

# La espectroscopia UV-Vis en la evaluación de la viabilidad de células de cáncer de mama



Juan Maldonado Cubas<sup>1</sup>, Rocio Guadalupe Casañas Pimentel<sup>2</sup>, Iván Enrique Martínez Merlín<sup>3</sup>, Eduardo San Martín Martínez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Legaria 694, Irrigación, Miguel Hidalgo, C.P. 11500, Ciudad de México.

<sup>2</sup>CONACYT- Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Legaria 694, Irrigación, Miguel Hidalgo, C.P. 11500, Ciudad de México.

<sup>3</sup>Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, Gustavo A. Madero, C.P. 07360, Ciudad de México.

**E-mail:** maldonadocubasj@yahoo.com.mx

(Recibido el 20 de junio de 2017; aceptado el 23 de mayo de 2018)

## Resumen

La espectroscopia UV-Vis es una herramienta fundamental en el estudio de los efectos biológicos de las sustancias químicas. Ésta, es la herramienta más utilizada en la evaluación de los efectos tóxicos o proliferativos de las sustancias químicas en cultivos celulares, lo que es de amplio interés en los estudios preclínicos para el desarrollo de nuevos fármacos para tratar el cáncer. La espectroscopia UV-Vis es una técnica robusta, fácil, económica y rápida que presenta múltiples ventajas en la evaluación de la viabilidad celular *in vitro*. El presente trabajo expone los fundamentos de la espectroscopia UV-Vis en el estudio de la viabilidad celular y presenta la evaluación del efecto de algunas sustancias y extractos de plantas en la viabilidad de cultivos celulares de cáncer de mama.

**Palabras clave:** espectroscopia UV-Vis, viabilidad celular, MTT

## Abstract

UV-Vis spectroscopy is a fundamental tool in the study of the biological effects of chemical substances. This is the most used tool in the evaluation of the toxic or proliferative effects of chemical substances in cell cultures, which is of great interest in preclinical studies for the development of new drugs to treat cancer. UV-Vis spectroscopy is a robust, easy, economic and rapid technique that presents multiple advantages in the evaluation of cell viability *in vitro*. The present work exposes the fundamentals of UV-Vis spectroscopy in the study of cell viability and presents the valuation of the effect of some substances and plant extracts on the viability of breast cancer cell cultures.

**Keywords:** UV-Vis spectroscopy, cell viability, MTT

**PACS:** 07.60.Rd, 87.10.Ca, 87.16.ad

**ISSN 1870-9095**

## I. INTRODUCCIÓN

La interacción de la radiación con la materia es una fuente importante de información sobre las sustancias químicas. El estudio de ésta interacción se realiza a través del empleo de diferentes técnicas de espectroscopia.

La espectroscopia óptica se basa en la relación de frecuencias Bohr-Einstein

$$\Delta E = E_2 - E_1 = hv, \quad (1)$$

que correlaciona los estados energéticos discretos, atómicos o moleculares  $E_i$ , con la frecuencia de la radiación electromagnética  $\nu$ . Donde  $h$  es la constante de Planck ( $6.626 \times 10^{-34}$  J s o  $6.626 \times 10^{-27}$  erg s).

Los cambios energéticos también pueden definirse en función de la longitud de onda

$$\Delta E = E_2 - E_1 = hc\tilde{\nu},$$

donde

$$\nu = c/\lambda = c\tilde{\nu}. \quad (2)$$

La espectroscopia UV-Vis es una técnica de medición basada en la absorción de radiación UV y/o visible por parte de las moléculas que componen a una sustancia. Esta espectroscopia se trabaja en un intervalo de longitud de onda de 200 a 800 nm, brindando información de los estados energéticos, atómicos o moleculares, de la muestra de estudio [1].

El instrumento empleado para la obtención de un espectro UV-Vis recibe el nombre de espectrofotómetro (Figura 1), está compuesto por una fuente de radiación UV y visible, generalmente se utilizan lámparas de deuterio, wolframio y/o xenón; un monocromador compuesto por un colimador de entrada, un elemento dispersante y un colimador de salida, su función es seleccionar la longitud de onda que incidirá en la muestra; finalmente uno o más detectores son encargados de medir la intensidad de la radiación proveniente de la muestra, formando un espectro de absorción y/o transmisión según se requiera [2].

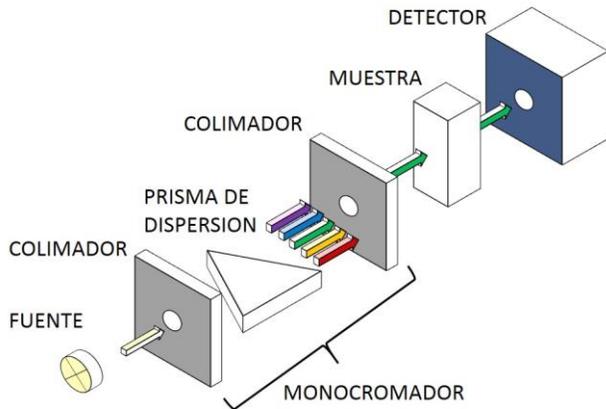


FIGURA 1. Estructura general de un espectrofotómetro UV-Vis.

Aunque la espectroscopia UV-Vis trabaja en un intervalo estrecho del espectro electromagnético, la información que genera es de suma importancia. Ésta es la espectroscopia más ampliamente utilizada de manera global. La espectroscopia UV-Vis ha sido empleada en diversas aplicaciones en el área biológica, esta técnica permite determinar la concentración de una solución mediante la ley de Beer-Lambert, así como la absorción molar y el coeficiente de extinción [3] pudiéndose cuantificar proteínas, determinar la actividad enzimática [4] y evaluar la viabilidad celular [5], entre otras diversas aplicaciones. El abanico de posibilidades que la espectroscopia UV-Vis permite para el estudio de las moléculas ha dado lugar a que se utilice como una herramienta básica en el estudio y abordaje de enfermedades de gran impacto social, como el cáncer.

En este sentido, se sabe que el cáncer de mama es el más común y el que mayor número de muertes causa a nivel global [6]. A pesar de los avances científicos y tecnológicos, las terapias actuales para tratar el cáncer de mama no son efectivas para todos los pacientes, por lo que es fundamental desarrollar nuevas terapias o mejorar las terapias existentes. En la lucha contra esta enfermedad, la identificación o síntesis de moléculas que permitan inducir la muerte de las células cancerosas es fundamental [7]. Para el desarrollo de estas moléculas es requerido, en algún momento, realizar la evaluación de la viabilidad celular, ya sea para corroborar que la molécula en cuestión no afecta a las células sanas o que es capaz de eliminar a las células tumorales [8]. Para ello se deben obtener resultados

precisos y confiables de la viabilidad celular *in vitro* durante las etapas iniciales de la investigación, ya que esta información influye directamente en el éxito del candidato a fármaco para su posterior desarrollo. Estos ensayos deben ser suficientemente sensibles para detectar pequeñas diferencias en el número de células viables, pero suficientemente robustos para generar resultados reproducibles bajo las condiciones experimentales controladas [9].

La viabilidad celular puede ser definida como el número de células sanas en una muestra, los métodos que cuantifican a la viabilidad de las células *in vitro* se pueden dividir en cuatro grupos:

- Ensayos reproductivos: determinan el número de células en un cultivo capaces de formar colonias; son los métodos más confiables para evaluar el número de células viables, sin embargo, consumen mucho tiempo y no son prácticos para analizar muchas muestras [10].
- Ensayos de síntesis de ADN: se realizan utilizando análogos de los nucleótidos, midiendo la incorporación de estos en el ADN. Estos ensayos implican el uso de radionucleótidos o anticuerpos monoclonales, lo que hace poco prácticos para analizar muchas muestras [10].
- Ensayos de permeabilidad: implican teñir a las células con pérdida en la integridad de su membrana, para discriminar a las células sanas; el método es rápido, económico y sólo requiere una pequeña fracción de la población celular, pero tiene la desventaja de que la célula puede tener un daño irreparable sin perder la integridad de la membrana, tendiendo a subestimar el número de células dañadas [10].
- Ensayos de actividad metabólica: se realizan agregando sales de tetrazolio a las células en cultivo. Las células viables tienen la capacidad de reducir a las sales de tetrazolio a formazán, mientras que las células con daño irreparable, o muertas, pierden esta capacidad. El formazán puede ser cuantificado mediante espectroscopia UV-Vis y los valores de absorbancia pueden ser correlacionados con la viabilidad celular [10].

El tetrazolio es una molécula cuya estructura corresponde a un anillo formado por cuatro átomos de nitrógeno y uno de carbono, este anillo se encuentra unido a tres sustituyentes. La reducción del tetrazolio da lugar a la apertura del anillo y a la generación de formazán (Figura 2). En el esqueleto del formazán existe un enlace de hidrógeno molecular pseudoaromático -NH-N, por tautomerización, que da lugar a un comportamiento más estable de la molécula. La absorción característica del formazán en la región visible es el resultado de transiciones electrónicas  $\pi^*$  [11].

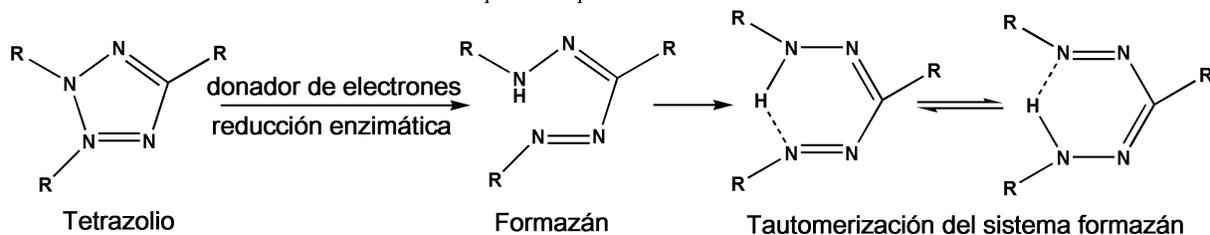


FIGURA 2. Reducción del tetrazolio a formazán durante la evaluación de la viabilidad celular mediante el estudio de la actividad metabólica.

En las moléculas orgánicas, los orbitales moleculares asociados con los enlaces sencillos se designan como orbital sigma ( $\sigma$ ), el doble enlace en una molécula orgánica contiene dos tipos de orbitales moleculares, un orbital  $\sigma$  correspondiente a un par de electrones enlazantes y un orbital molecular pi ( $\pi$ ) asociado con el otro par de electrones. También se pueden encontrar orbitales  $n$  conformados por electrones libres desapareados asociados con heteroátomos y tienen un carácter no-enlazante. Los orbitales moleculares  $\sigma$ ,  $\pi$  y  $n$ , están conformados por la superposición de los orbitales atómicos de los átomos que conforman a la molécula; los orbitales  $\sigma$  están conformados por la combinación de los orbitales atómicos  $s$  y  $p$ , y pueden ser de tipo enlazante ( $\sigma$ ) o antienlazante ( $\sigma^*$ ). Los orbitales  $\pi$  se conforman por la combinación de orbitales  $p$  de forma perpendicular al eje de enlace y de la misma manera puede ser de tipo enlazante ( $\pi$ ) o antienlazante ( $\pi^*$ ). Al absorber energía, los electrones de los orbitales  $\sigma$ ,  $\pi$  y  $n$  pueden pasar a un estado excitado generando transiciones electrónicas a los niveles energéticos  $\sigma^*$ ,  $\pi^*$  (Figura 3) [3].

En las moléculas orgánicas, los orbitales moleculares asociados con los enlaces sencillos se designan como orbital sigma ( $\sigma$ ), y sus electrones correspondientes, electrones  $\sigma$ . El doble enlace en una molécula orgánica contiene dos tipos de orbitales moleculares, un orbital  $\sigma$  correspondiente a un par de electrones enlazantes y un orbital molecular pi ( $\pi$ ) asociado con el otro par de electrones. Los orbitales sigma y pi antienlazantes se designan por  $\sigma^*$  y  $\pi^*$ , respectivamente.

Además de los electrones  $\sigma$  y  $\pi$ , en muchas moléculas orgánicas también se pueden encontrar orbitales  $n$  conformados por electrones libres desapareados asociados con heteroátomos y tienen un carácter no-enlazante. Los orbitales moleculares  $\sigma$ ,  $\pi$  y  $n$ , están conformados por la superposición de los orbitales atómicos de los átomos que conforman a la molécula; los orbitales  $\sigma$  están conformados por la combinación de los orbitales atómicos  $s$  y  $p$ , y pueden ser de tipo enlazante ( $\sigma$ ) o antienlazante ( $\sigma^*$ ). Los orbitales  $\pi$  se conforman por la combinación de orbitales  $p$  de forma perpendicular al eje de enlace y de la misma manera puede ser de tipo enlazante ( $\pi$ ) o antienlazante ( $\pi^*$ ).

Al absorber energía, los electrones de los orbitales  $\sigma$ ,  $\pi$  y  $n$  pueden pasar a un estado excitado generando transiciones electrónicas a los niveles energéticos  $\sigma^*$ ,  $\pi^*$  (Figura 3) [3].

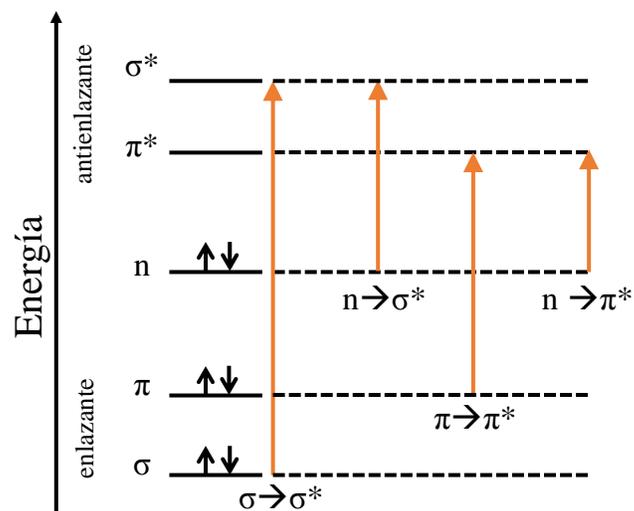


FIGURA 3. Transiciones electrónicas entre los niveles energéticos de los orbitales moleculares.

La mayoría de las aplicaciones de espectroscopia de absorción en compuestos orgánicos, al igual que en el caso del formazán, se basan en transiciones de electrones  $n$  y  $\pi$  al estado excitado  $\pi^*$  dado que la energía requerida para estos procesos produce picos de absorción entre 200 y 700 nm; ambas transiciones requieren la presencia de grupos funcionales no saturados que aportan los electrones  $\pi$ , estos centros absorbentes son denominados “cromóforos” [3].

La reducción del tetrazolio a formazán, por parte de las células, es catalizada por deshidrogenasas mitocondriales [12], además de otras enzimas presentes en estructuras celulares como el retículo endoplásmico [9], la membrana plasmática [12] y los lisosomas [13].

Los ensayos de actividad metabólica son rápidos y convenientes, debido a que el ensayo completo, desde la siembra de las células hasta el análisis de los datos, se realiza en la misma placa [10]; estos ensayos se utilizan como un indicador del porcentaje de células viables, donde la intensidad de la señal generada será proporcional al número de células viables que se encuentran presentes después de ser aplicado el tratamiento respectivo [8].

Estos ensayos utilizan una variedad de compuestos de tetrazolio para detectar células viables, los compuestos comúnmente utilizados se dividen en dos categorías, en la primera se considera al MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio), compuesto con carga positiva que penetra con facilidad a las células viables; en la segunda

categoría se incluyen el MTS, XTT y WST-1, compuestos con carga negativa que no penetran fácilmente a las células, por lo que requieren un aceptor de electrones intermedio que penetra a la célula viable, se reduce y sale para convertir el tetrazolio en formazán [8].

El ensayo MTT se ha convertido en el estándar de oro para la evaluación de la viabilidad celular, para su aplicación este es disuelto en buffer de fosfatos salino (PBS) y adicionado a las células en evaluación en concentración de 0.2 a 0.5 mg/mL. El MTT se incuba con las células por un periodo de 1 a 4 h. Las células viables con actividad metabólica convierten al MTT (de color amarillo) a formazán, el cual debe ser solubilizado con un disolvente orgánico como el dimetilsulfóxido (DMSO) y presenta un color morado, con una absorbancia máxima cercana a 570 nm. La intensidad de la señal generada es dependiente de varios parámetros como: la concentración de las sales de formazán, el tiempo de incubación, el número de células viables y la actividad metabólica celular. Todos estos parámetros deben ser considerados para optimizar las condiciones del ensayo [8].

Se recomienda que cada ensayo tenga su propio control interno para disminuir la variabilidad por parámetros como la concentración de la sal de tetrazolio y el tiempo de incubación; además, el efecto de los distintos compuestos a evaluar deberá ser probado, para todas las concentraciones, en la misma línea celular, para que la actividad metabólica sea la misma. Cada pozo deberá contener el mismo número de células, a fin de que los cambios en la intensidad del color medidos por espectroscopia sean originados exclusivamente por los cambios en el número de células viables, inducidos por las diferentes concentraciones del compuesto que se está evaluando. Se deben tener en cuenta variables como las potenciales interferencias con la reducción del MTT, la linealidad, la sensibilidad y la reproducibilidad de los ensayos [9].

Dentro de las ventajas atribuidas al ensayo MTT se encuentra que es bastante adecuado para el cribado de una gran cantidad de compuestos por la sencillez de la técnica y la capacidad de miniaturización. Mientras que algunas desventajas se refieren al hecho de que la conversión del sustrato a formazán depende de la tasa metabólica y del número de mitocondrias viables en la célula, así como al hecho de que son requeridos varios pasos intermedios antes de la lectura de la absorbancia [9].

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Obtención de los espectros de absorción del MTT y del formazán

Se preparó una solución de MTT en PBS (pH 7.4) a una concentración de 0.8 mg/mL y se obtuvo su espectro UV-Vis en un intervalo de 300 a 800 nm, el espectro del PBS también fue obtenido en el mismo intervalo.

Posteriormente, 7000 células/pozo de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 96 pozos en un volumen total de 100  $\mu$ L de medio

DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. Las células fueron incubadas durante 24 h a 37 °C, en ambiente húmedo con 5% de CO<sub>2</sub> para permitir la adherencia de las células a la superficie de la placa. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionaron 20  $\mu$ L de una solución de MTT en PBS (5 mg/mL) a cada pozo y se incubó la placa durante 1.5 h a 37 °C en oscuridad. Cumplido el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo por decantación y se adicionaron 100  $\mu$ L de DMSO para solubilizar a los cristales de formazán generados. La placa fue agitada para disolver adecuadamente los cristales de formazán y posteriormente se realizó la lectura de la absorbancia obteniendo el espectro UV-Vis en el intervalo de 300 a 800 nm. Este mismo procedimiento fue realizado en una placa sin células, a fin de obtener el espectro UV-Vis del MTT al interactuar con el medio de cultivo, sin la actividad metabólica de las células.

### B. Evaluación de la viabilidad de células de cáncer de mama expuestas a diferentes tratamientos

A continuación, esta metodología fue utilizada para evaluar la viabilidad de células de cáncer de mama (MDA-MB-231) expuestas al efecto de dos extractos crudos de muicle (*Justicia spicigera* Schult.), ambos obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido (25 kHz, 30 min); el primer extracto fue obtenido con un disolvente de alta polaridad (agua) y el segundo con un disolvente de baja polaridad (éter de petróleo).

Los dos extractos fueron probados a cuatro concentraciones distintas (15, 30, 45 y 60  $\mu$ g/mL) diluidas en DMSO al 0.2% v/v, con el propósito de calcular la concentración que se requiere para inhibir la viabilidad en el 50% de la población celular (CI<sub>50</sub>) [14]. En el ensayo también se utilizaron cuatro controles; el primero fue un control positivo: células tratadas con 0.25  $\mu$ g/mL de paclitaxel, que sirve para corroborar que la viabilidad de la línea celular es disminuida por un agente externo; el segundo fue un control negativo: células sin ningún tipo de tratamiento, para conocer la viabilidad de las células en condiciones normales; el tercero fue un placebo: células tratadas con DMSO al 0.2% v/v, que sirve para evaluar el posible efecto que pudiera tener el compuesto que se utilizó para disolver los diferentes extractos; y el cuarto fue el medio de cultivo sólo, que se utilizó para restar la absorbancia del residuo de medio de cultivo que queda en el fondo de la placa al decantarse antes de realizar la lectura.

Se realizaron seis réplicas de cada una de las condiciones para corroborar la reproducibilidad de los resultados y la baja variabilidad en el desarrollo de la técnica. Las condiciones también fueron probadas a dos tiempos de exposición (24 y 72 h), para evaluar el posible efecto que tiene el tiempo de exposición a los extractos en la viabilidad celular.

Los diferentes tratamientos para cada tiempo de exposición (24 y 72 h) se realizaron en la misma placa y con la misma línea celular para minimizar la variabilidad por parámetros como la concentración del tetrazolio, el tiempo de

incubación y la actividad metabólica. Después de cumplir su respectivo tiempo de incubación, se adicionó el MTT a los pozos, las placas se incubaron durante 1.5 h, se decantó el medio de cultivo y se adicionaron 100  $\mu$ L de DMSO a cada pozo. Finalmente, se obtuvo la absorbancia a 570 nm, mediante espectroscopia UV-Vis. Para cada uno de los tiempos de incubación de las células con los extractos, el cálculo de la viabilidad celular se realizó de la siguiente manera:

1. Se obtuvieron el promedio y la desviación estándar de la absorbancia para cada una de las condiciones evaluadas.
2. El promedio de la absorbancia del control con medio de cultivo sólo (sin células), se restó al promedio de la absorbancia de las demás condiciones evaluadas.
3. Los valores resultantes fueron comparados contra el control negativo (células sin tratamiento) que representa el 100% de la viabilidad. El porcentaje de células viables para cada condición se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{\text{Absorbancia de la condición evaluada}}{\text{Absorbancia del control negativo}} \times 100 \quad (3)$$

Posteriormente se realizó el cálculo de la  $CI_{50}$  mediante una regresión no lineal entre el porcentaje de células viables y el logaritmo de la concentración de los extractos ( $\mu$ g/mL), los extractos con una  $CI_{50} \leq 30$   $\mu$ g/mL fueron considerados con actividad citotóxica [15].

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### A. Espectros de absorción del MTT y del formazán

El espectro del MTT disuelto en PBS generó una banda con un máximo de absorción en 380 nm (Figura 4). Esta banda no fue observada en el espectro obtenido para el disolvente utilizado (PBS).

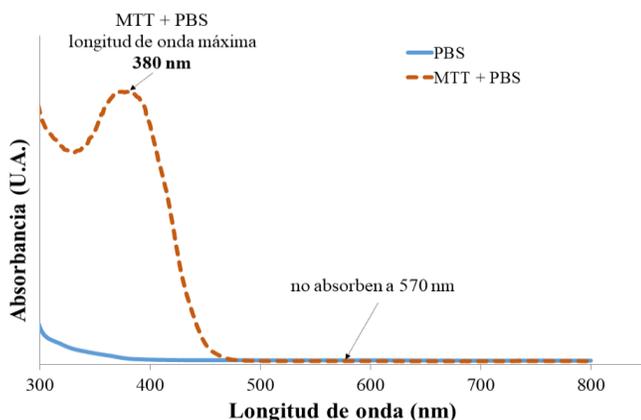


FIGURA 4. Espectros UV-Vis del MTT disuelto en PBS y del disolvente PBS sólo.

Al estudiar la reducción enzimática del MTT por parte de las células MDA-MB-231 (Figura 5) se observó una segunda banda entre 500 y 600 nm, con un máximo de absorción cercano a los 550 nm, esta banda corresponde al formazán generado por la actividad metabólica de las células. El MTT incubado sin células también generó absorción entre 500 y 600 nm pero con una intensidad menor. Esta absorción se debe al rojo de fenol [16] presente en el medio de cultivo, el cual deja residuos en los pozos de la placa tras ser decantado.

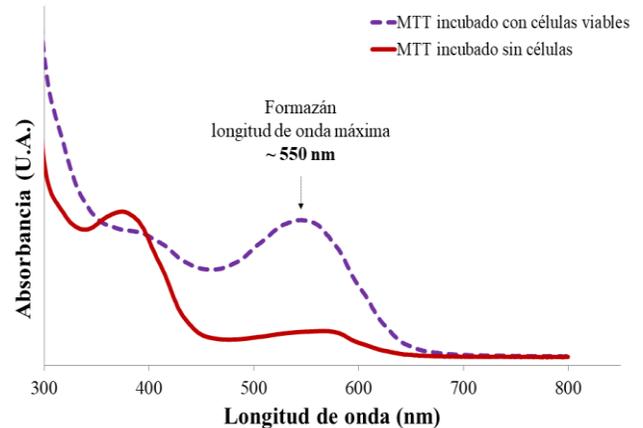
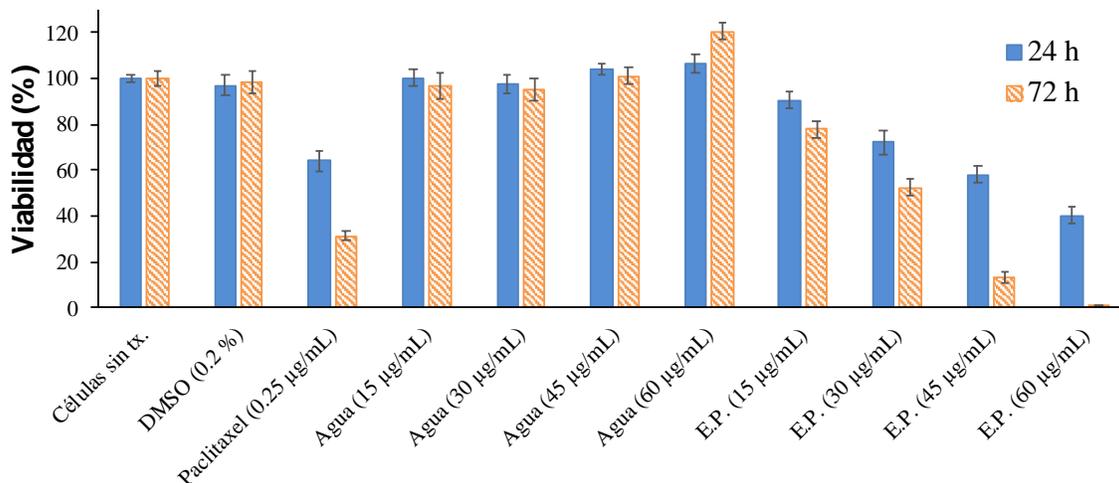


FIGURA 5. Espectros UV-Vis del MTT incubado por 90 min con células viables e incubado el mismo tiempo sin células.

#### B. Evaluación de la viabilidad de células de cáncer de mama expuestas a diferentes tratamientos

Al evaluar la viabilidad de las células de cáncer de mama expuestas a los dos extractos crudos de muicle (Figura 6), se observó un ligero incremento para las células expuestas al extracto obtenido en agua, particularmente a 72 h de exposición con 60  $\mu$ g/mL; por otro lado, el extracto obtenido en éter de petróleo causó el efecto contrario, mostrando una disminución en la viabilidad celular para todas las dosis evaluadas, desde las 24 h de exposición, alcanzando nula viabilidad celular (0%) con 60  $\mu$ g/mL a 72 h. Ambos efectos, tanto el incremento, como la disminución de la viabilidad celular, inducidos por los extractos, fueron dependientes de la dosis y del tiempo de exposición. La  $CI_{50}$  para el extracto en éter de petróleo a 24 h fue de 51.6  $\mu$ g/mL, con una  $R^2$  de 0.964 para la recta de ajuste; a 72 h se obtuvo una  $CI_{50}$  de 26  $\mu$ g/mL, con una  $R^2$  de 0.9582 para la recta de ajuste. El extracto en éter de petróleo se consideró citotóxico.



**FIGURA 6.** Ensayo de viabilidad en células de cáncer de mama (MDA-MB-231) con los extractos obtenidas con agua y éter de petróleo de muile, después de 24 y 72 h de exposición.

#### IV. CONCLUSIONES

La espectroscopia UV Vis es una metodología confiable y robusta en la evaluación de la viabilidad de las células por efecto del MTT, que funciona como un compuesto cromóforo tras su reducción por enzimas activas intracelulares.

El MTT disuelto en PBS no absorbe en el visible por encima de los 500 nm, mientras que tras su conversión a formazán genera una banda de absorción característica entre los 500 y 600 nm originada por transiciones electrónicas  $\pi$ - $\pi^*$ .

Con los porcentajes de viabilidad obtenidos se calculó la  $CI_{50}$  para el extracto en éter de petróleo, determinándose que este extracto es citotóxico y probablemente, las moléculas presentes en la mezcla, podrían ser candidatos a fármacos para el tratamiento del cáncer de mama. El ensayo MTT constituye una evaluación inicial clave en el desarrollo y la identificación de moléculas para tratar al cáncer.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la Secretaría de Investigación y Posgrado de Instituto Politécnico Nacional y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del programa Cátedras CONACYT, Proyecto de Cátedras No. 1728

#### REFERENCIAS

[1] Perkampus, H.H., *Introduction. In: UV-VIS Spectroscopy and Its Applications.* (Springer Lab Manuals, Berlin, 1992).

[2] Owen, T., *Fundamentals of UV-Visible Spectroscopy: A Primer.* (Agilent Technologies, Germany, 2000).

[3] Skoog, D.A., Holler, F. J., Crouch, S.R., *Principios de análisis instrumental*, 6a Ed. (CENGAGE Learning, México, 2008).

[4] Bacon, C. P., Mattley, Y., DeFrece, R., *Miniature spectroscopic instrumentation: Applications to biology and chemistry.* Rev. Sci. Instrum **75**:1, 1-16 (2004).

[5] Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., Villanueva, A., *MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets.* Acta Histochem **114**:8, 785-796 (2012).

[6] Global Burden of Disease Cancer Collaboration., *Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study,* JAMA Onco **3**, 524–548 (2017).

[7] Ke, X., Shen, L., *Molecular targeted therapy of cancer: The progress and future prospect,* Frontiers in Laboratory Medicine **1**, 69–75 (2017).

[8] Sittampalam, G. S., Coussens, N. P., Brimacombe, K., et al., *Assay Guidance Manual,* (Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda, 2004).

[9] Van Tonder, A., Joubert, A. M., Cromarty, A. .D., *Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays,* BMC Research Notes **8**:47 (2015).

[10] Rode H. J., *Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation, 4th ed.* (Roche Diagnostics GmbH, Germany, 2008).

[11] Turkoglu, G., Berber, H., Kani, I., *Synthesis, crystal structure, optical and electrochemical properties of novel diphenylether-based formazan derivatives,* New J. Chem. **39**, 2728–2740 (2015)

- [12] Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S. and Hübner, H., *Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. In: Cell Viability Assays. Methods in Molecular Biology*, (Humana Press, New York, 2017).
- [13] Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H. and Schubert, D., *Mechanism of Cellular 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction*, *J. Neurochem* **69**, 581-593 (1997).
- [14] Feng, C., Zhou, L., Yu, T., Xu, G., Tian, H., Xu, J., Xu, H. and Luo, K.Q., *A new anticancer compound, Oblongifolin C, inhibits tumor growth and promotes apoptosis in HeLa cells through bax activation*. *Int. J. Cancer* **131**, 1445-1454 (2012).
- [15] Alonso-Castro, A. J., Villarreal, M. L., Salazar-Olivo, L. A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F. and Garcia-Carranca, A., *Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies*. *J Ethnopharmacol* **133**, 945-972 (2011).
- [16] Pizarro, G., Ríos, E., *How Source Content Determines Intracellular  $Ca^{2+}$  Release Kinetics. Simultaneous Measurement of  $[Ca^{2+}]$  Transients and  $[H^+]$  Displacement in Skeletal Muscle*. *J Gen Physiol* **124**, 239-258 (2004).