

Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales

Assessing two staining methods for cytotoxicity tests on tumor cell lines

Linamaria Escobar M.¹, Paola A. Alfonso R.², Fabio A. Aristizábal G.¹

Resumen

En la estimación de la posible citotoxicidad de extractos o compuestos en proceso de prospección se emplean métodos de tinción celular como aproximación indirecta para la medición masa celular viable. En ensayos de citotoxicidad sobre las líneas celulares SiHa, MCF-7 y MKN-45 se comparan el método de tinción sulforodamina B (SRB), que es un ensayo de tipo terminal, con el uso de resazurina propuesta 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 tres compuestos sintéticos durante un periodo de tratamiento de 48 horas usando como referencia de actividad doxorrubicina HCl, un medicamento empleando en cáncer. Los datos obtenidos en los dos tipos de ensayos sometidos a una prueba de correlación mostraron que no hay diferencias significativas en ambos métodos permitiendo la comparación entre estos bajo las condiciones usadas.

Palabras clave: citotoxicidad, correlación, resazurina, sulforodamina B.

Abstract

Cell staining methods are commonly used for estimating extracts or compounds' potential cytotoxic activity when prospecting for indirect quantitative measurement of cell growth and viability. This work compared the sulphorhodamine B (SRB) staining method, which is a terminal cell density measuring assay, and the resazurin method, a cell proliferation assay which is supposed to be less toxic for the cell. The methods were compared in terms of percentage survival by evaluating MCF-7, MKN-45 and SiHa cell line sensitivity to three synthetic compounds using a 48-hour treatment period and doxorubicin HCl (a drug used in cancer treatment) as reference activity. A correlation test using the data obtained from the assays showed that there was no significant difference between the methods in the conditions used here.

Key words: cytotoxicity, correlation, sulphorhodamine B assay, resazurin assay.

Recibido: julio 24 de 2008

Aprobado: noviembre 12 de 2009

1 Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, Grupo de Farmacogenética del Cáncer. Bogotá, Colombia. lmescoarma@unal.edu.co; faaristizabalg@unal.edu.co

2 Pontificia Universidad Iaveriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá. Colombia.

Introducción

El método de tinción con sulforodamina B (SRB) fue desarrollado en el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos, como una alternativa al empleo del método de reducción de MTT en el programa de tamizaje *in vitro* para el descubrimiento de nuevos agentes anti-neoplásicos (Skehan *et al.*, 1990).

La sulforodamina B (SRB) es un colorante de aminoxantano, rosado brillante, posee dos grupos sulfónicos $-SO_3^-$ cargados negativamente, capaces de unirse electrostáticamente a cationes. En condiciones ácidas (disuelta en ácido acético 1%), la SRB aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas, y se fija selectivamente a éstos, proporcionando un índice del contenido de proteína celular si las células son previamente fijadas con ácido tricloroacético (TCA), y después de eliminar el colorante no fijado, el colorante unido a las células viables se extrae con medio alcalino (Solución de Tris pH 10,5) y se lee la absorbancia a 564 nm (Skehan *et al.*, 1990; Monks *et al.*, 1991).

Por otro lado, el método de reducción de la resazurina fue introducido como un indicador de viabilidad celular no tóxica que puede ser utilizado para monitorear la proliferación celular y la citotoxicidad. El método es descrito como un indicador de óxido-reducción que tiene propiedades de fluorescencia y responde a la actividad metabólica tanto de células humanas como de bacterias (Rasmussen, 1999; Benavides *et al.*, 2004). El ensayo de reducción con resazurina ha sido usado por más de cincuenta años para monitorear contaminación de leche por bacterias y levaduras incluso en estudios de valoración de la calidad de semen (Zalata *et al.*, 1998); sin embargo, hace relativamente poco tiempo esta técnica empezó a ser usada en la valoración de la proliferación celular y citotoxicidad en diferentes tipos de células como fibroblastos, linfocitos humanos y de ratones, cultivos primarios de células neuronales y líneas tumorales (O'Brien *et al.*, 2000).

La resazurina es poco tóxica para las células ya que el producto de la oxidación, de-

nominado resorufina, se difunde al medio e inicialmente al no concentrarse al interior de la célula no induce muerte, como sí ocurre en otras técnicas. Además, este método lo describen como sensible y altamente reproducible. Esto permite la continuidad de estudios en las mismas células, economizando tiempo y dinero, especialmente en cultivos primarios donde las células son muy escasas y apreciadas (Hamid *et al.*, 2004; Lieberman *et al.*, 2001).

La resazurina (azul no fluorescente) es reducida a resorufina (rojo altamente fluorescente) por óxido-reductasas que se encuentran principalmente en la mitocondria de células vivas. Así, la medida de fluorescencia obtenida de la resazurina es un indicador de la función mitocondrial (Zhang *et al.*, 2004). Por ello, comparar las respuestas obtenidas *in vitro* por los métodos de reducción de resazurina y de tinción con sulforodamina B será útil para evaluar la viabilidad y supervivencia celular en ensayos de citotoxicidad.

Materiales y métodos

Se emplearon tres líneas celulares derivadas de diferentes tumores humanos: adenocarcinoma de mama MCF-7 (ATCC: HTB-22) reportada por NCI como una línea celular sensible a fármacos (Shoemaker, 2006); adenocarcinoma gástrico MKN-45 (DSMZ: ACC 409); y un carcinoma escamo-celular de cérvix SiHa (ATCC: HTB-35); todas de crecimiento adherente obtenidas del banco de células del Laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Cancerología de Colombia en Bogotá. Estas líneas fueron escogidas dentro un panel de líneas celulares de tumores humanos ya que representan neoplasias con alta incidencia en nuestra población.

Mantenimiento General de cultivos celulares

Las líneas se cultivaron 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 (5% CO₂ en el aire, 37 °C y 100% de humedad relativa).

Conteo y comprobación de viabilidad

Para las pruebas fue necesario tratar los cultivos en estado de 90% de confluencia con una solución de tripsina 0,025%-EDTA 0,03% (ácido etilendiamino tetracético) durante 5 min a 37 °C.

Tomando una alícuota de la suspensión obtenida por tripsinización, se llevó a cabo una tinción con azul de tripano al 4%, y se hizo el conteo en una cámara de Neubauer.

Inoculación de placas

Las densidades celulares que se utilizaron en cada pozo de placas de 96 fueron las sugeridas (Cordero *et al.*, 2002, 2004; Morantes *et al.*, 2006; León *et al.*, 2006): 10.000 células/cm² para SiHa, 15.000 células/cm² para MCF-7, y 15.000 células/cm² para MKN-45.

Comparación entre métodos de tinción

Con el fin de comparar las respuestas para los métodos se sembraron paralelamente dos placas de 96 pozos servidas de la misma forma que fueron leídas, una con el método de tinción SRB y otra con el método de reducción de resazurina. Se empleó la forma comercial del fármaco doxorubicina HCl (Ebewe Pharma), en tres diluciones seriadas de 1:10, con una concentración máxima de 10µM y una concentración mínima de 0,1µM (León *et al.*, 2006). Las células cultivadas se trataron durante 48 horas con tres compuestos sintéticos: urotropina, TATD (Simkins y Wright, 1955) y TATu (Rivera *et al.*, 2004), en tres diluciones seriadas utilizando las mismas concentraciones que en doxorubicina (10µM, 1µM y 0,1µM). Después del tratamiento se determinó la población celular viable mediante los diferentes métodos.

Tinción con resazurina

Transcurridas 48 horas de tratamiento, se extrajo el medio de cultivo de las placas y se lavaron los pozos con PBS pH 7,2. Posteriormente, se adicionó a cada pozo 100µL de medio MEM sin suplementar, que contiene resazurina (4,4 µM) (Magnani y Bettini, 2000; O'Brien *et al.*, 2000) y se dejó incubar el colorante durante 4 horas en condiciones estándar. Cumplido el tiempo de incubación las placas fueron leídas a una longitud de onda de excitación 535nm y 595nm de emisión en un lector Tecan (Anoopkumar-Dukie *et al.*, 2005).

Tinción con sulforodamina B

Pasadas 48 horas de aplicado el tratamiento sobre las células se extrajo el medio de cultivo. Posteriormente, se adicionó a cada pozo 100µl de solución de ácido tricloro acético (TCA) al 10% y se incubó por una hora a 4 °C. Pasado el tiempo de incubación se desechó el TCA y cada placa se lavó cinco veces con agua de grifo, dejándolas secar completamente. A continuación se adicionó a cada pozo 100µl de solución de SRB al 0,4 % en ácido acético incubándolo por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó el colorante y se lavaron los pozos cinco veces disponiendo en cada uno 50µl de ácido acético al 1%. Por último, se adicionaron 100µl de solución de TRIS base 10 mM, pH 10,5 y se leyeron las placas en un lector BIORAD 550 a 570nm (Skehan *et al.*, 1990).

Análisis de datos

Los datos comparados fueron los porcentajes de supervivencia obtenidos a partir de las unidades de absorbancia en el caso de la SRB, y la intensidad de fluorescencia expresada en unidades relativas de fluorescencia (URF) en el caso de la resazurina, a fin de establecer las diferencias de respuesta para los dos métodos de viabilidad celular, y así indicar si los métodos proveen resultados comparables. Igualmente, se aplicó el coeficiente de correlación de Spearman, empleando el programa estadístico SPSS

(Statistical Product for Service Solutions) versión 13.0 para Windows.

Resultados

Como los métodos tienen unidades de medida diferentes, la comparación se hizo calculando los porcentajes de supervivencia de cada tratamiento. Los porcentajes de supervivencia se calcularon a partir de la fórmula:

$$\text{Porcentaje de supervivencia} = \frac{[\text{Promedio de abs/f pozos tto} - \text{Promedio de abs/f pozos blanco de tto}]}{[\text{Promedio de abs/f pozos cc} - \text{Promedio de absorbancia/fluorescencia pozos bc}] * 100} \quad (\text{Ecu 1})$$

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%, por último (abs/f bc) es la absorbancia o fluorescencia promedio del blanco de control. Para observar la repetitividad de los resultados obtenidos empleando cada método se realizó un segundo ensayo.

Los porcentajes de supervivencia obtenidos al evaluar cada compuesto sintético en las líneas celulares fueron muy similares empleando ambos métodos. Los porcentajes oscilan entre 88 y 116% de supervivencia evidenciando que a las concentraciones utilizadas no se observó un efecto citotóxico sobre las células (tabla 1). Asimismo, cabe resaltar que los porcentajes obtenidos por ambos métodos conservan una tendencia similar y no difieren de manera notable en los dos ensayos realizados, lo que lleva a tener resultados reproducibles.

Por otro lado, el uso de doxorubicina HCl a una concentración de 10 μ M ejerce un efecto citotóxico observado en la representación de un porcentaje de viabilidad menor al 50% en las líneas SiHa y MCF-7 al emplear ambos métodos de viabilidad celular; sin embargo, para la línea MKN-45 el efecto de este agente antineoplásico solo se puede observar empleando el método de SRB. Bajo las demás

concentraciones evaluadas de este agente antineoplásico no se observó un efecto citotóxico en ambos métodos (tabla 1).

Al graficar los datos de supervivencia en relación con las concentraciones de doxorubicina HCl por los dos métodos se observó un comportamiento equivalente; a medida que aumentó la concentración de antineoplásico hubo una disminución en el porcentaje de viabilidad (figura 1).

Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos en el primer ensayo con los derivados del ensayo realizado días después, se observó que los datos de supervivencia que se obtuvieron empleando el método de SRB son más variables que los datos obtenidos mediante el método de reducción de resazurina, determinando que los resultados conseguidos son reproducibles y constantes bajo las mismas condiciones evaluadas.

Con respecto al efecto citotóxico de la doxorubicina HCl, se pudo observar que la línea más sensible a este agente fue SiHa, seguida de MCF-7 y MKN-45, ratificando el estudio de León *et al.* (2006) donde observaron la sensibilidad de diferentes líneas tumorales frente a doxorubicina HCl y taxol (figura 1).

Seguidamente, para comprobar la hipótesis de la similitud en el comportamiento de porcentajes de supervivencia obtenida en los dos métodos, se aplicó el coeficiente de correlación de Spearman (r_s) que indicó el grado de asociación medido por rango que existe entre las variables. Los coeficientes de correlación realizados para cada línea celular mostraron un acercamiento a 1 revelando que los resultados obtenidos por los dos métodos están asociados en forma positiva (tabla 2).

Con las gráficas obtenidas de la prueba de Spearman, correlacionando ambos métodos se observó que el grado de asociación de las variables para cada línea celular fue cercano a 0,9 lo que expresa un ajuste lineal, teniendo una probabilidad menor de 0,001 en los tres mode-

Tabla 1. Promedio de porcentajes de supervivencia obtenidos al evaluar tres compuestos sintéticos y doxorubicina HCl en dos ensayos diferentes empleando dos métodos seleccionados

Compuesto	Concentración (μM)	Resazurina			SRB		
		SiHa (%)	MCF-7 (%)	MKN-45 (%)	SiHa (%)	MCF-7 (%)	MKN-45 (%)
Urotropina Ensayo I	10	90	93	92	96	94	96
	1	90	96	92	93	97	99
	0,1	89	94	91	97	93	95
Urotropina Ensayo II	10	89	93	90	94	101	100
	1	90	96	91	96	101	99
	0,1	88	94	90	98	101	99
TATD Ensayo I	10	100	102	101	101	99	102
	1	99	100	102	88	100	103
	0,1	99	102	101	91	98	97
TATD Ensayo II	10	99	102	101	100	100	101
	1	98	100	98	98	100	100
	0,1	98	102	100	100	99	100
TATu Ensayo I	10	102	100	101	90	104	102
	1	101	99	99	93	107	100
	0,1	114	103	111	113	107	104
TATu Ensayo II	10	98	100	101	91	100	100
	1	100	98	99	97	100	100
	0,1	116	103	114	96	100	102
Doxorrubicina HCl Ensayo I	10	15	43	81	4	32	36
	1	67	63	96	19	57	65
	0,1	81	89	107	59	102	98
Doxorrubicina HCl Ensayo II	10	17	44	75	10	17	39
	1	67	66	93	24	81	72
	0,1	84	87	105	55	101	83

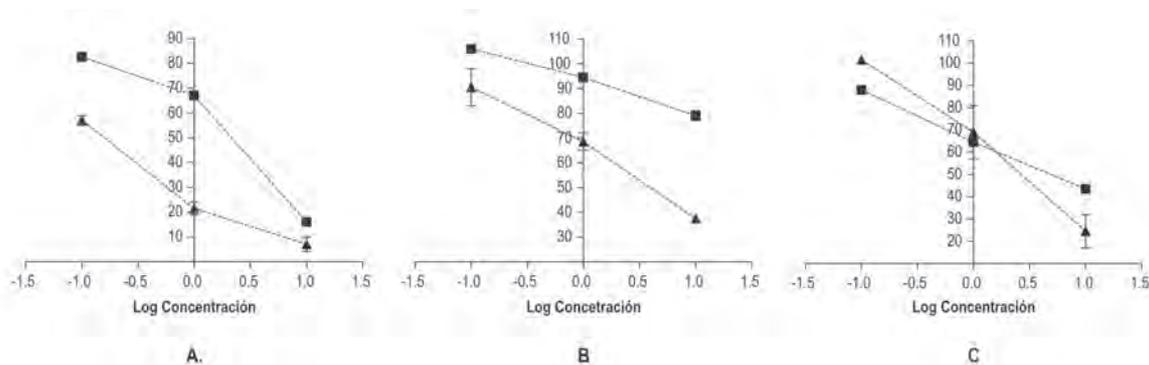


Figura 1. Efecto citotóxico de doxorubicina HCl empleando el método de resazurina (□) y el método de reducción de SRB (Δ) sobre cada línea celular. A: SiHa, B: MKN-45 y C: MCF-7. $\alpha=0,05$ y ± 1 desviación típica.

Tabla 2. Datos obtenidos del coeficiente de correlación de Spearman para cada línea celular.

	Coeficiente de correlación de Spearman	N	Prob p
SiHa	0,9276	6	0,0077
MCF-7	0,9429	6	0,0048
MKN-45	0,8857	6	0,0188

los, siendo significativas las regresiones (figura 2 A-C).

Asimismo, los valores de porcentaje de supervivencia graficados revelan la correlación positiva de ambos métodos, es decir, cuando aumenta el porcentaje de supervivencia en un método, aumenta en porcentaje de supervivencia del otro.

Discusión

Después del periodo de tratamiento de 48 horas, los resultados obtenidos mostraron que en ninguna línea celular los tres compuestos sintéticos causaron disminución significativa en la supervivencia celular empleando los métodos de sulforodamina B y resazurina; no obstante, se encontró que los porcentajes de supervivencia obtenidos a partir de los dos métodos fueron semejantes al evaluar estos compuestos.

Por otro lado, los valores de supervivencia obtenidos al evaluar doxorrubicina con el método de reducción de resazurina fueron mayores que los obtenidos con el método de tinción con SRB, posiblemente debido al tiempo de contacto de la resazurina con las células.

En este ensayo las placas tratadas fueron sometidas a resazurina durante cuatro horas permitiendo que la transformación a resorufina fuera de manera continua y acumulativa; contrario a las placas sometidas con SRB donde el tiempo de exposición al colorante fue tan solo de 10 min.

Otra explicación del aumento en el porcentaje de supervivencia al usar resazurina como método de viabilidad celular comparado con SRB, puede estar dada por el hecho de que las células en proceso de apoptosis despliegan rutas pro y anti-apoptóticas, incrementando proteínas que están activamente vinculadas en procesos mitocondriales y energéticos (Holst y

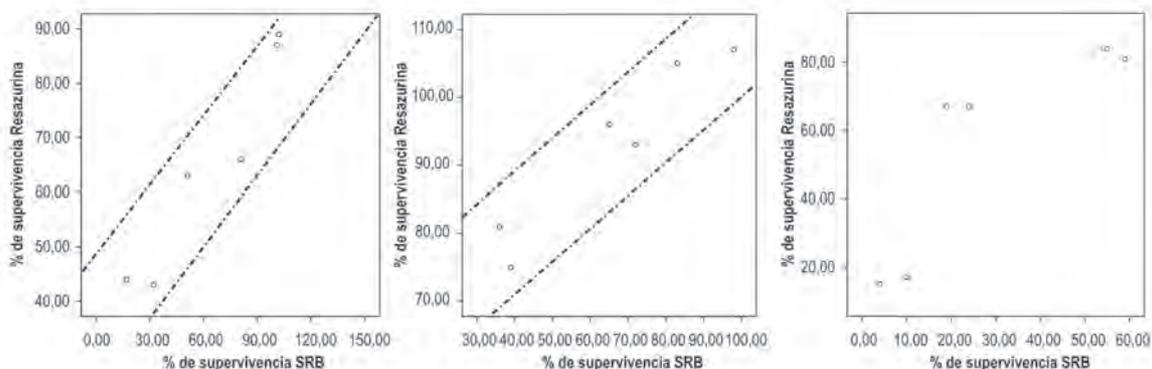


Figura 2. Correlación entre SRB y resazurina en la valoración de citotoxicidad de doxorrubicina HCl en cada línea celular. A: MCF-7, B: MKN-45 y C: SiHa.

Oredsson, 2005; Hamid *et al.*, 2004; Majors *et al.*, 2007), siendo esto un punto importante para una mayor metabolización y transformación de resazurina a resofurina, lo cual es congruente con un incremento de fluorescencia.

Otro factor para destacar es la variabilidad en los resultados. Los datos de viabilidad celular obtenidos mediante el uso de resazurina mostraron desviaciones mínimas en ambos ensayos realizados soportando la idea de que el método y los resultados obtenidos por éste son reproducibles, diferente a lo observado con SRB donde las desviaciones estándar de los resultados fueron altas infiriendo que esta variabilidad está ligada a la manipulación mecánica a la que están expuestas las placas, siendo necesarios los lavados rutinarios y la disposición de diferentes solventes para obtener una medida de número celular (Skehan *et al.*, 1990).

Es por ello que para emplear este tipo de colorante se requiere la automatización del método con el fin de disminuir la variabilidad de los resultados. Más aún, autores como Hoslt y Oredsson (2004) han descrito que el uso de un solo método de tinción celular puede ser un riesgo potencial ya que puede sesgar los resultados cuando se realizan valoraciones de citotoxicidad.

Los resultados obtenidos en este ensayo muestran que el método resazurina y el método de SRB empleados bajo las condiciones establecidas generan resultados comparables. Esto puede estar explicado por la diferencia de medida de los métodos; mientras la resazurina, por medio de oxido-reductasas presentes en la mitocondria de células viables, transforma la resazurina a resofurina fluorescente para obtener una medida indirecta de viabilidad celular, la sulforodamina B lo hace en relación con la cantidad de proteínas celulares asociadas al colorante para obtener una medida de número de células presentes (Skehan *et al.*, 1990).

Es por ello que para el desarrollo de un ensayo de citotoxicidad se deben considerar dos factores importantes: primero, la cantidad del tiempo disponible y la variable por medir (Putman *et al.*, 2002). Así, cabe anotar que para ensayos donde es importante tener una aproximación del comportamiento y la viabilidad de las células, la resazurina es una buena elección ya que evalúa la actividad metabólica celular y puede inferir la respuesta de un efecto citotóxico o proliferativo de compuestos valorados, y el método de SRB es un método empleado para medir de manera apropiada componentes y residuos celulares (Slater, 2001).

Así, con los resultados obtenidos en este ensayo, sugerimos que para evaluar la citotoxicidad de compuestos con potencial actividad citotóxica sobre líneas tumorales de origen humano, el método de resazurina resulta ser más sensible y reproducible, por tanto es útil en ensayos rutinarios.

Referencias bibliográficas

- American Type Culture Collection (ATCC). Cell lines and Hybridomas. <<http://www.atcc.org/common/catalog/cellBiology/cellBiologyIndex.cfm>>. [Fecha de consulta: octubre 8 de 2009].
- Anoopkumar-Duke, S., Carey, J.B., Conere T. *et al.* 2005. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *The British Journal of Radiology* 78: 945-947.
- Benavides, T., Martínez, V., Mitjans, M., Infante, M. R., Moran, C., Clapés, P., Clothier, R., Vinardell, M. P. 2004. Assessment of the potential irritation and photoirritation of novel amino acid-based surfactants by *in vitro* methods as alternative to the animal tests. *Toxicology* 201: 87-93.
- Cordero, C.P., Gómez, S., León, C. J., Morantes, S. J., Aristizábal, F. A. 2004. Cytotoxic activity of Compounds Isolated from Colombian plants. *Fitoterapia* 75: 225-227.
- Cordero, C.,P, Aristizábal, F. A. 2002. Evaluación preliminar *in vitro* de actividad citotóxica en extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos. *Revista Colombiana de Biotecnología* 3: 100-106.
- Freshney, I. 2000. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 4th Edition. New York: John Wiley and Sons. 589 p.

- Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R. y Bullock, P. 2004. Comparison of Alamar blue and MTT assays for high throughput-put screening. *Toxicology in Vitro* 18: 703-710.
- Holst, C. M., Oredsson, S. M. 2005. Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation of the cytotoxicity of a spermiine analogue on human breast cancer cell lines. *Toxicology in Vitro* 19: 379-387.
- Leon, C. J., Gómez, S. M., Morantes, S. J., Cordero, C. P., Aristizábal, F. A. 2006. Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad *in vitro*. *Biomédica* 26: 161-168.
- Lieberman, M., Patterson, G., Moore, R. 2001. *In vitro* bioassays for anticancer drug screening: effects of cell concentration and other assays parameters on growth inhibitory activity. *Cancer letter* 173: 21-29.
- Magnani, E. y Bettini, E. 2000. Resazurin detection of energy metabolism changes in serum-starved PC12 cells and of neuroprotective agent effect. *Brain Research protocols* 5: 266-272.
- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, K. P., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., Boyd, M. 1991. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen using a diverse panel of culture human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 83: 757-766.
- Morantes, S. J., Páez, A., Cordero, C. P., Rincón, J. y Aristizábal, F. A. 2006. Análisis fitoquímico y de actividad citotóxica de fracciones aisladas del extracto etanólico total de *Acnistus arborescens*. *Acta Farm Bonaerense* 25 (4): 491-6.
- Pagé, B., Pagé, M. y Noel, C. 1993. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. *International Journal of Oncology* 3: 473-476.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. y Pognan, F. 2002. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* 267: 5421-5426.
- Putnam, K., Bombick, D. y Doolittle, D. 2002. Evaluation of eight *in vitro* assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smokes condensate. *Toxicology in Vitro* 16: 599-607.
- Rasmussen, E. S. 1999. Use of fluorescent redox indicators to evaluate cell proliferation and viability. *In Vitro and Molecular Toxicology* 12: 47-58.
- Rivera, A., Nuñez, M., Morales, M. y Nathan-Joseph, P. 2004. Preparation of cage amine 1, 3, 6, 8-tetraazatricyclo [4.3.1.1^{3,8}] undecane. *Short Communication. Tetrahedron Letters* 45 (41): 7563-7565.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D. *et al.* 1990. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute* 82: 1107-1112.
- Slater, K. 2001. Cytotoxicity tests for high-throughput drug discovery. *Current Opinion in Biotechnology* 12: 70-74.
- Shoemaker, R. 2006. The NCI60 human tumor cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews in Cancer* 6: 813-23.
- Simikins, R. y Wright, G. 1955. Nitrolysis of 1,3-6,8-Diendomethylene-1,3,6,8-tetracyclodecane. *Journal of American Chemistry Society* 77: 3157-3159.
- Zalata, A., Lammertijn, N. Christophe, A. y Comhaire, F. 1998. The correlates and alleges biochemical background of the resazurin reduction test in semen. *Int J Androl* 21: 289-294.
- Zhang, H., Du, G., Zhang, J. 2004. Assay of mitochondrial functions by resazurin *in vitro*. *Acta Pharmacologica Sinica* 25: 385-389.