

CITOTOXICIDAD, ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE *Cucumis dipsaceus*

Ahmed M. Salama*¹, Oscar Orozco**, Ana Celina Angel E.*, Sandra Ximena Urrea B.*

* Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, A.A 14490, Santafé de Bogotá, Colombia.

*¹ E.mail: ahmedsa@ciencias.ciencias.unal.edu.co

**Laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Cancerología, Santafé de Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Los resultados del presente trabajo mostraron que los extractos etanólicos de los frutos y de los tallos con hojas de *Cucumis dipsaceus*, presentaron un alto porcentaje de citotoxicidad en las líneas celulares tumorales K562 y Hep-2. El efecto antitumoral se reveló por el método de disco de zanahoria contra los tumores producidos por el microorganismo *Agrobacterium tumefaciens*. El estudio fitoquímico preliminar mostró la presencia de esteroides, triterpenos y flavonoides.

Palabras clave: *Cucumis dipsaceus* – Cucurbitaceae – Actividad citotóxica y antitumoral – Análisis fitoquímico.

SUMMARY

CYTOTOXIC, ANTITUMOR EFFECT AND PHYTOCHEMICAL SCREENING OF *Cucumis dipsaceus*

The results of the present work showed a high cytotoxic percentage against the human tumoral cellular lines K562 and Hep-2 of the ethanolic extracts of the fruits and of the shafts with leaves of *Cucumis dipsaceus*. The antitumor effect was demonstrated by the method of carrot disk, against the tumors produced by the microorganism *Agrobacterium tumefaciens*. Phytochemical screening showed the presence of sterols, triterpenes and flavonoids.

Key Word: *Cucumis dipsaceus*, - Cucurbitaceae - Cytotoxic and antitumor activity - Phytochemical screening.

INTRODUCCIÓN

Al tener a la naturaleza como fuente de obtención de nuevas sustancias, la posibilidad de encontrar sustancias potencialmente bioactivas es muy grande; es por eso que con el fin de contribuir en la búsqueda de compuestos potencialmente bioactivos y en reconocimiento de la flora Colombiana, se tomó la especie *Cucumis dipsaceus* de la familia *Cucurbitaceae*, para realizar el estudio fitoquímico preliminar (1), la toxicidad que se determinó mediante la prueba de letalidad en *Artemia salina* (2,3) y la actividad antitumor que se estudió utilizando el ensayo del disco de zanahoria que mide la capacidad de los extractos de inhibir el crecimiento de tumores en corona sobre discos de zanahoria, infectados con la bacteria Gram (-) *Agrobacterium tumefaciens* (4,5).

Reconociendo que muchos compuestos antitumorales son citotóxicos, se realizó el ensayo de citotoxicidad en dos líneas celulares tumorales humanas y en células normales estimuladas con Fitoheماغlutinina (PHA), para visualizar diferencias en el efecto citotóxico, el cual se midió a través de la técnica que usa el bromuro de 3-(4,5 dimetiliazol - 2 - il) - 2,5 - difenil tetrazolio (MTT), que permite observar la actividad celular (6,7). Los resultados mostraron que los extractos etanólicos de los frutos y de los tallos con hojas de la planta, tenían un alto porcentaje de citotoxicidad contra las líneas celulares tumorales estudiadas. El efecto antitumoral se demostró por los resultados

Recibido para evaluación: Septiembre de 1999

Aprobado para publicación: Octubre de 1999

obtenidos por el método de disco de zanahoria contra los tumores producidos por el microorganismo *Agrobacterium tumefaciens*. El estudio fitoquímico preliminar mostró la presencia de esteroides, triterpenos y flavonoides.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y métodos

El material vegetal se recolectó en la hacienda Tonchala 4 kilómetros antes de Arbelaez, Departamento de Cundinamarca, Colombia, a 1200 m sobre el nivel del mar. La clasificación taxonómica de la planta fue realizada por el Profesor Santiago Díaz Pedraza del Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia como *Cucumis dipsaceus*, de la familia Cucurbitaceae. Un ejemplar se encuentra depositado en el Herbario Nacional Colombiano con el número Col.278873.

Preparación de la muestra y obtención de los extractos

Estudio Fitoquímico Preliminar. El material vegetal se secó a una temperatura de 50°C, en una estufa con circulación de aire caliente. El material seco se molió y se guardó en un recipiente limpio y seco para su posterior uso. Del material vegetal seco y molido se pesaron 100 g de los tallos con hojas y de los frutos para ser extraídos exhaustivamente por maceración con 200 mL de etanol del 96%. Los extractos se filtraron y se evaporaron en rotavapor hasta sequedad. Los extractos secos de cada parte de la planta se guardaron para el estudio fitoquímico, que fue realizado de acuerdo con la metodología adaptada en el laboratorio de fitoquímica, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia (1).

Actividad biológica

Para llevar a cabo la determinación de la actividad biológica se prepararon los extractos de los frutos y de los tallos con hojas y un extracto de un pasto, *Pennisetum sp.*, como control negativo, para observar cualquier efecto de posibles residuos

del disolvente utilizado en la extracción (etanol), utilizando 50 g secos y molidos de cada uno de los materiales seleccionados, los cuales se dejaron en maceración con 100 mL de etanol del 96% por 48 horas. Los extractos se filtraron y se evaporó el solvente en un rotavapor.

Ensayo de letalidad sobre Artemia salina

A partir del residuo seco de cada uno de los extractos se preparó una solución madre de 3 mg/mL en una mezcla de agua - DMSO (75:25), de esta solución se prepararon diluciones de 1000, 100 y 10 µg / mL en una placa de 24 pozos, transfiriendo a cada pozo 1.0, 0.1 y 0.01 mL de la solución madre respectivamente. En cada pozo se agregaron 10 larvas (40 larvas por dilución), y se completó a un volumen final de 3 mL por pozo con solución salina al 3.8%. A cada pozo se le adicionó una gota de suspensión de levadura como alimento para la larva. Para cada concentración se realizaron 4 réplicas con su respectivo blanco y cada ensayo se realizó por triplicado. Luego de 24 horas de contacto con los extractos, se contaron las larvas muertas en cada pozo, para cada concentración y para el blanco; este mismo procedimiento se realizó para 3 patrones empleados (sulfato de estricnina, clorhidrato de efedrina y nicotina), con CL₅₀ reportadas. Los datos se analizaron en un programa de computadora Finney para determinar los valores de CL₅₀. Los extractos con valores de CL₅₀ menores de 1000 ppm se consideraron activos (2,3).

Actividad antitumoral en discos de zanahoria

Fue necesario adaptar el microorganismo y realizar una curva de crecimiento, con el fin de determinar el tiempo en el que hay mayor densidad de población (8). Previamente a la actividad antitumoral, se evaluó la capacidad de los extractos de inhibir directamente el crecimiento del microorganismo *Agrobacterium tumefaciens*, por medio de un ensayo de actividad antimicrobiano en el cual se preparó una solución madre de 1.0 mg/mL de los extractos en agua - DMSO (75:25) y a partir de ésta se prepararon diluciones de 100 y 10 µg / mL. Se preparó el medio de cultivo que se esterilizó a

121°C por 15 minutos. Se inoculó el microorganismo, previa adaptación y se sirvió en las cajas de petri, se dejó solidificar el agar y posteriormente se realizaron 4 perforaciones opuestas con sacabocados de 0.5 cm de diámetro, en cada caja se colocaron las soluciones de la siguiente sustancias: patrón (sulfato de estreptomina), solvente del patrón (agua), extracto etanólico y solvente del extracto (DMSO). Las cajas se incubaron a 28°C por 48 horas, para luego realizar las lecturas midiendo los diámetros de los halos de inhibición, descontando el diámetro de la perforación. El ensayo se realizó por triplicado para cada concentración (5,9).

Para realizar la actividad antitumoral como tal, se usaron diluciones, preparadas a partir de una solución madre de 1 mg/mL de cada uno de los extractos disolviéndolos en una mezcla de agua - DMSO (75:25). Esta solución se filtró a través de un filtro Millipore de 0.22 micras, se recibió en frascos de vidrio estériles y luego se midieron los volúmenes necesarios para obtener las concentraciones seleccionadas (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81 y 3.90 µg / mL) y se llevó a un volumen de 2 mL con agua estéril; posteriormente se adicionaron 2 mL de caldo que contenía *A. tumefaciens* de 48 horas de crecimiento. Las raíces de zanahoria se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% durante 30 minutos, se lavaron con agua estéril, se desecharon los extremos, y se cortaron discos de 0.5 cm de espesor mediante técnica aséptica. Tres discos de zanahoria eran colocados en cada caja de petri, que contenían un soporte de papel filtro húmedo. Cada disco se inoculó con 100 microlitros de la mezcla extracto-microorganismo. Se preparó un control del solvente (agua - DMSO) sin extracto y un blanco para el solvente (agua). Las cajas de petri se guardaron a temperatura ambiente y se realizó la lectura a los 10, 25 y 30 días (5,10).

Ensayo de citotoxicidad

Para llevar a cabo la medida de la citotoxicidad fue necesario realizar una serie de pasos:

Acondicionamiento de los extractos. Apartir del residuo seco de los extractos etanólicos de

frutos, tallos con hojas y pasto se prepararon soluciones madre de 50 mL de una concentración de 1.0 mg/mL, en el medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% y con 5 gotas de DMSO para mejorar la solubilidad del extracto en el medio. Estas soluciones madres se filtraron por membranas Millipore de 0.45 y 0.22 µm, todo bajo condiciones asépticas y en cabina de flujo laminar, para luego ser congeladas a - 80° C. Partiendo de una alícuota de concentración de 1 mg/mL, se prepararon 8 concentraciones finales de 50, 100, 200, 250, 300, 350, 400 y 500 µg / mL.

Manejo de líneas celulares tumorales. Las líneas celulares tumorales estaban con-servadas en viales con DMSO y suero fetal bovino al 50%, en un tanque de nitrógeno líquido a - 130°C. El vial se sacó del tanque y se colocó en agua a 37°C para descongelar rápidamente las células. Las operaciones posteriores se realizaron en cabina de flujo laminar. Una vez descongelada, la suspensión de células se pasó a un tubo de 15 mL con 10 mL de RPMI 1640 para realizar lavados sucesivos con el fin de retirar posibles residuos de DMSO, ya que aunque es un agente criopreservante, a temperatura ambiente es tóxico para las células. La suspensión se lavó dos veces con medio RPMI 1640, centrifugando por 10 minutos a 1200 r.p.m., un tercer lavado se realizó con RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, el sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en un volumen de RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, el cual se trasvasaba a una caja con el fin de dejar las células en un medio nutritivo para su proliferación; las células K562 necesitaban de un periodo de 24 horas para obtener un crecimiento óptimo, mientras que las células Hep-2 por ser adherentes necesitaban de un periodo de 48 horas para formar una monocapa de crecimiento adecuada.

Luego de este tiempo se procedió a retirar las células de la caja, obteniéndose una suspensión de ellas; en el caso de las células Hep-2 era necesario adicionar tripsina para despegar la monocapa, por lo cual se debían realizar lavados a dichas células con el fin de retirar los excesos de tripsina en ellas, ya que este compuesto es nocivo para la célula. Una vez obtenida la suspensión de las células se

procedió a realizar el conteo (11), para lo cual se colocaron volúmenes iguales, en un vial, de la suspensión celular y el colorante azul tripan, con el fin de obtener una dilución 1:2; se agitó bien para obtener homogeneidad y un volumen de esta mezcla se colocó en la cámara de Neubauer. Las células que no toman el colorante, es decir las que están vivas, se cuentan por cuadrante, obteniendo un promedio del número de células que se multiplica por el factor de la dilución, por el volumen de suspensión y por 10000, que es un factor de conversión de milímetros cuadrados a centímetros cúbicos (11) obteniéndose un valor promedio del número de células en la suspensión.

Una vez realizado el recuento, se tomó un volumen determinado de la suspensión celular para preparar la nueva suspensión que nos aseguraba el número de células que se necesitan por pozo en la placa; este número se determinó previamente para el desarrollo de la metodología siendo de 20000 células por pozo en un volumen de 100 microlitros. Por medio de una micropipeta repetidora se sembraron las células en la placa. Luego de haber sembrado las células en las cajas, se llevaron a incubación a 37° C con atmósfera húmeda y CO₂ al 5%. Las células Hep-2 se sembraban 24 horas antes de colocarlas en contacto con los extractos ya que son células adherentes para que formen una monocapa homogénea; las células K562 por ser células en suspensión se sembraban al mismo tiempo con el extracto necesario para obtener las concentraciones deseadas y se completó a un volumen final de 200 microlitros por pozo (11), con medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%.

Medida de la viabilidad celular. Método MTT. Sembradas las células, éstas se colocaron en contacto con las diferentes concentraciones de los extractos de frutos, tallos con hojas, pasto y azida de sodio de una concentración de 50mg/10mL; cada una de estas sustancias disueltas en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con SFB al 10% y en una cantidad adecuada para realizar cada dilución por pozo. Una vez colocados los extractos, se selló la caja y se llevó a la incubadora por 24 horas a 37°C, en atmósfera húmeda y CO₂ al 5%. Pasadas las 24 horas se

colocó el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol - 2 - il) - 2,5 - difenil tetrazolio); de modo que quedara en proporción 1:10 con respecto al volumen final, de una concentración de 4 mg/mL y se incubó por 4 horas, las anteriores condiciones se determinaron por ensayos previos dentro del presente trabajo. Pasadas las 4 horas se centrifugó la caja por 10 minutos a 1200 r.p.m. y posteriormente se retiraron con micropipeta 150 microlitros del volumen total por pozo evitando al máximo la pérdida de cristales de formazan formados, se adicionaron 150 microlitros de DMSO y luego se agitó por 30 minutos. Culminado este tiempo se realizaron las lecturas en un lector multipozos MCC 340 a 560 nm, con un filtro de referencia de 690 nm (12-16). Obteniendo esta lectura de absorbancia se procedió a calcular el porcentaje de citotoxicidad para cada uno de los extractos. De igual manera se realizó este mismo procedimiento para linfocitos de un individuo sano, con el fin de observar la diferencia en la citotoxicidad de los extractos hacia células tumorales y células normales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio fitoquímico preliminar

El estudio fitoquímico preliminar mostró la presencia de esteroides y/o triterpenos en los extractos etanólicos de los tallos con hojas y de los frutos por medio del ensayo de Liebermann Burchard en cromatografía de capa delgada. Los resultados del presente trabajo confirmaron nuevamente que los esteroides y triterpenos son compuestos comunes en las especies de la familia *Cucurbitaceae*, las cuales se consideran una buena fuente de ellos. Los ensayos para flavonoides que poseen en su estructura el núcleo de la γ -benzopirona (flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, isoflavonas y xantonas) mostraron que estos compuestos se encuentran en el extracto etanólico de los tallos con hojas en mayor proporción que en el extracto etanólico de los frutos. Aunque los flavonoides no son muy comunes en las cucurbitáceas, trabajos anteriores han reportado la presencia de flavonoides en algunas especies de la familia (17).

Actividad biológica

Ensayo de letalidad en *Artemia salina*. Las concentraciones utilizadas para el bioanálisis de los extractos etanólicos de los frutos y de los tallos con hojas fueron: 10, 100 y 1000 µg/mL de residuo seco en solución con agua - dimetilsulfóxido (DMSO) 75:25; por ser el intervalo de concentraciones que mostró los mejores resultados para la planta y no causó 100% de mortalidad en todas las concentraciones. Paralelamente a las diluciones de los extractos de la planta, se ensayaron sustancias patrones (sulfato de estricnina, clorhidrato de efedrina y Nicotina) a concentraciones de 10, 100 y 1000 µg/mL de sustancia en el mismo disolvente utilizado para los extractos, esto se hizo con el fin de obtener la respuesta de los camarones con sustancias de actividad conocida y cuya concentración letal 50 se encuentra reportada (6,18) pudiendo establecer comparaciones entre la respuesta obtenida con el camarón para los extractos de la planta estudiada y los patrones. Con los datos obtenidos se aplicó el análisis estadístico por Probits, para determinar la CL₅₀, tanto de los patrones como de los extractos de la planta. Las CL₅₀ encontradas fueron: 323 µg/mL para el extracto etanólico de frutos y 463 µg/mL para el extracto etanólico de tallos con hojas, valores menores a 1000 µg/mL por lo cual los extractos se consideran bioactivos.

Actividad antitumoral

Ensayo en discos de zanahoria. El tiempo óptimo de crecimiento para el *Agrobacterium tumefaciens* determinado por la curva de crecimiento fue de 48 horas, posteriormente se realizó la actividad antimicrobiana y de acuerdo a los resultados obtenidos puede decirse que los extractos no inhiben de forma apreciable el crecimiento del *Agrobacterium tumefaciens* a las concentraciones de 1000, 100 y 10 µg / mL, por lo cual se elimina la posibilidad de tener falsos positivos en la actividad antitumoral. Los resultados muestran un efecto antitumoral alto y el extracto etanólico de los frutos presentó una mayor capacidad para inhibir el crecimiento de los tumores que el extracto etanólico de los tallos con hojas, ya que a la misma concentración, el extracto

etanólico de los frutos disminuyó en forma considerable el tamaño y número de tumores presentes en la zanahoria, mientras que el mismo efecto era menos marcado para el extracto etanólico de tallos con hojas. Los resultados se encuentran concordantes con los obtenidos en el bioensayo con *Artemia salina*.

Ensayo de citotoxicidad. Se determinaron las mejores condiciones que presentaron reproducibilidad en los resultados:

- Tipo de células tumorales a emplear: Células Hep-2 y Células K562.
- Número de células por pozo: 20000 por pozo para el desarrollo de la técnica.
- Tiempo de incubación del MTT con las células: 4 horas.
- Volumen de MTT adicionado: 1:10 con respecto al volumen final del pozo.
- Volumen y tipo de solvente utilizado en la solubilización de los cristales de formazan: 150 µL de DMSO por pozo.
- Solubilización de los residuos secos de los extractos etanólicos: en el medio de crecimiento en el que se encontraban las células (RPMI con SFB al 10%), con unas gotas de DMSO.

Estas condiciones se fijaron por ensayos previos. Una vez establecidas las mejores condiciones se realizaron tres ensayos consecutivos con las líneas celulares tumorales, para comparar el grado de citotoxicidad de los extractos. Se realizó un ensayo similar con células normales estimuladas con PHA. A los datos de densidad óptica obtenidos, se les realizó una prueba de BONDAD DE AJUSTE (19), determinando que nuestra población de datos seguía una distribución normal, por lo que se le aplicó el modelo estadístico de t Student. Luego, con los mejores datos de absorbancia por concentración se procedió a calcular el porcentaje de citotoxicidad para cada extracto utilizando la siguiente fórmula (20,21):

$$\% \text{ Citotoxicidad} = 100 - \left[\frac{\text{DO problema}}{\text{DO blanco}} \right] * 100$$

DO problema: pozo con células, extracto y medio
DO blanco: pozo con medio y solvente, pero sin células.

Estos datos se linealizaron para poder estimar el grado de citotoxicidad a cualquier nivel de concentración y así poder determinar la concentración letal 50 (CL₅₀). Este procedimiento se realizó para los extractos etanólicos de frutos y tallos con hojas de la planta en estudio contra las células K562 y las células Hep-2. En la Tabla 1 se encuentran los datos de la CL₅₀ obtenidos, en donde se observa que los frutos poseen una mayor citotoxicidad con respecto a los tallos con hojas, debido a que para alcanzar la concentración letal 50 con el extracto de tallos con hojas, es necesario una mayor concentración con respecto a la necesaria para los frutos; esto nos confirma lo encontrado en el estudio fitoquímico preliminar ya que los compuestos que se creen responsables de la bioactividad, triterpenos tetracíclicos y/o pentacíclicos como las cucurbitacinas y otras sustancias, se encuentran en mayor cantidad en los frutos de la planta. Además, este ensayo correlaciona con los resultados obtenidos en el presente trabajo en el ensayo de letalidad en *Artemia salina* y la actividad antitumoral en disco de zanahoria. Los resultados del ensayo de citotoxicidad por el método del MTT para los extractos etanólicos de los frutos y de los tallos con hojas mostraron un alto efecto antitumoral, manifestado por la mortalidad de las células K562 y Hep-2. En el ensayo realizado sobre células normales estimuladas con PHA se encontró

un efecto citotóxico menor el cual se representa en el valor de CL₅₀ reportado (Tabla 1). Los valores de CL₅₀ para los extractos de la planta *C. dipsaceus* son por razones obvias mayores que los valores de CL₅₀ de sustancias como vincristina y prednisolona (20), ya que éstas son sustancias puras mientras que el o los principios activos responsables de la actividad antitumoral y citotóxica no se encuentran en un estado puro, además se hallan diluidos en una mezcla con otros compuestos en el extracto de la planta.

La concentración letal 50 de las células normales calculada y comparada con las halladas para la línea celular tumoral K562, por ser diferente y un poco mayor, nos hace pensar que sí existe algún grado de especificidad del extracto por las células tumorales. Esta respuesta obtenida se puede atribuir a la presencia de esteroides y triterpenos, como las cucurbitacinas en la planta, las cuales se han relacionado durante mucho tiempo con esta actividad biológica. Además estudios reportados para extractos de las semillas de *Iberis amara*, de cuya especie se han aislado las cucurbitacinas I y E, han mostrado una citotoxicidad diferencial hacia tumores renales, tumor cerebral y líneas celulares de melanoma. Este mismo tipo de selectividad se ha reportado para extractos de *Begonia plebeja* y de *Gonystylus keithii*, de las cuales se aislaron las cucurbitacinas B y D respectivamente (22).

Tabla 1: Concentración Letal 50 (CL₅₀) de los Extractos y Patrones

Tipo de Células	Extracto de Frutos (µg/ml)	Extracto de Tallos con Hojas (µg/ml)	Vincristina (µg/ml)	Prednisolona (µg/ml)
K562	297.503	327.940	---	---
Hep-2	343.485	359.132	---	---
Normales	373.812	441.868	---	---
Leucemia	---	---	6.48 +/- 7.77	57.6 +/- 92.2

BIBLIOGRAFÍA

1. A. Sanabria Galindo. Análisis fitoquímico preliminar, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia, Bogotá, 1983.
2. CYTED, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Manual de Técnicas de Investigación, Marzo, 1995.
3. A. M. Salama, A. Hinestroza, M. Chávez. Fito y bioanálisis de algunas plantas utilizadas en la medicina popular con posible actividad farmacológica. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, **25**, 44, (1996).
4. J. McLaughlin, J. E. Anderson. Tres bioensayos simples para químicos de productos naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Química*, **18**, 4, 13, (1995).
5. C. Fonseca, L. Rengifo. "Aislamiento y determinación de la CI_{50} y la actividad Antitumoral de (+) - Curcufenol de la esponja marina *Didiscus oxeata*", Tesis, departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, 1996.
6. J. McLaughlin, C. M. Goetz, J. Anderson, M. Suffness. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical analysis*, **2**, 107, (1991).
7. D. Gerlier, N. Thomasset. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation, *Journal of Immunological Methods*. **94**, 57, (1986).
8. A. Chaparro. "Producción de plantas transgénicas en tabaco (*Nicotina tabacum*) resistentes al herbicida fosfinotricina, mediante transformación con *A. Tumefaciens*", Tesis para Ingeniero Agrónomo, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, 1995.
9. M. Pinzón, M. Gamboa. Citotoxicidad, actividad antimicrobiana y antitumoral de la Variabilina aislada de la esponja marina *Ircinia felix*, Tesis para título Químico Farmacéutico, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, 1997.
10. A. M. Salama. Profesor asociado, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Comunicación personal, 1998.
11. S. Quijano. Laboratorio de Inmunología, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, Colombia, Comunicación Personal. 1998
12. C. F. Chen, J. M. Hwang. Evaluation of a rapid tetrazolium-based colorimetric assay for selecting anticancer drugs, *Chung Hual Hsueh Tsa Chih (Taipei)*, **46:1**, 7, (1990).
13. H. Jiao, Y. Soejima, Y. Ohe. Differential macrophage-mediated cytotoxicity to P388 leukemia cells and its drug resistant cells examined by a new MTT assay, *Leuk. Res.*, **16:12**, 1175, (1992).
14. A. Van de Loosdrecht. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from lines and patients with acute myeloid leukemia, *J. Immunological Methods*, **174:1-2**, 311, (1994).
15. Y. Liu, D. A. Peterson. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction, *J. Neurochem*, **69**, 581, (1997).
16. R. F. Hussain, A. M. Nouri, R.T. Oliver. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay, *J. Immunological Methods*, **60:1**, 89, (1993).
17. B. A. Bohm, K. W. Nicholls. *J. of Natural Products*, **45**, (4), 453, (1982).
18. B. Meyer, M. Ferrigni, J. McLaughlin. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents, *J. of Medicinal Plant Research*, **45**, 31, (1982).
19. R. Walpole, R. Meyers. Probabilidad y estadística. Cuarta edición, 1995.
20. R. Pieters, J. L. Gertjan, E. Klumper. Clinical relevance of In vitro drug resistance testing in childhood acute lymphoblastic leukemia: The state of the Art, *Medical and Pediatric Oncology*, **22**, 299, (1994).
21. B. R. Pieters. In Vitro drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions, *Blood*, **76**, 2327, (1990).
22. R. W. Fuller, J. H. Cardellina, M. R. Boyd. Cucurbitacins- differential cytotoxicity, dereplication and first isolation from *Gonystylus keithii*, *J. Of Natural products*, **57**, 1442, (1994).