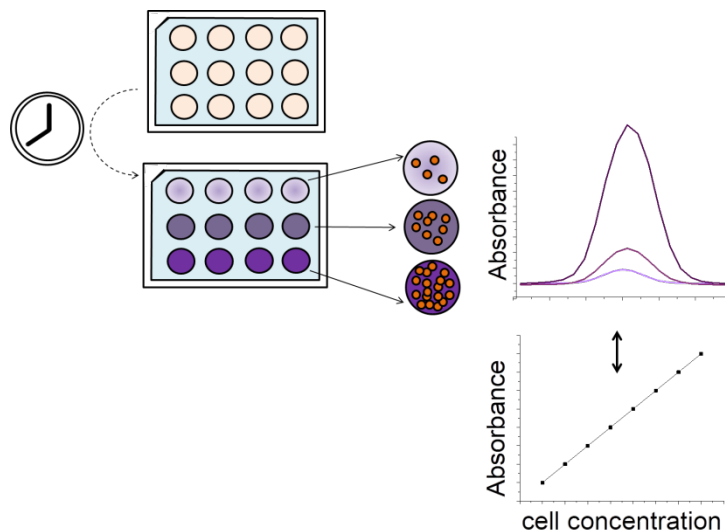


Graphical Abstract



Cell viability assay based on colorimetric methods indicates the number of healthy cells through biochemical markers as indicators of metabolically active cells

ENSAIOS COLORIMÉTRICOS PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

Emilli C. G. Frachini^a, Alex C. Alavarse^a, Jean Bezerra^b, Henning Ulrich^{b*}, Denise F. S. Petri^{a*}

^a Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-000 São Paulo-SP, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-000 São Paulo-SP, Brazil

*e-mail: dfsp@iq.usp.br, henning@iq.usp.br

COLORIMETRIC ASSAYS FOR ASSESSMENT IN VITRO CELL VIABILITY/ CYTOTOXICITY

Colorimetric assays have been often applied to determine cell viability or cytotoxicity due to fastness, reliability, and low cost. Most common assays include tetrazolium salts, lactate dehydrogenase (LDH), sulforhodamine B (SRB), crystal violet (CV), and neutral red uptake (NRU). Overall, choosing a suitable method is needed to obtain reliable results. Sometimes, different assays should be combined to achieve meaningful data. This review describes an overview of colorimetric assays and the corresponding protocols, advantages, and limitations related to cell culture on monolayer, and 3D systems.

Keywords: cell viability; colorimetric assays; cell culture; biomaterials

INTRODUÇÃO

Os ensaios de viabilidade celular são métodos utilizados para estimar a quantidade de células viáveis a partir de diversos indicadores de funções celulares, como produção de ATP, integridade da membrana plasmática, aderência celular, oxirredução de coenzimas, e atividade de captação de nucleotídeos.¹ Geralmente, esses ensaios são realizados para avaliar as células metabolicamente ativas em resposta a estímulos extracelulares,² fármacos para tratamento terapêutico,³ agentes químicos,⁴ ou a fim de otimizar as condições da cultura celular.⁵ Os ensaios de viabilidade celular podem ser classificados de acordo com o procedimento de quantificação celular: métodos colorimétricos, fluorimétricos, luminométricos, e por exclusão de corante.⁶ Os ensaios colorimétricos permitem, a partir da medida de absorbância por espectrofotometria, avaliar a quantidade de células viáveis em relação ao controle, que são as células cultivadas em placa de cultura celular convencional sem tratamento ou estímulo extracelular. A **Figura 1** mostra as estruturas químicas e os espectros de absorção na região ultravioleta/visível (UV-vis) de reagentes frequentemente utilizados em ensaios colorimétricos.

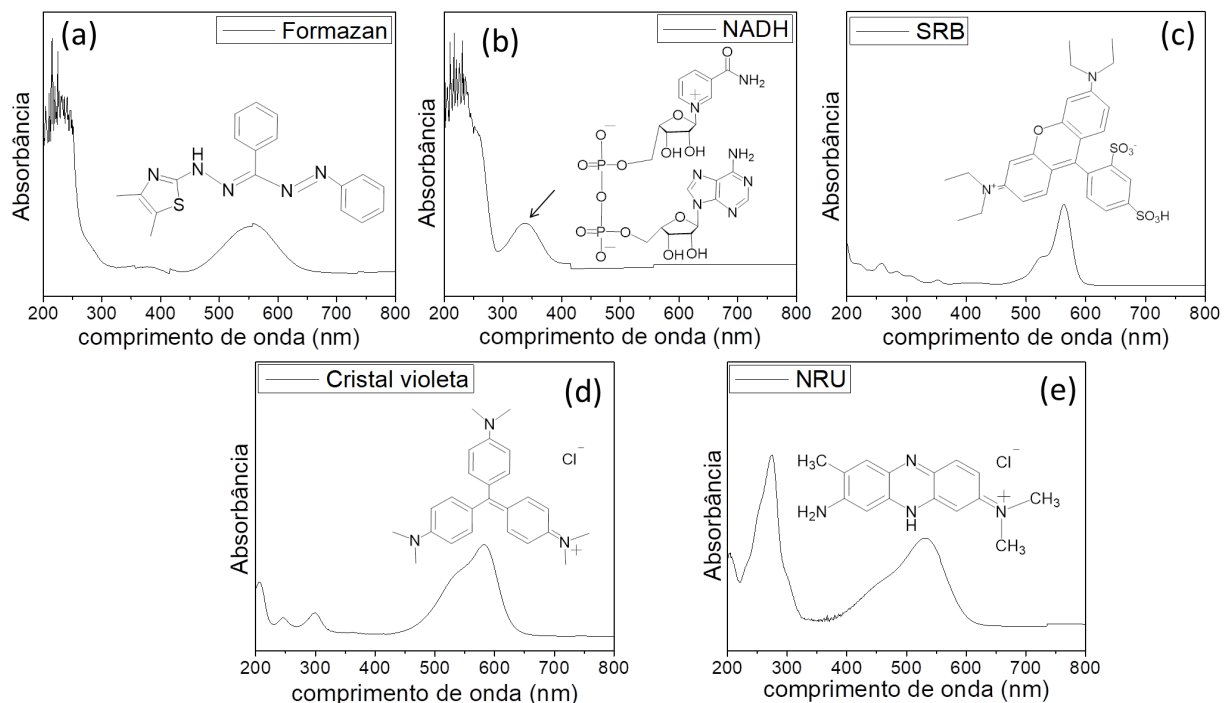


Figura 1. Estrutura química, espectros de absorção na região UV-vis (espectrofotômetro Beckman-Coulter DU650) e comprimentos de onda de absorção máxima (λ_{max}) dos compostos utilizados em ensaios colorimétricos para avaliar a viabilidade celular. (a) formazan, $\lambda_{max} = 570 \text{ nm}$, (b) NADH, $\lambda_{max} = 340 \text{ nm}$, (c) sulforodamina B (SRB), $\lambda_{max} = 565 \text{ nm}$, (d) cristal violeta, $\lambda_{max} = 570 \text{ nm}$, (e) vermelho neutro, $\lambda_{max} = 540 \text{ nm}$

Métodos colorimétricos são amplamente utilizados devido à rápida aplicação, fácil automação e baixo custo.⁷ No entanto, alguns fatores podem influenciar no sinal de absorbância^{6,7} (ver na seção “Avaliação e comparação entre métodos colorimétricos”), levando a falhas na avaliação do crescimento celular, principalmente quando as células são cultivadas em sistemas 3D.⁸ Portanto, ao escolher o método ideal, vários parâmetros devem ser considerados para que os resultados gerados sejam reprodutíveis e confiáveis.

MÉTODOS COLORIMÉTRICOS

Sais de tetrazólio

Uma variedade de sais de tetrazólio pode ser utilizada na detecção de células metabolicamente ativas com a finalidade de avaliar a viabilidade celular ou a citotoxicidade de uma dada substância ou material. Esses compostos podem ser classificados em sais catiônicos, sais aniônicos, e os sais de tetrazólio solúveis em água.^{9,10} Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) é o sal de tetrazólio mais utilizado para determinar viabilidade celular em diferentes linhagens de células. Este ensaio foi desenvolvido por Mosmann,¹¹ e é considerado um método simples, rápido e reprodutível. No entanto, o MTT é tóxico para as células, e alguns fatores influenciam no sinal de absorvância (ver seção “Avaliação e comparação entre métodos colorimétricos”).^{9,12} Este ensaio é baseado na redução do sal de tetrazólio em formazan pela oxidação de coenzimas mitocondriais (NADH e/ou FADH₂) (**Figura 2**). No entanto, ainda há especulações sobre esse mecanismo, pois algumas pesquisas mostram que o MTT pode formar depósitos em outras organelas ou em gotículas de lipídeos.^{13,14}

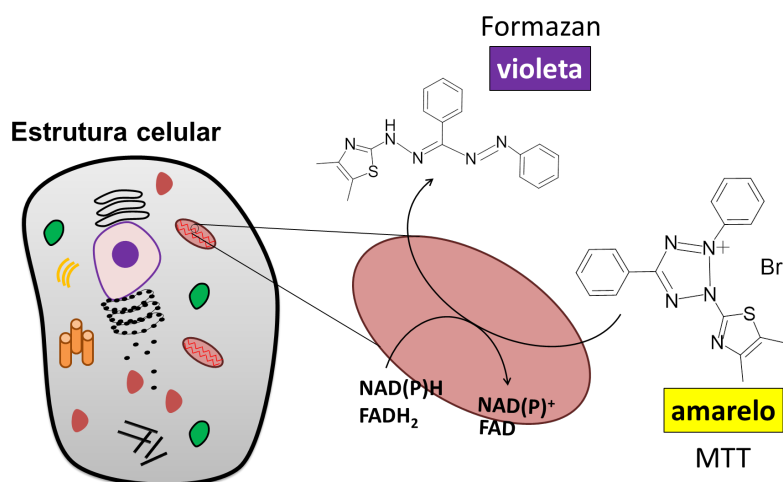


Figura 2. Reação de redução do MTT a formazan em uma célula eucariótica por enzimas mitocondriais. Nessa reação, as coenzimas NADH e FADH₂ são utilizadas como doadores de elétrons para a redução do MTT.

No ensaio de MTT, o sal de tetrazólio amarelo é solubilizado em água destilada ou tampão fosfato-salino pH 7,4 (PBS), na concentração de 5,0 mg/mL. Em seguida, pode ser filtrado em membrana

de 0,22 µM, armazenado a -20 °C e protegido da luz.⁷ Essa solução é adicionada à cultura celular na concentração final de 0,2-0,5 mg/mL, e incubada a 37 °C por 1-4 h.^{5,7,9} Nessa etapa, ocorrem as reações de redução do MTT a formazan e de oxidação de NADH a NAD⁺. Quanto maior o número de células metabolicamente ativas, maior a oxidação de NADH a NAD⁺ e, portanto, maior a formação de formazan. Posteriormente, o meio contendo MTT é removido e DMSO é adicionado para solubilizar os cristais, já que o formazan é um sal violeta insolúvel em água. A absorbância da solução é medida em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm (**Figura 1a**).¹⁵ O número de células viáveis é considerado diretamente proporcional à atividade metabólica das células e, conseqüentemente, à intensidade de absorbância medida. A porcentagem de células viáveis em relação ao controle pode ser calculada a partir dos valores de absorbância referente às células expostas ao tratamento (Am) e as células controle (Act), sem tratamento, após subtração da absorbância do meio de cultivo livre de células (branco-Ab), como indicado na Eq. (1):

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \left[\frac{Am - Ab}{Act - Ab} \right] \times 100 \quad (1)$$

Lactato desidrogenase (LDH)

A citotoxicidade de um composto também pode ser avaliada pela quantificação de células mortas a partir da atividade enzimática do LDH. Esta enzima, presente no citoplasma de células eucarióticas, é liberada para o meio de cultivo quando a integridade da membrana plasmática celular é comprometida. A função catalítica da LDH é fundamental para as reações reversíveis do piruvato/lactato e NADH/NAD⁺, como exemplificado na reação da **Figura 3**.^{16,17}

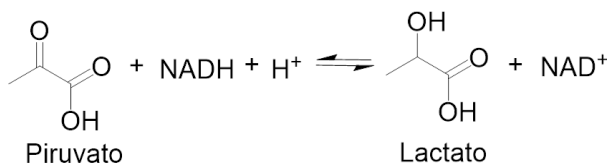


Figura 3. Reação reversível entre piruvato/lactato e NADH/NAD⁺ catalisada pela enzima LDH.¹⁶

O reagente de trabalho desse ensaio é comercializado na forma de duas soluções: reagente 1 (R1) que contém NADH, e o reagente (R2) que contém uma solução tampão, pH 7,5, suplementado com piruvato de sódio e azida sódica. A solução de trabalho é preparada previamente a partir da mistura do R1 com R2 na proporção de 4:1 (v/v). Após a morte celular as células se destacam da placa de

cultura. Em seguida, a solução de trabalho é misturada apenas no meio de cultura contendo células mortas. Nesse momento, o piruvato sofre uma reação de redução e convertido à lactato, enquanto NADH é oxidado a NAD^+ . Dessa maneira, é possível estimar a atividade de LDH a partir da medida de absorvância em 340 nm, absorvância máxima do NADH (**Figura 1b**).¹⁸ A taxa de conversão de NADH para NAD^+ é diretamente proporcional à atividade de LDH no meio de cultura e, conseqüentemente, à morte celular. Na presença da enzima LDH a formação de NAD^+ é acentuada em até 14 vezes, dessa forma, variações no tempo de incubação podem acarretar em grande variabilidade e aumentar o erro experimental entre as amostras.¹⁹ Isso indica que o equilíbrio NADH/ NAD^+ é alcançado rapidamente, e não é recomendável a leitura de sua absorvância. Como alternativa para uma análise assertiva, o processo NADH \rightarrow NAD^+ pode ser explorado adicionando a atividade da enzima diaforase.²⁰ A enzima diaforase transfere H/H^+ a partir do NADH/ H^+ para um sal de tetrazólio presente na solução a ser reduzido a formazan.⁶ Nesses casos, a solução do ensaio é composta por NAD^+ , ácido láctico e um sal de tetrazólio, como por exemplo, o iodonitrotetrazólio (INT).¹⁷ O meio de cultura que contém o LDH liberado na morte celular é transferido para outra placa e a solução do ensaio é misturada com o meio de cultivo. A placa é incubada por 15-30 min em 37 °C e protegida da luz. Em seguida, uma solução contendo dimetilformamida/SDS é adicionada. A absorvância pode ser medida em aproximadamente 490 nm após 1 h.²¹ Uma vez que a reação é reversível, o excesso de lactato e NAD^+ no meio de cultura gera piruvato e NADH (ver **Figura 3**).²² Dessa maneira, o NADH sofre oxidação para NAD^+ , e reduz o INT a formazan (**Figura 4**), que por sua vez tem absorvância máxima em 490 nm. O aumento da absorvância indica maior quantidade de LDH liberada para o meio de cultura, logo é diretamente proporcional a morte celular.¹⁷

É importante obter um parâmetro da atividade máxima da LDH, ou seja, obter um controle positivo (Act_p), no qual todas as células estejam mortas, e também um controle negativo (Act_n). No controle negativo a solução de ensaio é adicionada ao meio de cultura livre de células vivas ou mortas.²² Nesse caso, a citotoxicidade pode ser calculada a partir da Eq.(2):

$$\text{Citotoxicidade (\%)} = \left[\frac{A_m - \text{Act}_n}{\text{Act}_p - \text{Act}_n} \right] \times 100 \quad (2)$$

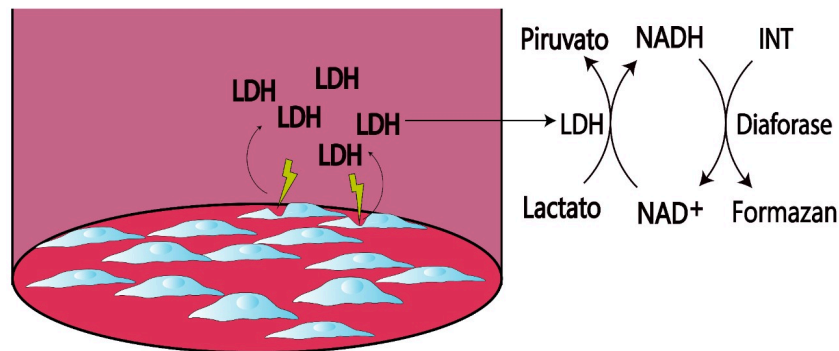


Figura 4. Mecanismo para avaliação da citotoxicidade utilizando o ensaio de LDH. A enzima LDH converte lactato em piruvato, além de reduzir a coenzima NAD⁺. O NADH sofre oxidação formando NAD⁺, enquanto o INT é reduzido a formazan

Kits comerciais já contêm a solução de NADH, lactato e diaforase combinados com diferentes sais tetrazólio como CyQUANT™ (ThermoFisher) que usa o INT e o LDH-Cytox™ (BioLegend) que contém o sal de tetrazólio solúvel em água (WST-1), sendo quantificados por espectrofotometria em $\lambda = 490 \text{ nm}$ e 438 nm , respectivamente. Além disso, marcadores bioluminescentes como no caso do kit LDH-Glo™ (Promega) podem ser analisados por meio de espectrofluorímetro (Ex/Em = $535/587 \text{ nm}$) que gera luz por meio da oxidação da luciferina à oxiluciferina na presença de oxigênio, ATP e luciferase.

Sulforodamina B (SRB)

A SRB é um corante solúvel em água de cor avermelhada (excitação/emissão máxima a $565/586 \text{ nm}$) e pode ser utilizado para estimar a citotoxicidade de substâncias em ensaios com células aderentes. A SRB é uma molécula composta por três anéis (xanteno) ligados a dois grupos dietilaminas e um anel di-hidroxosulfônico. Possui uma alta afinidade por interação eletrostática com aminoácidos catiônicos (histidina, arginina e lisina) sob condições ácidas moderadas. Desde a década de 1990, estudos têm sido reportados adotando como protocolo de viabilidade celular a quantificação da SRB em contato com amino ácidos residuais de células aderentes saudáveis²³⁻²⁵ e cancerosas.²⁶⁻²⁸ Para que isso ocorra, após o tempo de incubação, as células devem ser fixadas e os amino ácidos catiônicos devem estar com carga superficial positiva. Esta forte interação permite que todo o excesso de SRB seja descartado, remanescendo somente uma quantidade proporcional à

quantidade de proteínas ligantes, que é proporcional ao número de células viáveis. A **Figura 5** exemplifica essa interação da SRB e amino ácidos residuais a um pH moderadamente ácido.

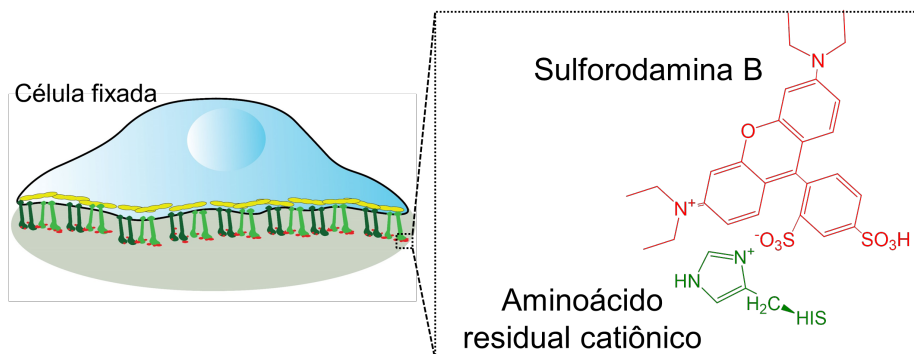


Figura 5. Viabilidade celular avaliada indiretamente pela interação de aminoácidos residuais (derivadas de integrinas) e SRB. Em condições ácidas, a interação eletrostática entre o grupo protonado imidazol da histidina e aniônico sulfônico da SRB garante sua retenção

De uma forma geral, o ensaio pela SRB é relativamente rápido e pode ser feito com poucas etapas. Após o tempo de incubação, retira-se o meio de cultivo dos poços e substitui-se por solução de ácido tricloroacético (TCA) 10 % (wt/v). Assim, ocorre a precipitação das proteínas celulares a partir da interação eletrostática entre os íons tricloroacetato e as amins primárias protonadas. Após 1 h de reação, as células se mantêm fixadas e a solução de SRB é adicionada. O corante SRB adicionado nas células é previamente solubilizado em ácido acético; neste meio, SRB está negativamente carregada, pois o pKa da SRB é 2,1.²⁹ Após 0,5 h de reação, os poços são lavados novamente com solução de ácido acético 1 % (v/v) (cerca de 6x) para que todo o excesso da SRB seja retirado. Em seguida, adiciona-se uma solução tris(hidroximetil)aminometano (tris), em pH 10,5 para que o todo o corante SRB ligado aos aminoácidos das células seja liberado na solução. Embora a absorvância máxima da SRB seja em 565 nm (**Figura 1c**), o ensaio é realizado em comprimento de onda de 510 nm, porque a melhor linearidade de absorvância em função de concentração está entre 490-530 nm.^{26,30} O número de células saudáveis é diretamente proporcional à quantidade de SRB extraída, e a porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle pode ser calculada a partir da Eq.(1). Vale ressaltar que, a absorvância da SRB não é afetada pela variação de pH do meio.³¹

Cristal violeta (CV)

O cristal violeta (CV), ou violeta genciana, é um corante com propriedade antibacteriana, antifúngica e antitumoral.³² Além disso, o CV tem um papel muito importante na pesquisa biomédica, já que é utilizado para coloração de Gram,³³ e quantificação de células aderentes por meio da marcação de DNA.³⁴ O CV é capaz de interagir com superfícies negativas das proteínas em meio de cultura,^{35,36} uma vez que o CV ($pK_{a1}= 5,3$ e $pK_{a2}=8,64$)³⁷ está positivamente carregado quando dissolvido em água/metanol (pH da solução de CV em água/metanol é 3,15). O ensaio de CV para avaliar a citotoxicidade de fármacos foi reportado pela primeira vez por Saotome e colaboradores.³⁸ Primeiramente, as células plaqueadas são tratadas com agente químico de interesse. Após o tempo de incubação, o meio de cultura é removido, e as células mortas destacadas da placa de cultura são removidas ao realizar etapas de lavagem. Então, o CV solubilizado em água/metanol é adicionado em concentração de aproximadamente 0,5 % para interagir com as proteínas e DNA das células saudáveis remanescentes. As células são mantidas em contato com o CV em temperatura ambiente por aproximadamente 20 min. Em seguida, a solução de CV é removida, e os poços são lavados com água Milli-Q. O corante que ficou ligado ao DNA das células é solubilizado por uma solução de metanol; a absorbância da solução pode ser medida em um espectrofotômetro em aproximadamente 570 nm (**Figura 1d**).⁷ Finalmente, a viabilidade celular pode ser avaliada pela Eq.(1), a partir das medidas referentes às células que foram tratadas (A_m) e as sem tratamento ($-Act$). O aumento no valor da absorbância dos poços onde houve tratamento com algum agente químico ou estímulo extracelular indica maior número de células viáveis em relação ao controle. A coloração de células com CV é considerada um ensaio rápido, simples e reprodutível para avaliar a citotoxicidade celular *in vitro*. No entanto, deve-se ter cautela, pois as etapas de lavagem podem remover algumas células viáveis.

Absorção de vermelho neutro (neutral red uptake-NRU)

O vermelho neutro (3-amino-7-dimethylamino-2-methyl-phenazine hydrochloride) é um corante catiônico fraco capaz de penetrar nas membranas de células saudáveis por difusão passiva não iônica e se acumular nos lisossomos. Ao passar pela membrana do lisossomo, o corante fica carregado positivamente já que o pK_a do vermelho neutro ($pK_a = 6,8$) é maior que o pH do lisossomo (pH 4,8), e fica preso dentro dessa organela.⁶ Esse ensaio foi desenvolvido por

Borenfreund e Puerner, ³⁹ e desde então tem sido aplicado em diversas áreas da pesquisa biomédica.^{40,41} No ensaio de NRU, as células plaqueadas e tratadas são incubadas com o vermelho neutro na concentração de aproximadamente 25-40 µg/mL, por 2-4 h. Em seguida, o corante é removido, e as células são lavadas cuidadosamente com PBS. O corante que ficou concentrado no lisossomo é solubilizado com uma solução de descoloração (50 % de etanol, 49 % de água, e 1 % de ácido acético glacial) em agitação constante protegido da luz. Após 1 h, as soluções são conduzidas a um espectrofotômetro ou leitor de placas para medida da absorbância máxima do vermelho neutro em 540 nm (**Figura 1e**).^{7,42} A viabilidade celular é diretamente proporcional à quantidade de vermelho neutro extraído das células, portanto proporcional à medida de absorbância. O cálculo pode ser realizado a partir da Eq.(1). Embora o NRU seja menos utilizado que outros ensaios colorimétricos discutidos aqui, como o MTT, esse ensaio é mais econômico,⁴³ apresenta menos limitações relacionadas à agentes químicos, como compostos de cobre,⁴⁴ e pode ser utilizado em ensaios sob condições ácidas.⁴⁵ No entanto, existem algumas limitações quanto ao uso de substâncias voláteis, instáveis e com baixa solubilidade.⁴³

AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS COLORIMÉTRICOS

Encontrar o método ideal que atenda às suas necessidades às vezes pode ser uma tarefa desafiadora. Fatores como a linhagem celular, densidade celular, ponto final da reação, a dosagem dos reagentes, limitações das substâncias químicas, sensibilidade de detecção do método, e a facilidade de manipulação devem ser avaliados.^{6,46} Apesar do ensaio de MTT ser popularmente utilizado, algumas vezes não é recomendado. Śliwka e colaboradores observaram que o ensaio de CV é mais confiável que o ensaio de MTT para avaliar a viabilidade na linhagem celular HT-29 expostas a dois agentes anticancerígenos.⁴⁷ O ensaio de citotoxicidade de nanopartículas (NP) também deve ser cuidadosamente escolhido já que algumas NP apresentam atividade óptica. A presença de NP de negro de fumo reduziu significativamente o sinal de absorbância dos ensaios de MTT e CV na avaliação de citotoxicidade em HaCaT.⁴⁸ Compostos naturais como kaempferol, resveratrol, e alguns antioxidantes também podem interferir na medida de absorbância do ensaio de MTT.⁴⁹ Por outro lado, Fotakis e Timbrell⁵⁰ reportaram que o ensaio de MTT e NRU parecem ter mais sensibilidade do que o ensaio de LDH na avaliação da citotoxicidade de HTC e HepG2 expostas à

CdCl₂. Já Bacanlı e colaboradores⁵¹ relatam que não há diferença entre os resultados obtidos na viabilidade de células V79, HeLa e BT-474 por meio dos métodos NRU e MTT. Vajrabhaya e Korsuwannawong⁵² indicaram que os ensaios SRB e MTT geraram dados similares para avaliar a citotoxicidade da planta *Clinacanthus nutans* em linhagem L929. Além da cultura celular em monocamada, o crescimento celular também pode ser realizado em scaffolds tridimensionais (3D). Biomateriais provenientes de polissacarídeos e proteínas são amplamente utilizados no campo da medicina regenerativa a fim de mimetizar a organização *in vivo*.⁵³ Ensaios de MTT e LDH foram efetivos para medir a viabilidade em células hepáticas HepG2 encapsuladas em matrizes de alginato⁵⁴ e células-tronco mesenquimais humanas (hADSCs) em hidrogel de quitosana.⁵⁵ Debnath e colaboradores⁵⁵ reportaram que a atividade metabólica de células-tronco mesenquimais cultivadas em hidrogel aumentou mais que 100 % após 4 dias de cultivo. Ensaios de CV, NRU, e SRB também foram utilizados para avaliar a viabilidade celular de células-tronco mesenquimais da medula óssea de rato (BMSC)⁵⁶, fibroblastos de camundongo L929⁵⁷, e fibroblastos dérmicos humanos NHDF⁵⁸, respectivamente, cultivadas em hidrogéis. A **Tabela 1** apresenta biomateriais utilizados como suportes para proliferação celular e como carreador de fármacos, e o tipo de ensaio colorimétrico utilizado. No entanto, a complexidade dos suportes pode apresentar um desafio adicional no design experimental. Há um risco ao aplicar tais métodos colorimétricos, pois os ensaios em sistemas 2D podem não funcionar igualmente para ensaios em 3D.⁵⁹ Fatores como a densidade celular, volume do meio, tempo de exposição ao tratamento, dosagem dos reagentes devem ser otimizados e padronizados na presença do sistema 3D.⁶⁰

Tabela 1. Métodos colorimétricos (MC) utilizados para avaliar a viabilidade celular e citotoxicidade em hidrogéis sintetizados para aplicações biomédicas.

| Biomaterial | Linhagem celular | MC | Aplicação | Ref. |
|------------------------------|---|---------|--|------|
| Quitosana (Quit) | células-tronco hADSCs | MTT/LDH | Regeneração tecidual | 55 |
| Quit/AuNPs | Células epidérmicas (CCD 1106 KERTr) | XTT/MTT | Antibacteriana; Entrega de fármacos | 61 |
| Quit/Gelatina/vidro bioativo | células-tronco BMSC | CV | Regeneração tecidual | 56 |
| Colágeno/Quit | Fibroblastos MEF/HSF | XTT/CV | Suporte celular | 62 |

| | | | | |
|---------------------------------------|--------------------------|-----|--------------------------------------|----|
| Quit/alginato | Fibroblastos L929 | NRU | Proliferação celular | 40 |
| N-trimetil Quit/ carboximetil xantana | Células de pulmão (Wi38) | NRU | Liberação de fármaco; antibacteriana | 41 |
| Carboximetilamido/PVA/Ag | Fibroblastos NHDF | SRB | Antibacterianos | 58 |

CONCLUSÃO

Os ensaios colorimétricos são amplamente aplicados em diferentes áreas da pesquisa biomédica. No entanto, é um desafio escolher o método ideal que atenda as necessidades de cada design experimental. Apesar das vantagens como agilidade, baixo custo e facilidade de aplicação, apenas o uso de ensaios colorimétricos não é suficiente para determinar o crescimento celular, pois erros potenciais podem ocorrer, principalmente em culturas 3D.⁸ A viabilidade celular em sistemas 3D deve ser avaliada em combinação de diversos protocolos como atividade metabólica, integridade da membrana celular, e técnicas fluorescentes a fim de obter resultados confiáveis.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio financeiro do CNPq (306848/2017, 421014/2018-0 e 306392/2017-8), FAPESP (2018/13492- 2, 2020/01907-3, 2018/08426-0 e 2018/07366-4) e CAPES (Código 001).

REFERÊNCIAS

1. Thangaraj, P.; In *Pharmacological Assays of Plant-Based Natural Products*; Rainsford, K. D., Ed.; 2016; Vol. 71, p. 188.
2. Sola-Leyva, A.; Jabalera, Y.; Chico-Lozano, M. A.; Carrasco-Jiménez, M. P.; Iglesias, G. R.; Jimenez-Lopez, C.; *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 7667.
3. Gomathi, A. C.; Xavier Rajarathinam, S. R.; Mohammed Sadiq, A.; Rajeshkumar, S.; *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *55*, 101376.
4. Omaiye, E. E.; McWhirter, K. J.; Luo, W.; Pankow, J. F.; Talbot, P.; *Chem. Res. Toxicol.* **2019**, *32*, 1058.
5. Nga, N. T. H.; Ngoc, T. T. B.; Trinh, N. T. M.; Thuoc, T. L.; Thao, D. T. P.; *Anal. Biochem.* **2020**, *610*, 113937.
6. Aslantürk, Ö. S.; In *Genotoxicity-A predictable risk to our actual world*; Larramendy, M. L.; Soloneski, S., Eds.; 2018; Vol. 2, pp. 64–80.
7. Kamiloglu, S.; Sari, G.; Ozdal, T.; Capanoglu, E.; *Food Front.* **2020**, *1*, 332.

8. Dominijanni, A. J.; Devarasetty, M.; Forsythe, S. D.; Votanopoulos, K. I.; Soker, S.; *Tissue Eng. Part C Methods* **2021**, *27*, 401.
9. Glicksman, M.; Li, Z.; Markossian, S.; Riss, T.; Sittampalam, G. S.; O. Joseph Trask, J.; Wang, Y.; In *Assay Guidance Manual*; Caaveiro, J. M. M.; Kahl, S. D.; Kirshner, S.; Minor, L.; Lemmon, V.; Napper, A.; Peltier, J. M.; Nelsen, H.; Gal-Edd, N., Eds.; 2004; pp. 315–883.
10. Stoddart, M. J.; In *Mammalian cell viability: methods and protocols, Methods in Molecular Biology*; Stoddart, M. J., Ed.; 2011; Vol. 740, pp. 1–6.
11. Mosmann, T.; *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.
12. Moradi, M.; *Helix* **2018**, *8*, 3274.
13. Bernas, T.; Dobrucki, J.; *Cytom. J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **2002**, *47*, 236.
14. Stockert, J. C.; Blázquez-Castro, A.; Cañete, M.; Horobin, R. W.; Villanueva, Á.; *Acta Histochem.* **2012**, *114*, 785.
15. Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P. D.; *Cold Spring Harb. Protoc.* **2018**, *2018*, 469.
16. Jähn, K.; Stoddart, M. J.; In *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*; Stoddart, M. J., Ed.; 2011; pp. 141–148.
17. Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P. D.; *Cold Spring Harb. Protoc.* **2018**, *2018*, 465.
18. Labtest Diagnóstica S. A.; LDH Liquiform. Instruções de Uso **2013**, 1–6.
19. Burgner, J. W.; Ray, W. J.; *Biochemistry* **1984**, *23*, 3636.
20. Decker, T.; Lohmann-Matthes, M. L.; *J. Immunol. Methods* **1988**, *115*, 61.
21. Roche Diagnostics; Cytotoxicity Detection Kit (LDH). *sigma-aldrich* **2016**, *11*, 1–20.
22. Riss, T.; Niles, A.; Moravec, R.; Karassina, N.; Vidugiriene, J.; In *Assay Guidance Manual*; Caaveiro, J. M. M.; Kahl, S. D.; Kirshner, S.; Minor, L.; Lemmon, V.; Napper, A.; Peltier, J. M.; Nelsen, H.; Gal-Edd, N., Eds.; 2004; pp. 343–357.
23. Papazisis, K. T.; Geromichalos, G. D.; Dimitriadis, K. A.; Kortsaris, A. H.; *J. Immunol. Methods* **1997**, *208*, 151.
24. Sagias, F. G.; Mitry, R. R.; Hughes, R. D.; Lehec, S. C.; Patel, A. G.; Rela, M.; Mieli-Vergani, G.; Heaton, N. D.; Dhawan, A.; *Cell Transplant.* **2010**, *19*, 1487.
25. Elashry, M. I.; Baulig, N.; Heimann, M.; Bernhardt, C.; Wenisch, S.; Arnhold, S.; *Res. Vet. Sci.* **2018**, *117*, 45.

26. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R.; *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107.
27. Banasiak, D.; Barnetson, A. R.; Odell, R. A.; Mameghan, H.; Russell, P. J.; *Radiat. Oncol. Investig. Clin. Basic Res.* **1999**, *7*, 77.
28. Lin, W.; Xu, Y.; Huang, C. C.; Ma, Y.; Shannon, K. B.; Chen, D. R.; Huang, Y. W.; *J. Nanoparticle Res.* **2009**, *11*, 25.
29. Ghimire, G.; Espinoza, R.; Xu, H.; Nagasaka, S.; Kameta, N.; Masuda, M.; Higgins, D. A.; Ito, T.; *Langmuir* **2019**, *35*, 7783.
30. Vichai, V.; Kirtikara, K.; *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112.
31. Hornig, S.; Biskup, C.; Gräfe, A.; Wotschadlo, J.; Liebert, T.; Mohr, G. J.; Heinze, T.; *Soft Matter* **2008**, *4*, 1169.
32. Maley, A. M.; Arbiser, J. L.; *Exp. Dermatol.* **2013**, *22*, 775.
33. Coico, R.; *Curr. Protoc. Microbiol.* **2005**, *1*, 3.
34. Feoktistova, M.; Geserick, P.; Leverkus, M.; *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, *2016*, 343.
35. Bonnekoh, B.; Wevers, A.; Jugert, F.; Merk, H.; Mahrle, G.; *Arch. Dermatol. Res.* **1989**, *281*, 487.
36. Santhanalakshmi, J.; Balaji, S.; *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2001**, *186*, 173.
37. Abdi, M.; Balagabri, M.; Karimi, H.; Hossini, H.; Rastegar, S. O.; *Appl. Water Sci.* **2020**, *10*, 1.
38. Saotome, K.; Morita, H.; Umeda, M.; *Toxicol. Vitro.* **1989**, *3*, 317.
39. Borenfreund, E.; Puerner, J. A.; *J. Tissue Cult. Methods* **1985**, *9*, 7.
40. Baysal, K.; Aroguz, A. Z.; Adiguzel, Z.; Baysal, B. M.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *59*, 342.
41. Hanna, D. H.; Saad, G. R.; *Bioorg. Chem.* **2019**, *84*, 115.
42. Ates, G.; Vanhaecke, T.; Rogiers, V.; Rodrigues, R. M.; In *Cell Viability Assays: methods and protocols. Methods in Molecular Biolog*; Gilbert, D. F.; Friedrich, O., Eds.; Humana Press, 2017; Vol. 1601, pp. 19–26.
43. Repetto, G.; del Peso, A.; Zurita, J. L.; *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1125.
44. Gomez Perez, M.; Fourcade, L.; Mateescu, M. A.; Paquin, J.; *Anal. Biochem.* **2017**, *535*, 43.
45. Gomez-Gutierrez, J. G.; Bhutiani, N.; McNally, M. W.; Chuong, P.; Yin, W.; Jones, M. A.;

- Zeiderman, M. R.; Grizzle, W. E.; McNally, L. R.; *Biotech. Histochem.* **2021**, *96*, 302.
46. Riss, T.; O'Brien, M.; Moravec, R.; *Cell Notes* **2003**, *6*, 6.
47. Śliwka, L.; Wiktorska, K.; Suchocki, P.; Milczarek, M.; Mielczarek, S.; Lubelska, K.; Cierpiął, T.; Łyzwa, P.; Kiełbasiński, P.; Jaromin, A.; Flis, A.; Chilmonczyk, Z.; *PLoS One* **2016**, *11*, 1.
48. Almutary, A.; Sanderson, B. J. S.; *Int. J. Toxicol.* **2016**, *35*, 454.
49. Bruggisser, R.; Von Daeniken, K.; Jundt, G.; Schaffner, W.; Tullberg-Reinert, H.; *Planta Med.* **2002**, *68*, 445.
50. Fotakis, G.; Timbrell, J. A.; *Toxicol. Lett.* **2006**, *160*, 171.
51. Bacanlı, M.; Anlar, H. G.; Başaran, A. A.; Başaran, N.; *Turkish J. Pharm. Sci.* **2017**, *14*, 95.
52. Vajrabhaya, L. ongthong; Korsuwannawong, S.; *J. Anal. Sci. Technol.* **2018**, *9*, 1.
53. Loh, Q. L.; Choong, C.; *Tissue Eng. - Part B Rev.* **2013**, *19*, 485.
54. Khattak, S. F.; Spataro, M.; Roberts, L.; Roberts, S. C.; *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 1361.
55. Debnath, T.; Ghosh, S.; Potlapuvu, U. S.; Kona, L.; Kamaraju, S. R.; Sarkar, S.; Gaddam, S.; Chelluri, L. K.; *PLoS One* **2015**, *10*, 1.
56. Moreira, C. D. F.; Carvalho, S. M.; Florentino, R. M.; França, A.; Okano, B. S.; Rezende, C. M. F.; Mansur, H. S.; Pereira, M. M.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *132*, 811.
57. Aroguz, A. Z.; Baysal, K.; Adiguzel, Z.; Baysal, B. M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, *173*, 433.
58. Ounkaew, A.; Kasemsiri, P.; Jetsrisuparb, K.; Uyama, H.; Hsu, Y. I.; Boonmars, T.; Artchayasawat, A.; Knijnenburg, J. T. N.; Chindaprasirt, P.; *Carbohydr. Polym.* **2020**, *248*, 116767.
59. Ruoff, M.; Kieber, V.; Rebholz, S.; Linnemann, C.; Rinderknecht, H.; Häussling, V.; Häcker, M.; Damink, L. H. H. O.; Ehnert, S.; Nussler, A. K.; *Methods Protoc.* **2020**, *3*, 1.
60. Zoetemelk, M.; Rausch, M.; Colin, D. J.; Dormond, O.; Nowak-Sliwinska, P.; *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1.
61. Tyliszczak, B.; Drabczyk, A.; Kudłacik-Kramarczyk, S.; Bialik-Wąs, K.; Sobczak-Kupiec, A.; *J. Polym. Res.* **2017**, *24*, 1.
62. Fiejdasz, S.; Horak, W.; Lewandowska-Łańcucka, J.; Szuwarzyński, M.; Salwiński, J.; Nowakowska, M.; *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *524*, 102.