da comparação entre os dados dos corantes Azul de Tripán e a Eristrosina B encontra-se menores que o nível de

significância de 5% estabelecido pelo teste Mann-Whitney-Wilcoxon. Então, o teste de equivalência referente a comparação das medianas dos dados das viabilidades da célula L-929 com os dois corantes apresenta diferenças estatisticamente.

5 DISCUSSÃO

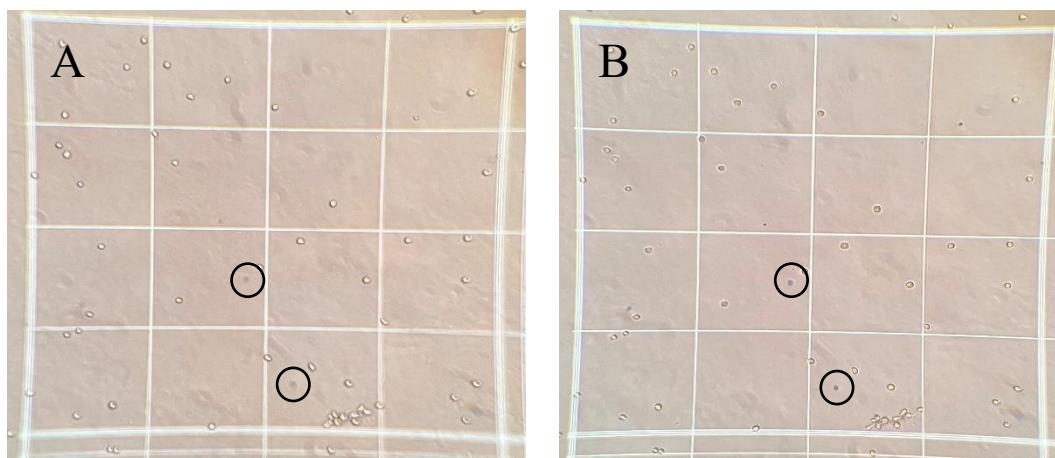
A contagem manual de células, com uso da câmara de Neubauer, é o método utilizado por ser rápido, de baixo custo, simples e direto. Logo, os laboratórios de cultivo celular, o utilizam de forma rotineira (Cadena-Herrera *et al.*, 2015; Johnston, 2018). O uso da câmara de Neubauer, associado ao corante Azul de Tripán vem sendo utilizados há anos, permitindo a obtenção do percentual de células mortas e, conseqüentemente, a concentração e viabilidade das células de forma confiável. A confiabilidade desta técnica está diretamente relacionada ao cuidado do manipulador para o preparo da suspensão celular e diluição da amostra (Carias *et al.*, 2018).

Como garantia da qualidade e validade dos resultados, é importante utilizar nas contagens equipamentos e instrumentos calibrados, verificados e com a manutenção periódica, como as micropipetas empregadas nas diluições (Associação Brasileira De Normas Técnicas, 2017).

Com base nos Histogramas referentes aos dados das concentrações tanto da célula VERO (Figura 9), quanto da célula L-929 (Figura 13) coradas com Azul de Tripán e Eritrosina B, ambos mostram uma assimetria no conjunto de dados, em que altas concentrações, apresentam baixa frequência, enquanto em baixas concentrações, apresentam alta frequência. Isso pode ser explicado devido ao tempo de crescimento da célula em cultura, a maioria das contagens foram feitas no início da fase logarítmica ou exponencial, tendo pouco tempo de incubação (Alves; Guimarães, 2010). Então, a maioria dos dados das contagens apresentaram concentrações mais baixas.

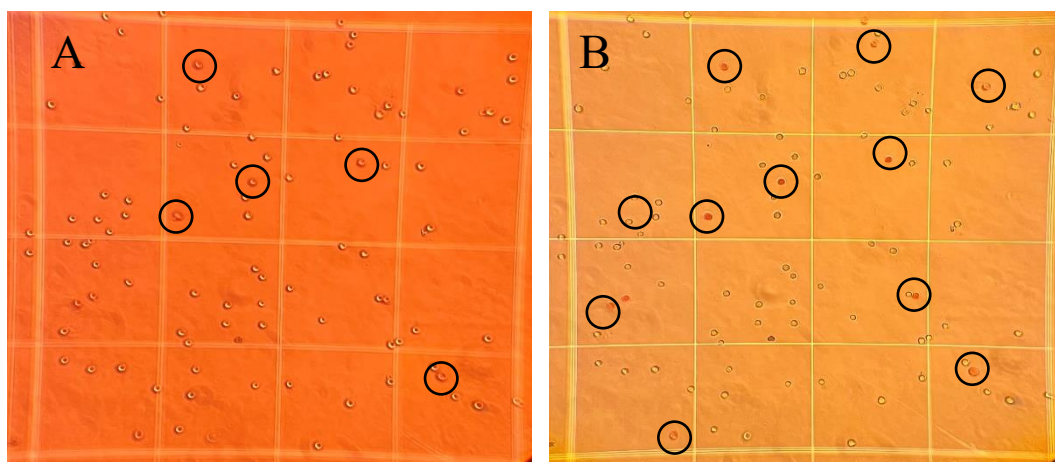
As células são impermeáveis ao corante Azul de Tripán, sua cinética baseia-se no fato de ser um corante carregado e não entrar nas células a menos que a membrana esteja comprometida. Logo, as células viáveis excluem o corante, e as células comprometidas (não viáveis) são coradas com um azul intenso (Thermo Fisher Scientific Inc, 2023). O mesmo pode ser dito da Eritrosina B, estudos mostram que este corante não entra em células viáveis, somente em células danificadas (Sahaphong *et al.*, 1971; Kim *et al.*, 2016). Porém, durante as contagens do trabalho, foi observado que depois de um curto período, as células que foram constatadas como viáveis, estavam coradas com a Eritrosina B, mostrando que com o passar do tempo, o corante tem facilidade em entrar na célula (Figura 16 e Figura 17).

Figura 16 - Quadrante da Câmara de Neubauer com células L-929 coradas com Azul de Tripán



Legenda: A Figura 16 mostra um quadrante da câmara de Neubauer da célula L-929 corada com o Azul de Tripán. Em A, marcado com os círculos, somente duas células foram coradas com o Azul de Tripán. Em B, verificamos as mesmas duas células coradas passados dois minutos de contato com o corante.
Fonte: A autora.

Figura 17 - Quadrante da Câmara de Neubauer com células L-929 coradas com Eritrosina B



Legenda: A Figura 17 mostra um quadrante da câmara de Neubauer da célula L-929 corada com a Eritrosina B. Em A, marcado com os círculos, cinco células foram coradas com a Eritrosina B. Em B, verificamos que aumentou para onze células coradas passados dois minutos de contato com o corante.
Fonte: A autora.

A partir dos resultados obtidos com os testes de hipótese, constatamos que o teste de equivalência referente aos dados comparação das medianas das concentrações da célula VERO com os dois corantes não apresentou diferenças estatísticas significativas (Quadro 2). Porém, a comparação das medianas dos dados da viabilidade da célula VERO com os dois corantes apresentou diferenças estatísticas significativas (Quadro 4).

O mesmo pode ser visto com relação a célula L-929, em que o teste de equivalência referente aos dados de comparação das medianas das concentrações da célula L-929 com os dois corantes não apresentou diferenças estatísticas significativas (Quadro 6). Porém, a comparação das medianas dos dados da viabilidade da célula L-929 com os dois corantes apresentou diferenças estatísticas significativas (Quadro 8).

Essa não similaridade pode ter ocorrido devido à falta de experiência com o corante Eritrosina B, o que dificultou diferenciar as células coradas e as não coradas, ou pode ter sido por conta da cinética de absorção do corante, que precisa ser mais estudada.

Além disso, outro fator que pode ter impactado nos resultados é a diferença dos diluentes dos corantes, o Azul de Tripan utiliza uma solução salina a 0,85% (Thermo Fisher Scientific Inc, 2023), e a Eritrosina B foi diluída em solução salina tamponada com fosfato - PBS pH 7,4 (Gibco) (Anexo). Assim como, pode ter sido a diluição das suspensões celulares nos corantes, pois a diluição interfere no número de células a serem contadas, quanto mais células, melhor é a precisão no cálculo da viabilidade.

O corante Azul de Tripan, por ser utilizado há anos, possui um grau de confiabilidade dos resultados muito alto, assim como, a prática de manipulação no preparo da suspensão celular e diluição da amostra já é bem estabelecida (Cadena-Herrera *et al.*, 2015; Johnston, 2018; Carias *et al.*, 2018). Já a Eritrosina B, é um corante comumente utilizado na área alimentícia (Marmio, 1979), e apesar de estudos mostrarem que vem sendo utilizado na cultura células (Kim *et al.*, 2016), ainda são necessários estudos mais avançados para que esse método de coloração esteja bem estabelecido e obtenha resultados confiáveis.

Uma possibilidade para melhorar a confiabilidade dos resultados obtidos nas contagens, seria a utilização de contadores automáticos, que vem sendo cada vez mais utilizados por serem fáceis de usar, além de mais confiáveis e precisos que a contagem manual, em que a confiabilidade está sujeita a subjetividade do manipulador (Tholudur *et al.*, 2006; Cadena-Herrera *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016; Johnston, 2018).

6 CONCLUSÃO

Os corantes vitais Azul de Tripán e Eritrosina B não apresentaram diferenças estatísticas significativas ao determinar as concentrações celulares das linhagens VERO e L-929. Porém, foi observada uma diferença estatística entre os corantes quanto a determinação da viabilidade nas duas abordagens (Azul de Tripán e Eritrosina B).

Logo, a Eritrosina B não se mostrou-se um corante vital viável para o uso nas atividades do Setor de Cultura de Células pois apresentou diferenças significativas estatisticamente com relação a viabilidade.

Contudo, o percentual de células viáveis das duas linhagens celulares testadas permaneceu acima de 85%, valor preconizado pelo Setor de Cultura de Células/DI para realização de fornecimentos do substrato celular e para a manutenção das culturas. Então, desde que seja estabelecido um procedimento de uso definindo e padronizando, além de um treinamento dos profissionais na sua utilização e estudos mais aprofundados com relação a cinética de absorção do corante, a Eritrosina B pode vir a ser utilizada como corante vital no setor.

Além disso, a utilização da Eritrosina B como corante vital no Setor de Cultura de Células para determinação da concentração e viabilidade celular contribuiria para a redução na geração de resíduos tóxicos, diminuindo a probabilidade de lesões individuais e a poluição ambiental.

REFERÊNCIAS

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. *In*: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. (org.). **Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2009. v. 2, cap. 5, p.215-253.

ALVES, F. N. R.; PECI, A. Análise de Impacto Regulatório: uma nova ferramenta para a melhoria da regulação na Anvisa. **Revista de Saúde Pública**, v. 45, p. 802-805, ago. 2011.

Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rsp/a/nLq8TdwdnRdWQZrtTcGWPNn/abstract/?lang=pt#>. Acesso em: 15 jan. 2024.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Plano Diretor de Vigilância Sanitária**. 1.ed. Brasília: Anvisa, 2007. 20 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. 3. ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2017. Disponível em: https://www.exactusmetrologia.com.br/sites/default/files/3-nbr_iso_iec_17025-2017-versao_exclusiva_treinamento.pdf. Acesso em: 04 jan. 2024.

ATCC. **Clone NCTC 929 [célula L, L-929, derivado da Cepa L]**. 2023. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/ccl-1>. Acesso em: 12 jan. 2024.

ATCC. **VERO CCL-81**. 2023. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/ccl-81>. Acesso em: 12 jan. 2024.

BRASIL. Resolução DC/ANVISA n. 73 de 21 de outubro de 2008. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para procedimento de liberação de lotes de vacinas e soros hiperimunes heterólogos para consumo no Brasil e também para exportação. **Diário Oficial da União**. Brasília, 22 out. 2008.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 de setembro de 1990.

BRASIL. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, seção 1, 27 de janeiro de 1999, p. 1.

BRASIL. Serviços e Informações do Brasil. Saúde e Vigilância Sanitária. **Controlar a qualidade de produtos - Fiocruz/RJ**. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/servicos/controlar-a-qualidade-de-produtos>. Acesso em: 05 de dezembro de 2023.

CARIAS, Rosana Bizon Vieira *et al.* Qualidade dos produtos de terapias avançadas: requisitos de células extensamente manipuladas usadas em terapias celulares e em bioengenharia. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 6, n. 1, p. 84-95, 2018. Disponível

em: <https://visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/view/1048/432>. Acesso em: 14 jan. 2024.

CARVALHO, R. F. **Estudo da infectividade da vacina tetravalente da dengue em diferentes linhagens celulares e sua aplicabilidade em um ensaio de potência**. 2021. 155 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2021. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/55433>. Acesso em: 10 dez. 2023.

COSTA, E.A.; ROZENFELD, S. Constituição da vigilância sanitária no Brasil. *In*: ROZENFELD, S. (org.). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. p. 15-40. ISBN 978-85-7541-325-8.

CADENA-HERRERA, D. *et al.* Validation of three viable cell counting methods: manual, semi-automated, and automated. **Biotechnol Rep: Amst.**, v. 18, n. 7, p. 9-16. abr. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28626709/>. Acesso em: 15 jan. 2024.

DESMYTER, J.; MELNICK, J.L.; RAWLS, W.E. Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). **Journal of Virology**, v. 2, n. 10, p. 955-961, out. 1968. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4302013> Acesso em: 05 nov. 2023.

FRESHNEY, R. Ian. Basic principles of cell culture. *In*: GORDANA, Vunjak-Novakovic; FRESHNEY, R. Ian. **Culture of cells for tissue engineering**. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2006. p. 11-14.

INCQS (Brasil). **Núcleo Técnico de Produtos Biológicos**. Rio de Janeiro: INCQS, 2023. Disponível em: https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=87&Itemid=95. Acesso em: 01 nov. 2023.

INCQS (Brasil). **PU 3430.053**: contagem de células em câmara de Neubauer. Rev. 1. Rio de Janeiro: INCQS, 2022.

JOHNSTON. G. Automated handheld instrument improves counting precision across multiple cell lines. **BioTechniques**, 2018. Disponível em: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/000113407>. Acesso em: 10 nov. 2023.

KIM, Soo *et al.* Application of a non-hazardous vital dye for cell counting with automated cell counters. **Analytical biochemistry**, v. 492, p. 8-12, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269715004406>. Acesso em: 10 nov. 2023.

KLIERNAN, J. D. Estudo do sedimento urinário normal. **Anais da Faculdade de Medicina de Porto Alegre**, v. 22, n. 1, p. 63-68, 1962. Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/index.php/anaisfamed/article/view/78733>. Acesso em: 14 jan. 2024.

KOKSHAROV, Misha. Nucleus-highlighting (terminal/lethal) staining of adherent live U2-OS cells by Erythrosine B. **protocols.io**, 2022. Disponível em: <https://www.protocols.io/view/nucleus-highlighting-terminal-lethal-staining-of-a-bvfjn3kn.html>. Acesso em: 08 fev. 2024.

KRAUSE, A.W.; CARLEY, W.W.; WEBB, W.W. Fluorescent erythrosin B is preferable to trypan blue as a vital exclusion dye for mammalian cells in monolayer culture. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 32, n. 10, p. 1084-1090, oct.1984. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/epdf/10.1177/32.10.6090533>. Acesso em: 15 jan. 2024.

MARMIO, D. M. **Handbook of US colorants: foods, drugs, cosmetics, and medical devices**. Nova Iorque: Wiley Interscience, 1979. Disponível em: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Handbook%20of%20U.S.%20Colorants%20for%20Foods%2C%20Drugs%2C%20and%20Cosmetics&publication_year=1979&author=D.M.%20Marmion. Acesso em: 20 nov. 2023.

MIGITA, N. A. **Cultivo celular in vitro: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares**. 2012. 68 f. Monografia (Graduação em Ciências Biomédicas) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012. Disponível em:

https://scholar.google.com.br/citations?view_op=view_citation&hl=pt-BR&user=IERhknoAAAAJ&citation_for_view=IERhknoAAAAJ:u5HHmVD_uO8C. Acesso em: 14 jan. 2024.

MONATH, T.P. *et al.* ACAM2000 clonal Vero cell culture vaccinia virus (New York City Board of Health strain) – a second-generation smallpox vaccine for biological defense. **Int. Journal of Infectious Diseases**, v.8, n. 2, p.31-44, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971204001341>. Acesso em: 14 jan. 2024.

OLIVEIRA, Raimundo Antônio Gomes *et al.* A absoluta recomendação de se usar o método direto de contagem de plaquetas em câmara de Neubauer em pacientes intensamente plaquetopênicos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 139-141, 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpml/a/NqrKxSGZsFfxGFppnPZvkqK/>. Acesso em: 20 dez. 2023.

OSADA, N. *et al.* The Genome Landscape of the African Green Monkey Kidney- Derived Vero Cell Line. **DNA Research**, v.21, p.673-683, 2014. Disponível em: <https://academic.oup.com/dnaresearch/article/21/6/673/2754551?login=false>. Acesso em: 14 jan. 2024.

SÁ, F. *et al.* Brazilian Journal of Development Fotodescoloração dos corantes alimentícios vermelho eritrosina e azul brilhante por fotólise direta Photodiscoloration of erythrosine red and bright blue food dyes by direct photolysis. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 46707-46718, 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/343083197_Brazilian_Journal_of_Development_Fotodescoloracao_dos_corantes_alimenticios_vermelho_eritrosina_e_azul_brilhante_por_fotolise_direta_Photodiscoloration_of_erythrosine_red_and_bright_blue_food_dyes_by_. Acesso em: 14 jan. 2024.

SAHAPHONG, Somphong; TRUMP, Benjamin F. Studies of cellular injury in isolated kidney tubules of the flounder. V. Effects of inhibiting sulfhydryl groups of plasma membrane with the organic mercurials PCMB (parachloromercuribenzoate) and PCMB (parachloromercuribenzenesulfonate). **The American Journal of Pathology**, v. 63, n. 2, p. 277, 1971. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2047495>. Acesso em: 10 jan. 2024.

SANTOS, Rogério Lacerda dos *et al.* Citotoxicidade do gel clareador peróxido de carbamida em células L929. **Revista Odonto Ciência**, v. 25, n. 3, p. 271-275, 2010. Disponível em: http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?pid=S1980-65232010000300010&script=sci_arttext&lng=pt. Acesso em: 16 jan. 2024.

SILVA, Andréia Maria da *et al.* Relações entre a câmara de Neubauer a espectrofotometria utilizada para a determinação da concentração espermática de catetos (Pecari tajacu). **Ciência Rural**, v. 44, p. 1494-1498, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/pPNgLV3SMjnvBbg4zqFMXyv/>. Acesso em: 16 jan. 2024

SILVA, José Agenor Alvares da; COSTA, Ediná Alves; LUCCHESI, Geraldo. SUS 30 anos: vigilância sanitária. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, p. 1953-1961, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.org/article/csc/2018.v23n6/1953-1961/>. Acesso em: 16 jan. 2024.

THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. **Solução Azul Trypan, 0,4%**, 2023. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15250061>. Acesso em: 10 jan. 2024.

THOLUDUR, A. *et al.* Comparing automated and manual cell counts for cell culture applications. **Bio Process Int.**, 2006. p. 28-34. Disponível em: http://www.bioprocessintl.com/wp-content/uploads/bpi-content/06049ar04_76381a.pdf. Acesso em: 15 jan. 2024.

TURBOW, M.M. Teratogenic effect of trypan blue on rat embryos cultivated in vitro. **Nature**, v. 206, 1965. p. 637. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/206637a0>. Acesso em: 15 dez. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Acceptability of cells substrates for production of biologicals. **WHO Tech. Rep. Ser.**, v. 747, p. 5-24, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Requirements for continuous cell lines used for biologicals substances. **WHO Tech. Rep. Ser.**, v. 745, p. 99-115, 1987.

ANEXO

Reagente:

Eritrosina B 0,1%	
Armazenamento 1 mês a $+ 5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$	
Reagentes	Quantidade
Eritrosina B 0,4%	25 mL
Solução PBS (1xC) sem Ca^{2+} nem Mg^{2+}	Quantidade suficiente para 100 mL