



Vitae

ISSN: 0121-4004

vitae@udea.edu.co

Universidad de Antioquia

Colombia

Escobar M, Linamaría; Aristizábal G, Fabio A
APLICACIÓN DE UN MÉTODO FLUOROMÉTRICO PARA EVALUAR LA PROLIFERACIÓN
CELULAR EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES

Vitae, vol. 17, núm. 2, 2010, pp. 173-180

Universidad de Antioquia

Medellín, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169815396009>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

APLICACIÓN DE UN MÉTODO FLUOROMÉTRICO PARA EVALUAR LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES

FLUOROMETRIC ASSAY FOR CELL PROLIFERATION IN HUMAN TUMOR CELL LINES APPLICATION

Linamaría Escobar M., Fabio A. Aristizábal G.^{1*}

Recibido: Junio 22 de 2008 Aceptado: Mayo 20 de 2010

RESUMEN

La valoración de citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares derivadas de tumores humanos permite explorar la actividad biológica de productos aislados de diferentes fuentes como primer tamizaje en búsqueda de moléculas con potencial actividad anticancerígena. En este trabajo se implementó el método de reducción de resazurina como indicador indirecto de supervivencia celular. Para ello fue necesario seleccionar la concentración de resazurina y el tiempo de incubación ideal para obtener unidades relativas de fluorescencia (URF) óptimas sobre las líneas celulares MCF-7, MKN-45, SiHa, HEp-2, HT-29 y HeLa. Seguidamente, se compararon los resultados de supervivencia obtenidos al emplear el método de reducción MTT y el método de tinción SRB, definidos como ensayos de tipo terminal, con el uso de resazurina, descrita como poco tóxica para las células. La comparación de los métodos se hizo en términos de porcentaje de supervivencia, donde se evaluó la sensibilidad de las líneas a doxorubicina HCl, un medicamento empleando en el tratamiento del cáncer. Los resultados obtenidos demuestran que el método de reducción de resazurina empleado en una concentración 4,4 μM es útil en ensayos de rutina para detectar cambios significativos de la población celular cuando su crecimiento varía como consecuencia de la exposición a moléculas con actividad citotóxica.

Palabras clave: ensayo *in vitro*, citotoxicidad, líneas tumorales, resazurina.

ABSTRACT

Assessment of *in vitro* cytotoxicity as a model to explore biological activity of compounds isolated from different sources is the first approached to search molecules with potential anticancer activity. This paper is about how to implement resazurin reduction method as an indirect indicator of cell survival. Indeed both optimal resazurin concentration and incubation time were selected on MCF-7, MKN-45, SiHa, HEp-2, HT-29 and HeLa. Next, we compared survival results by using reduction method MTT and staining method SRB defined as end-point tests, and resazurin method described as slightly toxic to cells. The comparison of the methods was done in terms of survival rate to evaluate the sensitivity of the lines to doxorubicin HCl, a medicine used in cancer. The methods were compared in terms of percentage survival by evaluating cell line sensitivity to doxorubicin HCl (a drug used in cancer treatment). The results show that resazurin reduction method used in 4.4 μM is applicable to detect significant changes in cell population exposed to cytotoxic molecules in routine testing.

Key words: *in vitro* assay, cytotoxicity, cell lines, resazurin.

1 Grupo de Farmacogenética del Cáncer. Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: faaristizabal@unal.edu.co

INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de moléculas potencialmente útiles en el tratamiento de cáncer, uno de los principales métodos para el tamizaje *in vitro* de diferentes productos, es el ensayo de citotoxicidad empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos (1). En estos ensayos comúnmente se aplican diferentes métodos de tinción celular con el fin de estimar de forma indirecta el número de células viables, luego de someterlas a tratamiento con diferentes concentraciones de un xenobiótico.

Sin embargo, la mayoría suelen ser métodos de tipo terminal, ya que emplean sistemas de tinción destructivos, lo cual impide seguir el comportamiento de las células post tratamiento y/o realizar ensayos complementarios sobre las células sobrevivientes (2).

Entre los métodos más empleados están la reducción del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) (3), que requiere de células vivas, o que, al menos, muestren actividad óxido-reductasa, para convertir el colorante precursor en un producto cuantificable, y la tinción con sulforodamina B (SRB) que, por su afinidad con los aminoácidos básicos de las proteínas, se fija selectivamente en éstos, proporcionando un índice del contenido de proteína celular (1,4).

Al igual que los métodos anteriormente mencionados, la resazurina fue introducida como indicador de viabilidad celular no tóxica, útil para monitorear la proliferación celular y la citotoxicidad (2, 5, 6, 7). En particular, este colorante (azul no fluorescente) se reduce en dos pasos, irreversiblemente a resorufina (rosado altamente fluorescente), y en una segunda etapa reversible, a dihidroresorufina, compuesto incoloro y no fluorescente, procesos que se asocian principalmente con la mitocondria de células viables (5, 8) y se indican en la figura 1.

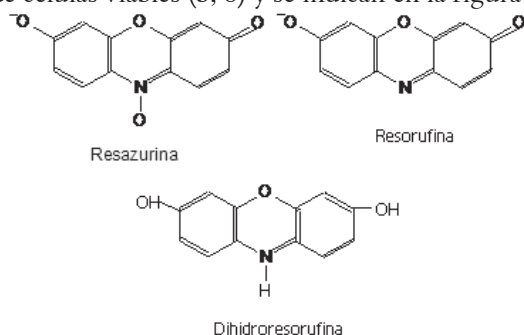


Figura 1. Conversión de resazurina a resorufina (fluorescente), y posteriormente a dihidroresorufina (no fluorescente) por acción metabólica de células viables.

La resorufina es difundida al medio permitiendo el continuo monitoreo de la proliferación y/o muerte celular (citotoxicidad) asociada al tratamiento con xenobióticos sobre células humanas (5, 8, 9, 10, 11), animales (12), bacterias (13), parásitos (14) e incluso hongos (15); igualmente se emplea en la degradación de contaminantes como indicador redox, que combinada con otras técnicas sirve para obtener conocimientos fundamentales en los procesos bioquímicos (16).

Así, su empleo permite la continuidad de estudios en la misma población celular, economizando tiempo y dinero, especialmente en cultivos primarios donde las células son muy escasas y preciadas. Además, la determinación de la cantidad de células viables con este sistema de tinción es muy sensible y altamente reproducible (17, 18).

El objetivo de este trabajo es implementar la resazurina en bioensayos de tamizaje sobre líneas celulares tumorales, como método de tinción celular sensible, específico y poco tóxico, para valorar el efecto citotóxico de productos promisorios con actividad antitumoral, permitiendo complementar los modelos disponibles para la evaluación de actividad citotóxica *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

Se emplearon seis líneas celulares: adenocarcinoma de cáncer de mama MCF-7(ATCC: HTB-22), reportada por NCI como sensible a fármacos (19), adenocarcinoma gástrico MKN-45 (DSMZ: ACC 409), carcinoma escamocelular de cérvix SiHa (ATCC: HTB-35), carcinoma epidermoide de laringe HEp-2 (ATCC: CCL-23), adenocarcinoma colorectal HT-29 (ATCC:HTB-38), y adenocarcinoma de cérvix HeLa (ATCC: CCL-2), todas de crecimiento adherente, derivadas de tumores sólidos humanos, obtenidas del Banco de Células del Laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Cancerología de Colombia, en Bogotá. Todas fueron cultivadas en Medio Mínimo Esencial (MEM), suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS), gentamicina (50 µg/mL) y bicarbonato de sodio (2,2 g/L), en cajas de cultivo estériles de 75 cm², e incubadas en condiciones estándar (20).

Para el mantenimiento de los cultivos se hizo cambio de medio cada dos días lavando las células con solución tampón de fosfatos (PBS) de 298 mOsm/L y pH= 7,3.

Conteo y comprobación de viabilidad

Los cultivos con 90% de confluencia se trataron con solución de tripsina al 0,025% y EDTA al 0,03% durante 5 minutos, a 37°C. Se obtuvo una suspensión celular que se contó en cámara de Neubauer mediante el método de exclusión de azul de tripano.

Densidades celulares

Se emplearon las densidades celulares establecidas en trabajos previos del laboratorio con el método de reducción de MTT (21-23). Para MCF-7: 15000 células/pozo, MKN-45: 15000 células/pozo, SiHa: 10000 células/pozo, HEp-2: 7500 células/pozo, HT-29: 15000 células/pozo y HeLa: 10000 células/pozo, en un volumen de 100 μ L por pozo. Las densidades celulares fueron sembradas en placas de 96 pozos que se incubaron durante 24 horas en condiciones estándar, para permitir la adhesión de las células a la superficie del pozo.

Selección de los parámetros para la aplicación del método de resazurina

Se estimó el efecto de la concentración de resazurina y del tiempo de incubación sobre la intensidad de la fluorescencia obtenida. Se evaluaron las concentraciones 4,4 μ M, 6,6 μ M y 8,8 μ M en un volumen final de 100 μ L por pozo. En el momento de su uso las soluciones de trabajo se prepararon a partir de una solución stock 44 μ M diluida con medio de cultivo sin suplementar (7, 24). Las placas de cultivo se incubaron durante 1, 4, 6, 24, 48 y 72 horas, en condiciones estándar y midiendo la intensidad de fluorescencia después de cada período de incubación (25). Se empleó un fluorómetro TECAN GENios con los filtros de 535nm para excitación y 595nm para la emisión (26). Todos los ensayos se efectuaron por triplicado.

Comparación de tres métodos de evaluación de proliferación celular

Con el fin de comparar las respuestas para los tres métodos se realizaron paralelamente dos bloques de mediciones, en el primero empleando las líneas HEp-2, HeLa y HT-29 sembradas en dos placas de 96 pozos; una fue sometida a tinción con MTT, y la otra se trató con resazurina. En el segundo bloque, las líneas MKN-45, SiHa y MCF-7 fueron cultivadas en otras dos placas de 96 pozos y de igual manera; una leída con el método de tinción SRB y otra con resazurina. Como tratamiento se empleó doxorubicina HCl (Ebewe Pharma®) en

concentraciones de 10 μ M, 1 μ M y 0,1 μ M, obtenidas por dilución seriada en MEM suplementado con 5% de SFB (21). Después de un tratamiento de 48 horas, se determinó la población celular viable en las placas empleando los diferentes métodos.

Tinción con MTT

Aunque se han descrito diferentes protocolos, todos basados en el establecido por Mosmann (3), se atendió a las condiciones utilizadas por el grupo de Farmacogenética del Cáncer en las valoraciones de citotoxicidad (23).

Cumplido el tiempo de tratamiento, se preparó una solución de MTT diluida en PBS (1 mg/mL) y se añadieron 100 μ L en concentración 0,25 mg/mL en cada pozo con medio sin suplementar. Las placas fueron incubadas durante 4 horas en condiciones estándar. Luego, cuidadosamente, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 100 μ L de DMSO. Para la lectura de las placas de cultivo se usó un lector de placas BIORAD 550 a 570 nm. Los valores resultantes se tomaron como medida indirecta de masa celular viable.

Tinción con SRB

Cumplido el tiempo de tratamiento se adicionaron a cada pozo 100 μ L de solución de ácido tricloro acético (TCA) al 10% y se incubó durante 1 hora a 4°C. Pasado este tiempo, se desechó el TCA y se lavó con agua cada placa cinco veces, dejándolas secar completamente. A continuación se adicionaron a cada pozo 100 μ L de solución de SRB al 0,4 % en ácido acético, incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se eliminó el colorante y se lavaron los pozos cinco veces con 50 μ L de ácido acético al 1%. Por último, se adicionaron en cada pozo 100 μ L de solución de TRIS base 10 mM, pH 10,5; y se leyeron las placas en un lector BIORAD 550 nm a 570 nm (4).

Análisis estadístico

Los datos comparados fueron los porcentajes de supervivencia obtenidos a partir de las unidades de absorbancia en el caso de MTT y SRB, y la intensidad de fluorescencia expresada en unidades relativas de fluorescencia (URF) para resazurina, con el fin de establecer las diferencias de respuesta entre métodos, y así indicar si proveen resultados comparables. Para ello se aplicó el coeficiente de correlación de *Spearman*, empleando el programa estadístico SPSS versión 13.0 para Windows.

RESULTADOS

Selección de los parámetros de aplicación del método de resazurina

Como tendencia común a todas las líneas celulares, la señal de fluorescencia (URF) aumentó a medida que se incrementaba independientemente cada uno de los factores evaluados (concentración de resazurina y tiempo) durante las 24 horas, como se indica en la Figura 2.

Los valores máximos de intensidad de fluorescencia se obtuvieron a las 24 h de incubación en la mayoría de las líneas celulares; después de este tiempo disminuyeron paulatinamente, incluso hasta intensidades inferiores a las observadas en las primeras horas de incubación, como se evidencia en la figura 2. Esto indica que los cambios en la intensidad de la fluorescencia sólo se pueden apre-

ciar claramente en las primeras horas posteriores a la adición de la resazurina.

Se observó un incremento marcado en la intensidad de la fluorescencia entre la hora cero y las 4 horas de incubación para las líneas celulares MCF-7, SiHa, HEP-2 y HeLa. Pasado este tiempo se observó una fase de meseta en la intensidad, que se mantuvo hasta las 24 h, en donde la señal empezó a decrecer. Para las líneas celulares MKN-45 y HT-29, el máximo de intensidad en la fluorescencia se alcanzó a las 6 h de incubación.

Estadísticamente, con un $P > 0,005$ obtenido para las distintas combinaciones de tiempo y concentración de resazurina, no se observaron diferencias significativas, es decir, las URF obtenidas de las diferentes concentraciones evaluadas no difieren considerablemente en las líneas celulares valoradas.

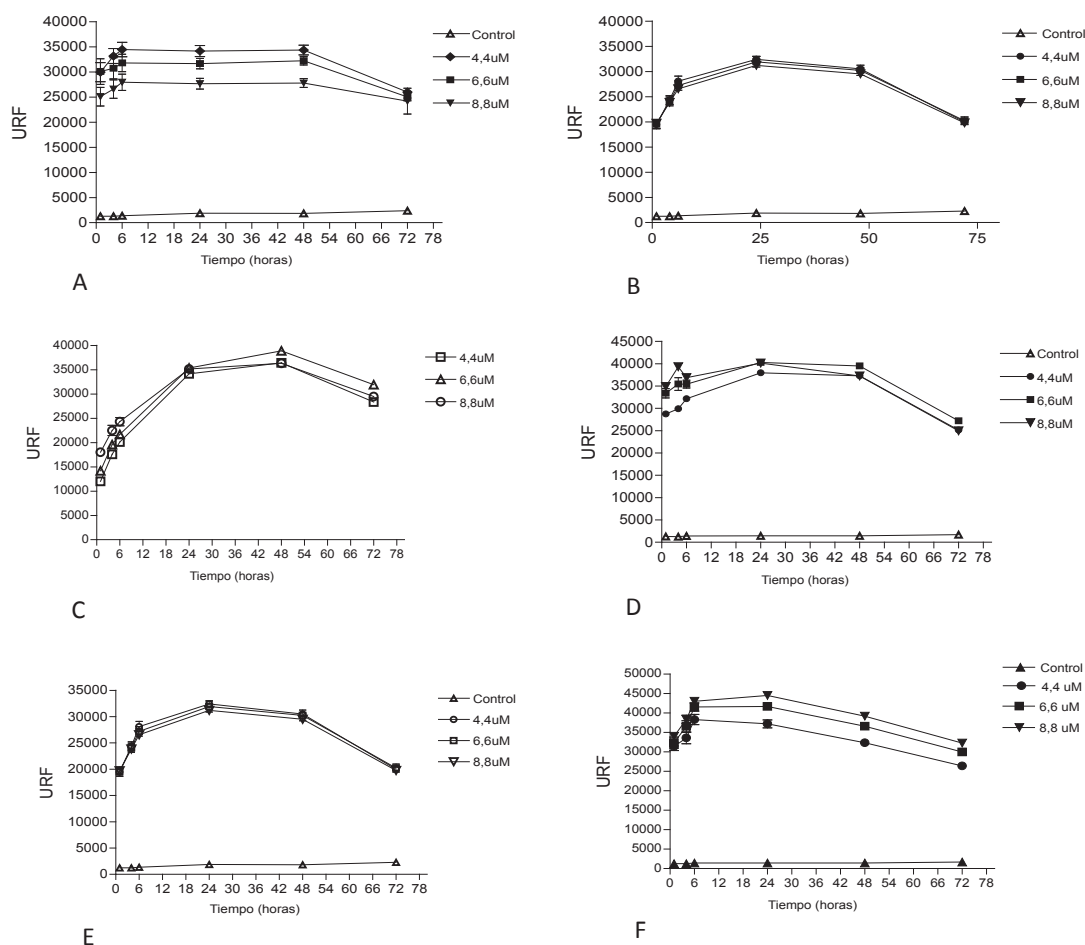


Figura 2. Seguimiento en el tiempo de la reducción de resazurina a resorufina durante un periodo total de incubación de 72 horas, empleando diferentes concentraciones de resazurina en seis líneas celulares **A:** SiHa, **B:** MCF-7, **C:** MKN-45, **D:** HEP-2, **E:** HT-29 y **F:** HeLa. $n=6$, $p=0.05$ y ± 1 desviación típica.

Al comparar las respuestas obtenidas con cada concentración de resazurina no se apreciaron diferencias en las URF en la mayoría de las líneas, con excepción de SiHa, que mostró una intensidad de fluorescencia máxima con la menor concentración evaluada ($4,4 \mu\text{M}$). En general, los resultados, que oscilaron entre 12000 y 45000 URF aproximadamente, muestran semejanza en los valores de intensidad de fluorescencia.

Con base en los resultados obtenidos se seleccionaron como condiciones mínimas requeridas para la aplicación del método de reducción de resazurina al evaluar doxorubicina HCl, una concentración

de resazurina $4,4 \mu\text{M}$ por pozo, y un tiempo de incubación de 4 horas, en condiciones de 37°C , $5\% \text{CO}_2$ y 100% de humedad. Para todas las líneas celulares valoradas, esta concentración presentó una buena respuesta, medida en URF.

Comparación entre los métodos de tinción celular

Como los métodos disponen de unidades de medida diferentes, la comparación se hizo calculando los porcentajes de supervivencia de doxorubicina HCl. Los porcentajes de supervivencia se calcularon a partir de la ecuación 1.

$$\text{Porcentaje de supervivencia} = \frac{[\text{Promedio de abs/f pozos tto} - \text{Promedio de abs/f pozos blanco de tto}]}{[\text{Promedio de abs/f pozos cc} - \text{Promedio de absorbancia/fluorescencia pozos bc}]} * 100$$

Ecuación 1.

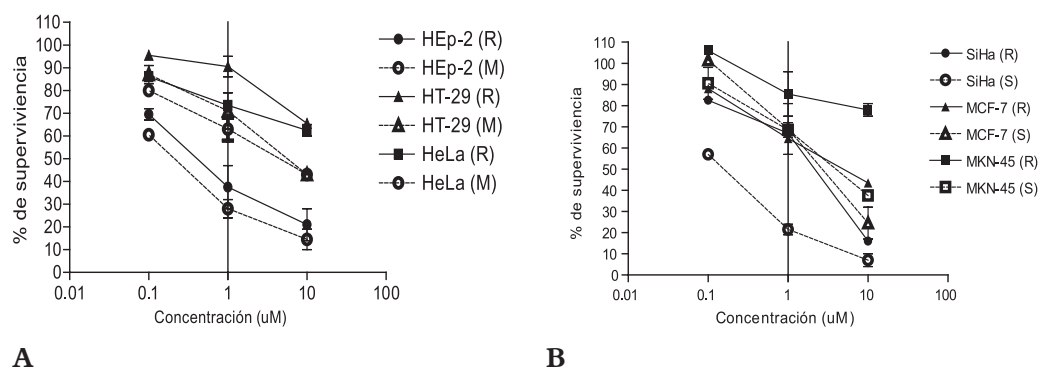


Figura 3. Porcentajes de supervivencia obtenidos al evaluar tres concentraciones de doxorubicina HCl empleando distintos métodos de tinción celular. **A.** Líneas celulares evaluadas con los métodos de MTT (M) y resazurina (R). **B.** Líneas celulares evaluadas con los métodos de SRB (S) y resazurina (R).

Donde (abs/f tto) es la absorbancia o fluorescencia promedio de pozos de tratamiento; (abs/f b) es la absorbancia o fluorescencia promedio de blancos de tratamiento; (abs/f cc) es la absorbancia o fluorescencia promedio de los pozos control de crecimiento tratados con DMSO al $0,2\%$, y, por último (abs/f bc) es la absorbancia o fluorescencia promedio del blanco de control.

En todas las líneas celulares se observó la misma tendencia de disminución en la supervivencia celular evaluando doxorubicina HCl, al leer por MTT, SRB y resazurina; sin embargo, con este último método los resultados de porcentaje de viabilidad son superiores.

Doxorubicina HCl, como medicamento ampliamente empleado en tratamientos contra el cáncer, a una concentración $10 \mu\text{M}$, tuvo efecto

citotóxico sobre las líneas celulares, valoradas por los tres métodos de tinción celular. Sin embargo, al evaluar resazurina sobre HT-29 y HeLa a esta concentración, no se observó disminución celular menor al 50% , en comparación con los resultados obtenidos al evaluar MTT, lo que puede apreciarse en la figura 3A. Así mismo, al evaluar la línea celular MKN-45 por el método de resazurina, se pudo ver que el porcentaje de supervivencia celular fue el doble del obtenido por el método de SRB, que aparece en la figura 3B.

Sobre el panel de líneas evaluadas, SiHa y HEp-2 mostraron ser más sensibles a este fármaco anti-neoplásico en las concentraciones del medicamento evaluado, lo que concuerda con lo reportado por otros autores (21).

En general, los resultados de porcentaje de supervivencia obtenidos por cualquier método de tinción celular, permiten establecer un cálculo aproximado de la CI_{50} , ya que se obtiene un valor de viabilidad inferior al 50%.

Seguidamente, para comprobar la similitud en el comportamiento de los porcentajes de supervivencia obtenidos al emplear los tres métodos, se aplicó el coeficiente de correlación de *Spearman*, que indicó el grado de correlación entre las variables. Los coeficientes fueron cercanos a uno (1), lo que indica que el grado de correlación es positivo para los diferentes métodos, y demuestra que son, igualmente, marcadores de viabilidad celular, como se indica en la tabla 1.

Al analizar los resultados de supervivencia obtenidos para cada línea celular, se observó que el grado de asociación de las variables para cada una de ellas fue cercano a 0,9; lo que expresa un ajuste lineal, con una probabilidad menor de 0,001 en los seis modelos. Por tanto, las regresiones son signi-

ficativas, tanto al comparar el método de reducción de resazurina frente a MTT y SRB, como se indica en la figura 4.

Tabla 1. Datos obtenidos del coeficiente de correlación de *Spearman* (r_s) para cada línea celular comparando los métodos de tinción.

Línea celular	Método	Coefficiente de correlación Spearman	p valor
SiHa	Resazurina vs SRB	0,928	0,008**
MCF-7	Resazurina vs SRB	0,943	0,005**
MKN-45	Resazurina vs SRB	0,886	0,019*
HEp-2	Resazurina vs MTT	0,928	0,008**
HT-29	Resazurina vs MTT	0,771	0,072
HeLa	Resazurina vs MTT	0,870	0,024*

De igual manera, los valores de porcentaje de supervivencia graficados revelan la correlación positiva de los métodos, es decir, cuando aumenta el porcentaje de supervivencia en un método, aumenta también en el otro.

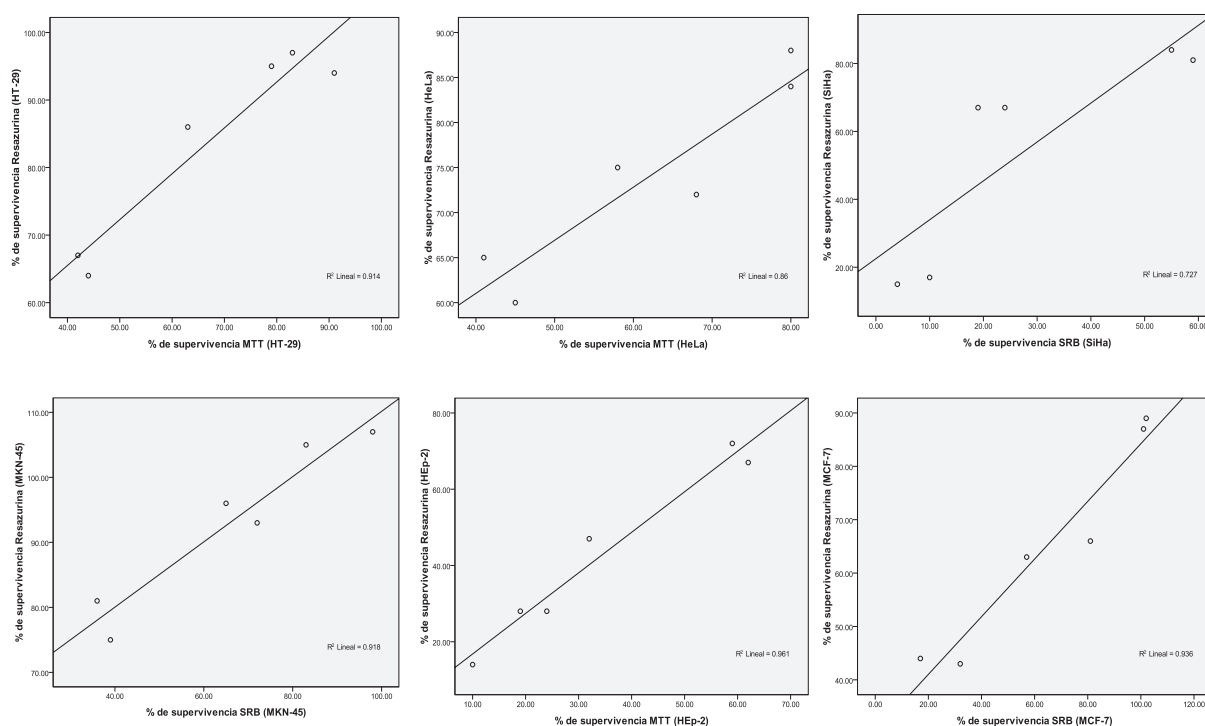


Figura 4. Correlación entre distintos métodos de tinción celular, al evaluar el potencial efecto citotóxico de doxorubicina HCl en diferentes líneas celulares derivadas de tumores sólidos.

DISCUSIÓN

En este estudio se estandarizó el método de resazurina para evaluar la proliferación celular sobre líneas tumorales de origen humano. El procedimiento para la aplicación de este método fue más simple que el usado para valorar la viabilidad celular por los métodos de reducción de MTT y la tinción con Sulforodamina B, validados en nuestro laboratorio.

La resazurina, por ser un método no destructivo, permite al investigador retirar o adicionar tratamientos sobre la misma población celular evaluada, para futuros análisis, como ensayos post tratamiento, sin necesidad de perder células (7, 11). Tampoco necesita de pre-lavados para realizar la lectura de absorbancia o fluorescencia, y no precisa una solubilización especial del producto fluorescente, pues es soluble en medio, PBS, e incluso agua.

Igualmente, la versatilidad de la resazurina como método fluorométrico y colorimétrico para identificar la viabilidad celular tiene ciertas ventajas sobre los métodos tradicionales. Primero, su fácil manejo, dado que el indicador es añadido directamente a las células en cultivo al terminar el periodo de incubación o de tratamiento y no necesita la manipulación de otros agentes por ser el producto fluorescente soluble en agua (17). Segundo, la resazurina y la resorufina ejercen muy baja toxicidad en las células, lo que permite prolongar el monitoreo de los cultivos celulares durante un tiempo de recuperación posterior al tratamiento (7). Tercero, el método no exige ningún tipo especial de manejo o la disposición de otros sistemas sofisticados de protección ya que es prácticamente inocuo y no es radioactivo. Cuarto, debido a su naturaleza homogénea, la resazurina puede ser adaptada a ensayos *in vitro* en gran escala (25).

Asimismo cabe anotar que es un método sensible que permite detectar cambios en las células con errores estándar mínimos durante largos tiempos de incubación (27).

Al evaluar resazurina como método de proliferación celular para su uso rutinario y estandarización, muchos investigadores reafirman la necesidad de caracterizar individualmente las líneas celulares, ya que cada una tiene propiedades metabólicas únicas, como presencia y expresión de citocromos, que pueden estimular la metabolización de los colorantes. También, optimizar los parámetros experimentales, tales como tiempo de incubación, la densidad celular inicial, la concentración del colorante, e incluso el modo de preparación y almacenamiento del pro-

ducto, con el fin de obtener una buena conversión de colorante oxidado a producto reducido, proceso descrito por diferentes autores (7, 11, 24, 26, 28).

Con base en los resultados obtenidos se seleccionaron como condiciones mínimas requeridas para la aplicación de resazurina como método rutinario, una concentración de 4,4 μ M por pozo y un tiempo de incubación de 4 horas, en condiciones de 37°C, 5% CO₂ y 100% de humedad, tiempo y concentración suficientes para realizar lecturas de viabilidad células óptimas como buenas respuestas medidas en URF.

Por otro lado, el efecto citotóxico observado al evaluar doxorubicina HCl en las seis líneas celulares tuvo el mismo comportamiento con los diferentes métodos de medición de viabilidad celular; sin embargo, los porcentajes de supervivencia derivados del método de resazurina fueron notablemente superiores a los obtenidos con los métodos de MTT, o SRB.

En cuanto a la comparación de los métodos de resazurina y MTT, Hamid y colaboradores afirman que las respuestas de supervivencia de ambos al evaluar el potencial efecto citotóxico de doxorubicina HCL, aunque guardan la misma asociación, no son similares, quizá por diferentes mecanismos de acción del fármaco sobre las enzimas responsables de la transformación de resazurina y de MTT, que pueden llevar a modificar los resultados (17).

Asimismo, los porcentajes de supervivencia obtenidos al evaluar el agente antineoplásico por el método de resazurina, fueron mayores que los obtenidos con SRB. Esto obedece, posiblemente, a la transformación de resazurina por células suspendidas en el medio, mientras los continuos lavados, en el método de tinción proteica con Sulforodamina B, pueden afectar la fijación celular y proteica (2, 17)

Otra posible explicación del aumento en el porcentaje de supervivencia al usar resazurina como método de viabilidad celular, comparado con SRB, es el hecho de que las células en proceso de apoptosis despliegan rutas pro y anti-apoptóticas, incrementando proteínas activamente vinculadas en procesos mitocondriales y energéticos (2), que pueden estar aumentando la transformación de resazurina a resorufina.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demuestran que cualquiera de los tres métodos, empleado en las condiciones establecidas, permite evaluar la citotoxicidad de

compuestos sobre líneas tumorales de origen humano, lo que puede ser útil en el tamizaje preliminar de promisorias sustancias con potencial citotóxico (7, 17).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paul K, Vistica D, *et al.* Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen using a diverse panel of cultured human tumour cell lines. *J Natl Cancer I.* 1991 Jun 1; 83(11): 757-766.
- Holst M, Oredsson M. Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation of the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer cell lines. *Toxicol In Vitro.* 2005 Apr; 19(3): 379-387.
- Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16; 65 (1-2): 55-63.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, *et al.* New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *J Natl Cancer I.* 1990 Jul 4; 82 (13): 1107-1112.
- Rasmussen ES. Use of fluorescent redox indicators to evaluate cell proliferation and viability. *In Vitro Mol Toxicol.* 1999; 12 (1): 47-58.
- Putnam K, Bombick D, Doolittle D. Evaluation of eight *in vitro* assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smokes condensate. *Toxicol In Vitro.* 2002 Oct; 16 (5): 599-607.
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2000 Jun 26; 267 (17): 5421-5426.
- Zhang H, Du G, Zhang J. Assay of mitochondrial functions by resazurin *in vitro*. *Acta Pharmacol Sin.* 2004 Mar; 25 (3): 385-389.
- Gonzalez R & Tarloff J. Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicol In Vitro.* 2001 Jun; 15 (3): 257-259.
- Rasmussen ES, Nicolaisen GM. Stability of resazurin in buffers and mammal cell culture media. *In Vitro Mol Toxicol.* 1999 Dec; 12 (4): 195-202.
- Pagé B, Pagé M & Noel C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. *Int J Oncol.* 1993; 3(3): 473-476.
- Bopp S & Lettieri T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacol.* 2008 May 30; 8 (8): 1-11
- Palomino J, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Ch.* 2002 Aug; 46 (8): 2720-2722.
- Rolón M, Vega C, Escario J, Gómez A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res.* 2006; 99 (2): 103-107.
- Hall LA, Denning D. Oxygen requirements of *Aspergillus* species. *J Med Microbiol.* 1994 nov; 41: 311-315.
- Tratnyek P, Reilko T, Lemon A, Scherer M, Balko B, Feik L, *et al.* Visualizing Redox Chemistry: Probing Environmental Oxidation Reduction Reactions with Indicator Dyes. *Chem Educator.* 2001 Jun; 6 (3): 172-179.
- Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high throughput screening. *Toxicol In Vitro.* 2004 Oct; 18 (5): 703-710.
- Lieberman M, Patterson G, Moore R. *In vitro* bioassays for anticancer drug screening: effects of cell concentration and other assay parameters on growth inhibitory activity. *Cancer letter.* 2001 Nov 8; 173 (1): 21-29.
- Shoemaker R. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer.* 2006 Oct; 6: 813-823.
- Freshney I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 4th Ed. England: John Wiley and Sons Inc. 2000.
- Leon CJ, Gomez SM, Morantes SJ, Cordero CP, Aristizabal FA. Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad *in vitro*. *Biomedica.* 2006 Mar; 26 (1): 161-168.
- Cordero CP, Gómez S, León CJ, Morantes SJ, Aristizabal FA. Cytotoxic activity of Compounds Isolated from Colombian Plants. *Fitoterapia.* 2004 Mar; 75 (2): 225-227.
- Cordero CP, Aristizabal FA. Evaluación preliminar *in vitro* de citotoxicidad de extractos vegetales sobre líneas derivadas de tumores humanos, empleando dos métodos colorimétricos. *Revista Colombiana de Biotecnología.* 2002; 4: 100-106.
- Magnani E, Bettini E. Resazurin detection of energy metabolism changes in serum-starved PC-12 cells and of neuroprotective agent effect. *Brain Res Protoc.* 2000 Jul; 5 (3): 266-272.
- Nakayama G, Caton M, Nova M, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in Vitro*. *J Immunol Methods.* 1997 May 26; 204 (2): 205-208.
- Anoopkumar-Duke S, Carey JB, Conere T, O'Sullivan E, van Pelt FN, Allshire A. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *Brit J Radiol.* 2005 Oct; 78 (934): 945-947.
- Nociari M, Shalev A, Benias P, Russo C. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods.* 1998 Jun; 213 (2): 157-167.
- McMillian M, Li L, Parker J, Patel L, Zhong Z, Gunnet, J, *et al.* An improved resazurina-based cytotoxicity assay for hepatic cells. *Cell Biol Toxicol.* 2002; (3) 18: 157-173.