

Editora Dra. Gislaine Fongaro

TENDÊNCIAS BIOTECNOLÓGICAS SUSTENTÁVEIS PARA FINS DE SAÚDE ÚNICA

**PROSPECÇÃO DE
MOLÉCULAS BIOATIVAS**

**PATÓGENOS VIRAIS
E PARASITÁRIOS**

**CULTIVO CELULAR
*IN VITRO***

CITOTOXICIDADE

**INTELIGÊNCIA
ARTIFICIAL**



Ensaio de citotoxicidade *in vitro* como alternativa ao uso de animais no desenvolvimento biotecnológico de produtos

DOI: 10.56041/9786599841859-4

GUTERRES, Iara Zanella*

Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<https://orcid.org/0000-0002-12433765>

DAI PRÁ, Isabella*

Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<https://orcid.org/0000-0001-6039-2534>

BAUER, Yasmim Guterres

Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<https://orcid.org/0000-00033296-6419>

CORREA, Giovana Sequinel

Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<http://orcid.org/0000-0003-2939-8094>

DALLEPIANE, Felipe Gomes

Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<http://orcid.org/0000-0001-9677-9984>

SEDREZ, Maria Eduarda

Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<https://orcid.org/0000-0002-6573-1651>

SCHULTE, Luise Gauer

Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<https://orcid.org/0000-0001-8308-6337>

SORDI, Mariane Beatriz

Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<https://orcid.org/0000-0001-7873-0765>

CRUZ, Ariadne Cristiane Cabral**

Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Departamento de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<http://orcid.org/0000-0001-7306-4708>

SILVA, Izabella Thaís

Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<https://orcid.org/0000-0002-1893-4317>

* As autoras contribuíram igualmente para a execução do trabalho.

** Autor Correspondente: ariadne.cruz@ufsc.br

RESUMO

Muitos experimentos *in vitro* podem ser conduzidos para determinar a inocuidade de substâncias e biomateriais para serem empregados como agentes terapêuticos e cosméticos, lembrando que estes idealmente não podem apresentar citotoxicidade para desempenharem suas funções no organismo humano. Assim, novos fármacos, cosméticos, aditivos alimentares e biomateriais devem ter seu efeito citotóxico testado antes de serem liberados para uso humano. Historicamente, estes testes incluíam um grande número de experimentação em animais; porém, atualmente há vários métodos alternativos elaborados pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) que foram reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil. Adicionalmente, a comunidade científica internacional continua se esforçando para seguir o princípio dos 3Rs em relação ao uso de animais, ao mesmo tempo que instituições públicas e privadas vêm alocando recursos humanos e financeiros para desenvolver novas metodologias *in vitro*. Deste modo, no presente capítulo serão abordados os principais métodos destinados à avaliação de citotoxicidade *in vitro*. Acredita-se que a adoção destes métodos alternativos possa contribuir para a aceleração do processo de avaliação de novos produtos, com potencial redução de tempo e de custos para que sejam colocados à disposição da população.

Palavras-Chave: Biocompatibilidade; Ensaios *in vitro*; ISO 10993; 3Rs; Biotecnologia

INTRODUÇÃO

A avaliação da citotoxicidade é um passo crucial no desenvolvimento biotecnológico de produtos, sendo essencial para garantir a segurança e eficácia de novas formulações. O desenvolvimento de novos fármacos, cosméticos e biomateriais é um processo complexo que demanda uma série de avaliações rigorosas para obter a aprovação regulatória. Dentro deste contexto, os ensaios de citotoxicidade *in vitro* emergem como uma técnica de suma importância. Estes ensaios são empregados para a detecção de potenciais efeitos tóxicos, tendo como objetivo primordial a avaliação da segurança dos produtos em questão, em uma fase inicial do processo de desenvolvimento. Além disso, eles desempenham um papel crucial na antecipação e mitigação de potenciais riscos à saúde dos indivíduos, ao mesmo tempo em que asseguram a eficácia destes produtos (Jiang et al., 2022).

Em 1959, William Russel e Rex Bursch publicaram *The Principles of Humane Experimental Technique*, e, a partir desta publicação, surge o princípio dos 3Rs do inglês Reduction, Refinement e Replacement, o qual visa a proteção do uso de animais na pesquisa científica e nas diferentes etapas de desenvolvimento de produtos. O primeiro princípio referente à redução almeja a obtenção da mesma quantidade de informações utilizando o menor número de animais possíveis; o segundo princípio, chamado de refinamento, considera a redução e minimização da dor, sofrimento e estresse do animal, aprimorando as técnicas de manuseios destes animais; enquanto o terceiro princípio, a substituição, aponta que se deve

buscar métodos alternativos, sempre que possível, substituindo por completo a utilização de animais. A substituição é atribuída a qualquer método que substitui o uso de vertebrados conscientes por material não sensível e vem sendo amplamente investigada nas últimas décadas, podendo ser subdividida em substituição relativa, onde animais são utilizados, mas não expostos a nenhum sofrimento, ou absoluta, onde nenhum animal é utilizado em qualquer fase experimental (Balls, 2002; Doke & Dhawale, 2015).

A utilização de culturas de células e de tecidos *in vitro*, que consistem no crescimento de células em um ambiente controlado fora do organismo de origem, apresenta uma alternativa valiosa aos experimentos em animais. Assim, é possível retirar células e tecidos de diferentes órgãos e animais, mantendo-os em um meio de crescimento apropriado por períodos que variam de dias, meses, e até mesmo anos. Adicionalmente, as culturas de células animais *in vitro* envolvem o isolamento e o crescimento destas em ambientes artificiais, tais como placas ou frascos de cultura, podendo ser empregadas para diversas finalidades. Assim, a cultura celular é uma ferramenta com várias vantagens, como facilidade de aplicação, economia de tempo e redução de custos, sendo frequentemente empregada na avaliação preliminar da toxicidade e da eficácia de substâncias com potencial atividade biotecnológica (Doke & Dhawale, 2015).

Diante do exposto, os ensaios de citotoxicidade *in vitro* representam uma abordagem promissora e uma alternativa ética e precisa ao uso de animais em experimentos laboratoriais e, este capítulo, aborda as técnicas mais utilizadas para avaliar a citotoxicidade, trazendo informações detalhadas sobre os ensaios mais relevantes dentro das normativas.

PRINCIPAIS TÉCNICAS EMPREGADAS PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

MTT

O ensaio de MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) introduzido por Mosmann em 1983, está entre os ensaios de viabilidade celular mais versáteis e populares no mundo. Isto devido ao fato de ser um método rápido, simples, sensível e com excelente linearidade em diferentes densidades celulares, sendo possível realizá-lo em células aderentes e não aderentes (Kumar et al., 2018; Präbst et al., 2017). Pequenas modificações na atividade metabólica celular podem resultar em mudanças substanciais nos resultados do método de MTT, permitindo a detecção do estresse celular quando exposto a agentes citotóxicos, mesmo na ausência de morte celular (Kumar et al., 2018).

Este ensaio tem como princípio a redução do sal de tetrazólio, o qual é amarelo e solúvel em água, pelas mitocôndrias de células metabolicamente ativas onde ocorre a formação de cristais de formazana que possuem coloração roxa e são insolúveis em água (Berridge et al., 2005; Ghasemi et al., 2021). A intensidade da cor dos cristais de formazana está diretamente relacionada à quantidade de células viáveis. Convém ressaltar que, após a dissolução dos cristais, ocorre a lise celular (Gonzalez & Tarloff, 2001). Conseqüentemente, a formação do

formazana é interrompida e o ponto final da reação é empregado para a avaliação da viabilidade das culturas celulares por meio da medição da densidade óptica.

MTS

O método de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) combina todas as características de um bom sistema de medição em termos de facilidade de uso, precisão e rápida indicação de toxicidade (Berg et al., 1994). Neste ensaio, o reagente é reduzido por células viáveis, na presença de metossulfato de fenazina (PMS) ou sulfato de etilfenazina (PES), também pelas desidrogenases mitocondriais, gerando cristais de formazana (Barltrop et al., 1991). O método de MTS surgiu como uma alternativa ao MTT, contornando alguns problemas que este último apresentava (Buttke et al., 1993). O MTS, assim como outros reagentes de tetrazólio (XTT e WST), permite a formação direta de produtos solúveis, eliminando a etapa de solubilização dos precipitados intracelulares produzidos pela conversão do MTT (Ishiyama et al., 1993; Roehm et al., 1991).

Cabe ressaltar que o reagente MTS apresenta carga negativa o que contribui para a solubilidade no meio de cultura aquoso, porém, tal propriedade limita a sua permeabilidade celular, sendo assim, é necessário a intermediação de um aceptor de elétrons, como o PMS ou PES, conforme já citado. Isto permite a sua penetração nas células viáveis e conversão do tetrazólio no produto solúvel de formazana (Berridge et al., 2005). O uso do MTS também permite a leitura contínua da absorbância, desde estágios iniciais do experimento (Riss et al., 2004).

O ensaio MTS é frequentemente descrito como um “ensaio de MTT de um passo”, o que oferece a facilidade de adicionar o reagente diretamente à cultura de células, sem os passos intermitentes necessários no método MTT. A vantagem do MTS em relação ao MTT é que o primeiro é mais solúvel e não tóxico, permitindo que as células sejam devolvidas à cultura para posteriores avaliações ou ensaios adicionais. A desvantagem é que ele requer a presença de PMS ou PES para uma redução eficiente (Cory et al., 1991).

Sulforrodamina B (SRB)

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* utilizando a Sulforrodamina B (SRB), inicialmente proposto por Skehan et al. em 1990, representa uma técnica amplamente empregada na avaliação da viabilidade em culturas celulares. O método se baseia na capacidade da Sulforrodamina B de se ligar a resíduos de aminoácidos básicos presentes em proteínas celulares fixadas, permitindo a quantificação do conteúdo de proteínas celulares e, conseqüentemente, a estimativa da quantidade de material celular viável (Shakil et al., 2022).

O protocolo padrão para o ensaio de SRB consiste na etapa inicial de tratamento das células, seguida pela fixação das mesmas com ácido tricloroacético (TCA) para assegurar a preservação das proteínas celulares. Posteriormente, a adição de Sulforrodamina B resulta na coloração das proteínas celulares, possibilitando a mensuração subsequente da absorbância, a qual reflete a quantidade de Sulforrodamina B ligada e, por conseguinte, o conteúdo de

material celular presente na cultura (Vichai & Kirtikara, 2006).

Apesar de sua ampla aplicabilidade e eficiência na avaliação de tratamentos experimentais em culturas celulares, é necessário destacar que o ensaio de SRB apresenta limitações importantes. A avaliação da viabilidade celular é indireta e dependente da quantidade de material celular ao invés de refletir diretamente a viabilidade celular intrínseca (Shakil et al., 2022). Além disso, fatores experimentais, incluindo fixação inadequada das células, a presença de contaminantes ou amostras com coloração, podem afetar a ligação da Sulforrodamina B e, portanto, distorcer os resultados do ensaio (Vichai & Kirtikara, 2006).

Porém, apesar das limitações mencionadas, o ensaio de Sulforrodamina B é uma ferramenta amplamente empregada na avaliação de citotoxicidade *in vitro*, proporcionando informações valiosas sobre a viabilidade celular (Orellana & Kasinski, 2016).

Alamar Blue

O Alamar Blue, também conhecido como resazurina, é um reagente utilizado na avaliação da viabilidade celular (Gonzalez & Tarloff, 2001). Além da viabilidade, esta substância possui aplicações destinadas à análise de apoptose, função e controle do ciclo celular em uma variedade de sistemas biológicos e ambientais (O'Brien et al., 2000). A resazurina destaca-se por sua ausência de toxicidade e capacidade de atravessar as membranas celulares. A utilização deste composto se baseia no fato que, inicialmente, o mesmo apresenta uma coloração azul desprovida de propriedades fluorescentes (White et al., 1996). No entanto, quando incorporada nas células, sofre redução, transformando-se em resorufina, uma substância de coloração vermelha e com notável fluorescência (Rampersad, 2012). Esta transição de estado, da forma oxidada para a forma reduzida, oferece flexibilidade nas medições, permitindo avaliações quantitativas por meio de leituras colorimétricas e fluorimétricas em dois comprimentos de onda distintos (Page et al., 1993).

A eficiência do ensaio de citotoxicidade empregando a resazurina é influenciada por diversos fatores incluindo a composição do meio de cultura, a capacidade de tampão, o pH, a densidade celular, a temperatura de incubação, as interações químicas entre os componentes do meio, bem como a concentração e o tempo de exposição ao composto-teste (O'Brien et al., 2000). Adicionalmente, é importante conduzir os ensaios em condições de ausência de luz uma vez que o Alamar Blue é sensível à luz (Longhin et al., 2022). Além disso, é recomendável que as células estejam na fase exponencial de crescimento, uma vez que a intensidade da cor vermelha reflete a extensão da proliferação celular (Ansar Ahmed et al., 1994).

Vermelho neutro (VN)

O ensaio de retenção de Vermelho Neutro (VN) tem como fundamento avaliar e quantificar a capacidade das células viáveis de reter o corante vermelho neutro em seus lisossomos intracelulares (Repetto et al., 2008; Rodrigues et al., 2023). Após a lavagem, o corante é extraído das células utilizando etanol acidificado e a sua concentração é determinada por espectrofotometria (Repetto et al., 2008). Dado que somente as células viáveis possuem

esta capacidade, a quantidade de corante medida está diretamente relacionada ao número de células vivas (Rodrigues et al., 2023).

Este ensaio é aplicável a uma ampla variedade de linhagens celulares, tanto as aderentes quanto as não aderentes, desde que protocolos estabelecidos sejam estritamente seguidos (Repetto et al., 2008). O ensaio de captação de VN é um procedimento sensível e de fácil quantificação, exigindo menos equipamentos e sendo economicamente mais viável em comparação aos outros testes de viabilidade amplamente utilizados. Além disso, ele é menos suscetível a interferências e possui uma sensibilidade superior. No entanto, é importante observar que, uma vez iniciado, o ensaio deve ser concluído imediatamente, já que não é possível fixar ou congelar as células tendo em vista que o ensaio se baseia na determinação do conteúdo total de lisossomos de células viáveis (Repetto et al., 2008).

Lactato desidrogenase (LDH)

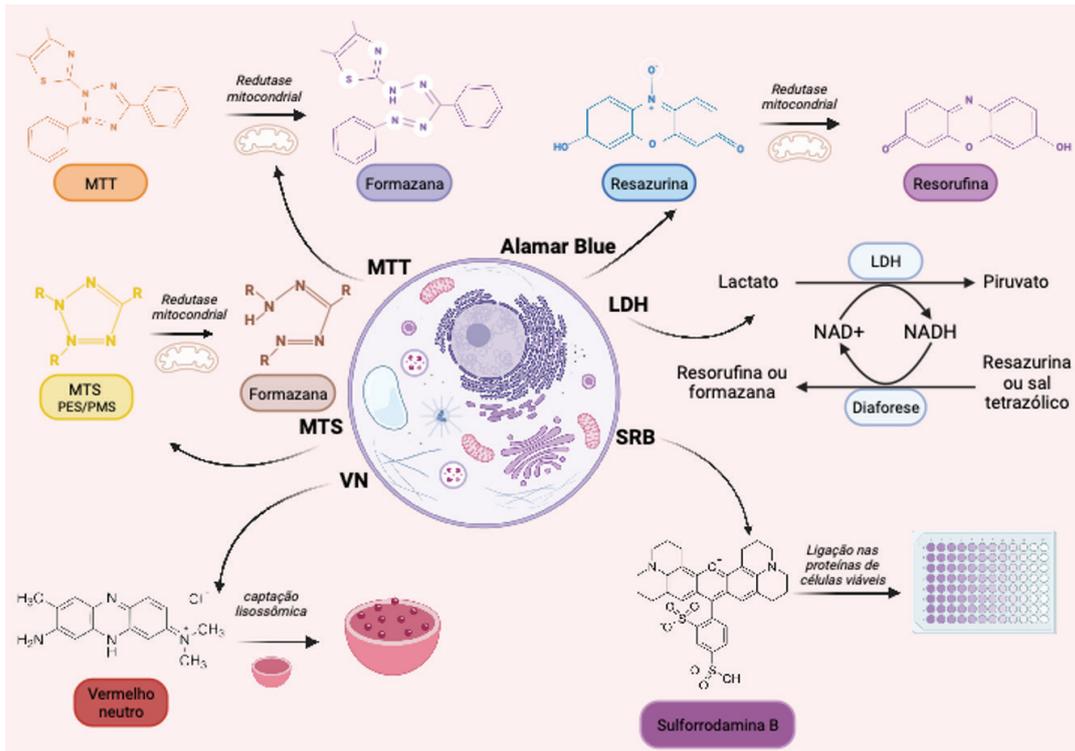
O ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH) é uma técnica amplamente utilizada para avaliar a citotoxicidade de substâncias em culturas celulares. Ele mede a liberação da enzima LDH, que está presente no citoplasma das células, quando a membrana celular é danificada, indicando morte celular ou lesão (Decker & Lohmann-Matthes, 1988). O ensaio de LDH se baseia na conversão do substrato tetrazólio em um produto colorido solúvel em água. A quantidade de produto formado é diretamente proporcional à concentração de LDH liberada no meio de cultura (Decker & Lohmann-Matthes, 1988; P. Kumar et al., 2018; Parhamifar et al., 2019).

O método de LDH é uma técnica simples e rápida, onde as células em cultura são expostas à substância ou ao fármaco em teste. Após o período de exposição, uma alíquota do meio de cultura é coletada. A reação enzimática é iniciada pela adição de substrato e cofatores enzimáticos. Após o tempo de incubação, a reação é interrompida e a absorbância é medida em um espectrofotômetro (Kumar et al., 2018; Parhamifar et al., 2019). A absorbância medida é diretamente proporcional à quantidade de LDH liberada, ou seja, quanto maior a absorbância, maior a citotoxicidade avaliada.

O ensaio de LDH oferece diversos benefícios na avaliação da citotoxicidade em culturas celulares e na pesquisa biotecnológica. Alguns dos principais benefícios incluem simplicidade e facilidade de execução, sensibilidade, reprodutibilidade, avaliação quantitativa e baixo custo (Decker & Lohmann-Matthes, 1988).

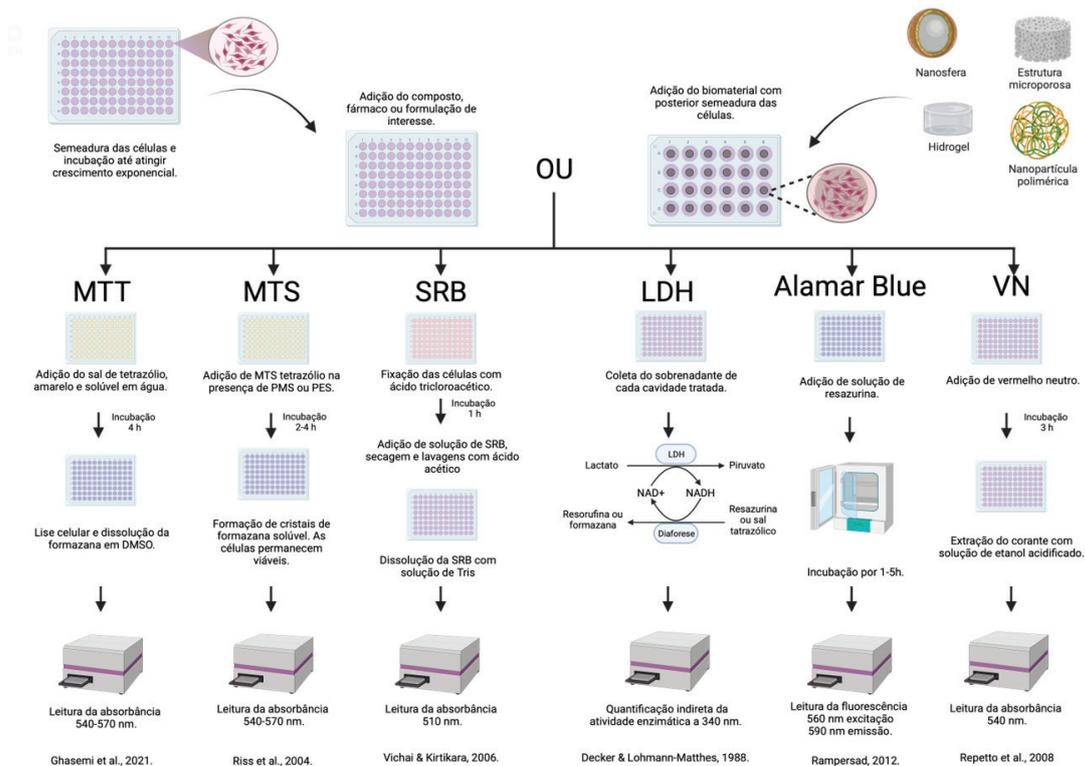
Na Figura 1 estão representadas as principais técnicas empregadas para avaliar a citotoxicidade de amostras *in vitro*, enquanto no Quadro 1 é possível encontrar um compilado das vantagens e desvantagens das principais técnicas.

Figura 1 - Principais métodos empregados para avaliação da citotoxicidade *in vitro*.



A Figura 2 descreve a metodologia resumida das técnicas empregadas para determinação da citotoxicidade celular.

Figura 2 - Metodologia resumida das técnicas para determinação da citotoxicidade *in vitro*.



Quadro 1 - Vantagens e desvantagens dos principais métodos de avaliação de citotoxicidade in vitro.

TÉCNICA	VANTAGENS	DESVANTAGENS
MTT	<ul style="list-style-type: none"> - Rápido. - Simples. - Econômico. - Sensível a mudanças metabólicas das células. - Utilização em diversos modelos celulares. 	<ul style="list-style-type: none"> - Causa lise celular. - Longo tempo longo de incubação. - Necessidade de equipamento para leitura. - Incluiu componentes tóxicos. - Compostos-testes podem interferir na reação afetando os resultados.
MTS	<ul style="list-style-type: none"> - Rápido. - Simples. - Econômico. - Alta sensibilidade. - Elevada taxa de reprodutibilidade. - Tempo de incubação curto. - Não causa lise ou toxicidade celular. - Pode ser realizado com culturas celulares em andamento. 	<ul style="list-style-type: none"> - Demanda equipamento para leitura. - Não fornece informações detalhadas sobre os mecanismos de toxicidade.
SRB	<ul style="list-style-type: none"> - Possibilita pausas entre as etapas. - Não tóxico. 	<ul style="list-style-type: none"> - Avaliação da viabilidade celular é indireta. - A presença de contaminantes ou amostras com coloração podem afetar a ligação da Sulforrodamina B.
LDH	<ul style="list-style-type: none"> - Técnica rápida e simples, alta sensibilidade, reprodutibilidade e baixo custo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Falta de especificidade, limitações na detecção de citotoxicidade, falta de detalhes sobre mecanismos de ação.
Alamar Blue	<ul style="list-style-type: none"> - Não tóxico. - Alta sensibilidade. - Não ocorre lise celular. - Pode ser usado em diferentes modelos celulares. - É escalonável. - Leitura pode ser realizada por meio de fluorescência e/ou absorvância. 	<ul style="list-style-type: none"> - Compostos testes podem interferir na sensibilidade da técnica. - Demanda de equipamentos específicos para leitura. - Sensível à luminosidade.
Vermelho neutro	<ul style="list-style-type: none"> - Aplicado em diferentes tipos celulares. - Simples. - Facilmente quantificável. - Apresenta pouca interferência. - Sensível. 	<ul style="list-style-type: none"> - Uma vez iniciado, deve ser concluído imediatamente. - Limitações relacionadas ao caráter dos compostos a serem testados.

REFERÊNCIAS

- Ansar Ahmed, S., Gogal, R. M. & Walsh, J. E. (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods*, 170(2). [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90396-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90396-4)
- Balls, M. (2002). Future improvements: Replacement in vitro methods. *ILAR Journal*, 43(SUPPL.). https://doi.org/10.1093/ilar43.suppl_1.s69
- Barltrop, J. A., Owen, T. C., Cory, A. H. & Cory, J. G. (1991). 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans As cell-viability indicators. In *Bimrganic & Metficti Chunrrly Lerters* (Vol. 1, Issue 11).
- Berridge, M. V., Herst, P. M. & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. In *Biotechnology Annual Review* (Vol. 11, Issue SUPPL.). [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
- Buttke, T. M., McCubrey, J. A. & Owen, T. C. (1993). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *Journal of Immunological Methods*, 157(1–2). [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90092-L](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90092-L)
- Cory, A. H., Owen, T. C., Barltrop, J. A. & Cory, J. G. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Communications*, 3(7). <https://doi.org/10.3727/095535491820873191>
- Decker, T. & Lohmann-Matthes, M. L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*, 115(1). [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(88\)90310-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(88)90310-9)
- Doke, S. K. & Dhawale, S. C. (2015). Alternatives to animal testing: A review. In *Saudi Pharmaceutical Journal* (Vol. 23, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.002>
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S. & Kempson, I. (2021). The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Gonzalez, R. J. & Tarloff, J. B. (2001). Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicology in Vitro*, 15(3). [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(01\)000145](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(01)000145)
- Ishiyama, M., Shiga, M., Sasamoto, K., Mizoguchi, M. & He, P. (1993). A New Sulfonated Tetrazolium Salt That Produces a Highly Water-Soluble Formazan Dye. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 41(6). <https://doi.org/10.1248/cpb41.1118>
- ISO/EN109935. (2009). ISO 109935 Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. International Standard ISO, 3 Ed.
- Jiang, M., Chattopadhyay, A. N. & Rotello, V. M. (2022). Cell-Based Chemical Safety Assessment

and Therapeutic Discovery Using Array-Based Sensors. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/ijms23073672>

Kumar, P., Nagarajan, A. & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095497>

Kumar, S., Kumar, A., Mamidi, P., Tiwari, A., Kumar, S., Mayavannan, A., Mudulli, S., Singh, A. K., Subudhi, B. B. & Chattopadhyay, S. (2018). Chikungunya virus nsP1 interacts directly with nsP2 and modulates its ATPase activity. *Scientific Reports*, 8(1), 1045. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19295-0>

Longhin, E. M., El Yamani, N., Rundén-Pran, E. & Dusinska, M. (2022). The alamar blue assay in the context of safety testing of nanomaterials. *Frontiers in Toxicology*, 4. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.981701>

O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. & Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17). <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>

Orellana, E. & Kasinski, A. (2016). Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *BIO-PROTOCOL*, 6(21). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1984>

Page, B., Page, M. & Noel, C. (1993). A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro. *International Journal of Oncology*, 3(3). <https://doi.org/10.3892/ijo.3.3473>

Parhamifar, L., Andersen, H. & Moghimi, S. M. (2019). Lactate dehydrogenase assay for assessment of polycation cytotoxicity. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1943). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9092-4_18

Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S. & Hübner, H. (2017). Cell Viability Assays: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*. *Methods in Molecular Biology*, 1601.

Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Switzerland)*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/s120912347>

Repetto, G., del Peso, A. & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7). <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>

Riss, T. L., Nilas, A. L. & Minor, L. (2004). Cell Viability Assays Assay Guidance Manual. Assay Guidance Manual. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>

Rodrigues, R. M., Stinckens, M., Ates, G. & Vanhaecke, T. (2023). Neutral Red Uptake Assay to Assess Cytotoxicity In Vitro. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2644). https://doi.org/10.1007/978-1-071630525_15

Roehm, N. W., Rodgers, G. H., Hatfield, S. M. & Glasebrook, A. L. (1991). An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunological Methods*, 142(2). [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90114-U](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90114-U)

Russel, W. M. S. & Bursch, R. L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*.

Shakil, M. S., Rana, Z., Hanif, M. & Rosengren, R. J. (2022). Key considerations when using the sulforhodamine B assay for screening novel anticancer agents. In *Anti-Cancer Drugs* (Vol. 33, Issue 1). <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000001131>

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. & Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13). <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>

Vichai, V. & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1(3), 1112–1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>

White, M. J., DiCaprio, M. J. & Greenberg, D. A. (1996). Assessment of neuronal viability with Alamar blue in cortical and granule cell cultures. *Journal of Neuroscience Methods*, 70(2). [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(96\)001185](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(96)001185)