

Evaluación preliminar *in vitro* de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos

In vitro preliminary cytotoxicity testing of vegetal extracts, using colorimetric methods

Claudia Patricia Cordero Camacho*, Fabio Ancízar Aristizábal Gutiérrez*

RESUMEN

Para avanzar en el estudio de la biodiversidad vegetal colombiana, considerada como fuente potencial de productos farmacológicamente activos, es necesario establecer sistemas de evaluación de actividad biológica que permitan detectar productos activos en patologías de alto impacto social y económico, como es el cáncer. Este trabajo describe la implementación de una metodología preliminar *in vitro* para determinar la potencial actividad anticáncer de extractos vegetales, evaluando su citotoxicidad sobre líneas celulares derivadas de tumores humanos, midiendo indirectamente la masa celular mediante los ensayos colorimétricos de reducción del MTT (metil tiazol tetrazolio) y tinción con SRB (Sulforodamina B). Se adaptaron los cultivos de las líneas celulares HT-29, MCF-7, SiHa y HEp-2; igualmente se seleccionaron los parámetros para la valoración de citotoxicidad: concentración de MTT, densidad celular y período de tratamiento; se comprobó la sensibilidad de las líneas celulares al agente quimioterapéutico Doxorubicina-HCl y se evaluó la citotoxicidad de extractos de especies vegetales colombianas, evidenciando la utilidad de la valoración como herramienta para bioguiar la búsqueda de extractos activos.

Palabras clave: anticáncer, citotoxicidad, MTT, SRB, líneas celulares

ABSTRACT

To advance in the study of the Colombian vegetal biodiversity, considered as a potential source of pharmacologically active products, the establishment of biological activity evaluation systems is necessary, which allow the detection of active products against pathologies with high social and economical impact, such as cancer. This work describes the implementation of a preliminary *in vitro* methodology for the determination of potential anticancer activity in vegetal extracts, by cytotoxicity testing upon human tumor cell lines, measuring the cellular mass indirectly with the colorimetric assays of MTT (methyl tetrazolium tiazole) reduction and SRB (sulforhodamine B) staining. HT-29, MCF-7, SiHa and HEp-2 cell lines cultures were adapted, MTT concentration, cellular density and treatment period parameters for the cytotoxicity assay were selected. Cell lines sensitivity to the chemotherapeutic agent Doxorubicin HCl was determined. Colombian vegetal species extracts cytotoxicity was tested and usefulness of the assay as a tool to bioguide the search of active products was evidenced.

Key words: anticancer, cytotoxicity, MTT, SRB, cell lines.

INTRODUCCIÓN

Los recursos biológicos existentes en Colombia son considerados como una fuente potencial de productos con actividad farmacológica. Por largo tiempo han sido el objeto de estudio de varios grupos de investigación, que han abordado

de forma amplia los primeros pasos del proceso de investigación y desarrollo de nuevos principios activos extraídos de plantas, incluyendo la selección de especies con base en información etnomédica, el análisis químico preliminar para

* Químicos farmacéuticos, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Edificio 450, Ciudad Universitaria, Carrera 30-Calle 45, Bogotá D.C., Colombia, Sudamérica, A.A. 14490. Fax: 3165060. Correo electrónico: fabioaris@ibun.unal.edu.co

identificar el tipo de compuestos presentes y la evaluación de la actividad biológica general a través de bioensayos de toxicidad en *Artemia salina*, *Daphnia magna* y otros modelos biológicos (Sanabria, 1997). Para seguir avanzando se hace necesario establecer sistemas de evaluación preliminar de actividad enfocada a patologías específicas, en especial aquellas de alto impacto social y económico (Pinzon, 1997), aumentando así la participación del país en el proceso y en los beneficios derivados de su biodiversidad, impulsando el fortalecimiento de la capacidad técnica y científica, y promoviendo la conservación y utilización sostenible de los recursos biológicos (Soejarto, 1997).

Para responder a esta necesidad se ha centrado el interés en las metodologías alternativas *in vitro*, modelos que pueden generar resultados con validez internacional, relativamente económicos, rápidos y sencillos, además de que contribuyen a la reducción del empleo de animales de laboratorio y abren la posibilidad de realizar estudios a nivel molecular (Johnson, 1990). En el tamizaje preliminar de agentes con actividad anticáncer se han empleado grupos de líneas celulares derivadas de tumores humanos que son expuestas a la sustancia en estudio por un periodo determinado, al cabo del cual se evalúa la viabilidad celular; la capacidad citotóxica de los agentes estudiados es interpretada como un indicativo de potencial actividad anticáncer *in vivo* (Monks *et al.*, 1991; Lieberman *et al.*, 2001; Fricker y Buckey, 1996; Skehan *et al.*, 1990).

Aquí se describe el establecimiento de las condiciones para el desarrollo de la valoración preliminar *in vitro* de la potencial actividad anticáncer de extractos vegetales, evaluando su citotoxicidad sobre cuatro líneas celulares derivadas de tumores sólidos humanos; empleando los métodos colorimétricos de reducción del MTT (metil tiazol tetrazolio) y fijación de la SRB (Sulforodamina B) para la determinación indirecta de la masa celular.

METODOLOGÍA

Líneas celulares: se emplearon las líneas celulares derivadas de tumores sólidos humanos: HT-29 (adenocarcinoma colorrectal), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), incluidas en el panel del Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos y recomendadas como modelos de valoración preliminar por su sensibilidad

(López, 2000); SiHa (carcinoma de cérvix), HEP-2 (epidermis de laringe contaminado con HeLa), obtenidas todas del banco de células del Laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Cancerología de Colombia, sede Bogotá. Las cuatro líneas celulares se mantuvieron en medio mínimo esencial (MEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml, en frascos de cultivo celular de 75 cm², a 37°C, en atmósfera con 5% de CO₂ en aire y 100% de humedad relativa.

Valoraciones de citotoxicidad: las células con 90% de confluencia fueron tripsinizadas, contadas en cámara de Neubauer, transferidas a placas de microtitulación de 96 pozos con fondo plano. Después de un período de preincubación de 24 h fueron tratadas por períodos de 24 h y 48 h con la sustancia de prueba, adicionada en cinco diluciones seriadas. La sustancia de tratamiento fue retirada y la masa celular fue determinada por reducción del MTT o por tinción con SRB. Se calcularon los porcentajes relativos de supervivencia de las células tratadas usando como referencia las células control no tratadas; se obtuvieron curvas concentración-porcentaje de supervivencia y se calcularon las concentraciones letales 50 (LC₅₀) empleando el programa POLO PC (Cordero, 2002).

Tratamientos: se empleó como patrón de actividad citotóxica Doxorubicina HCl (Farmacia & Uphjon) en solución, frente a los extractos etanólicos totales de *Acnistus arborescens* y *Calea peruviana* y el compuesto X, purificado a partir del extracto etanólico total de *Acnistus arborescens*, suministrados por el grupo de investigación en productos naturales bioactivos del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Las concentraciones máximas empleadas fueron de 10⁻⁴ M para compuestos puros y 250 µg/ml para los extractos vegetales; las relaciones de dilución fueron de 1:10 y 1:3, respectivamente.

Determinación de la masa celular: se siguieron los procedimientos establecidos por Skehan *et al.* (1990) para la tinción con SRB y por Mosmann (1993) para la reducción con MTT, adaptados por Cordero (2002).

Establecimiento de las condiciones de desarrollo de las valoraciones: Inicialmente para cada una de las líneas celulares se establecieron los rangos de

linealidad de la relación número de células-absorbancia, por los dos métodos colorimétricos, se evaluó su sensibilidad frente al agente quimioterapéutico Doxorubicina HCl y se seleccionaron los parámetros: concentración de MTT, número de células por pozo y período de tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Adaptación de los cultivos celulares: En la tabla 1 aparecen las relaciones de subcultivo establecidas para cada línea celular, de forma tal que se dispusiera de una cantidad suficiente de éstas realizando únicamente un proceso de tripsinización semanal.

Tabla 1 Relaciones de subcultivo*

Línea celular	Relación de subcultivo
HEp-2	$1 \cdot 10^5 \pm 1.5 \cdot 10^4$
SiHa	$3 \cdot 10^5 \pm 6 \cdot 10^4$
HT-29	$1.2 \cdot 10^6 \pm 3 \cdot 10^5$
MCF-7	$1.1 \cdot 10^6 \pm 2 \cdot 10^5$

La relación de subcultivo está expresada como número de células dispuestas en el frasco de cultivo.

Condiciones de desarrollo de las valoraciones de citotoxicidad: la valoración *in vitro* de citotoxicidad se introdujo hacia 1950 con el objetivo de predecir la actividad *in vivo* de un agente neoplásico. El ensayo clonogénico fue el primer método empleado para tal fin; con el paso del tiempo, éste ha sido complementado con metodologías alternativas basadas en la medición de la viabilidad celular (tinción selectiva, tinción de proteínas) y del metabolismo celular (inclusión de timidina, bioluminiscencia ATP, reducción de MTT). Estos modelos presentan baja correlación con la respuesta *in vivo* frente a un tratamiento quimioterapéutico, pero han demostrado ser de gran utilidad como métodos de *screening* o tamizaje de nuevos agentes antineoplásicos (Bellamy, 1992).

Los métodos de tinción con SRB y reducción del MTT han sido ampliamente empleados para la determinación indirecta de la masa celular y, aunque los dos son colorimétricos, sus fundamentos son diferentes. El método de reducción del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) es una medida del metabolismo celular, basada en la reducción de esta sal por acción de las succinato-

deshidrogenasas-mitocondriales con la consecuente formación del colorante azul-violeta formazán, cuya concentración es proporcional al número de células presentes (Mosmann, 1983). La tinción con SRB es una determinación del contenido proteico total por coloración con SRB (sulfurodamina B), que es un colorante de aminoxantano, rosado brillante, con dos grupos sulfónicos SO_3^- , que en condiciones medianamente ácidas aumentan su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas, fijándose electrostática y selectivamente a éstos (Skehan *et al.*, 1990).

Para emplear estos dos métodos en la determinación de la masa celular que permanece viable después de la exposición a un xenobiótico era necesario verificar la linealidad de la relación entre absorbancia y número de células, y establecer el rango de densidad celular (número de células / pozo) en que esto se cumplía para cada línea. Se evaluó la relación para los dos métodos colorimétricos en las cuatro líneas celulares, encontrando un comportamiento lineal tanto en valoraciones realizadas con un período de incubación de 0 h, como en las realizadas tras 48 h de incubación, ($r \geq 0,95$ a tiempo cero y $r \geq 0,916$ tras 48 h) para la tinción con SRB y la reducción del MTT (véase gráfico 1).

Se evidenció una pérdida de la linealidad a altas densidades celulares después de la incubación por 48 h, causante de la reducción del rango de linealidad. Para las cuatro líneas celulares, el rango

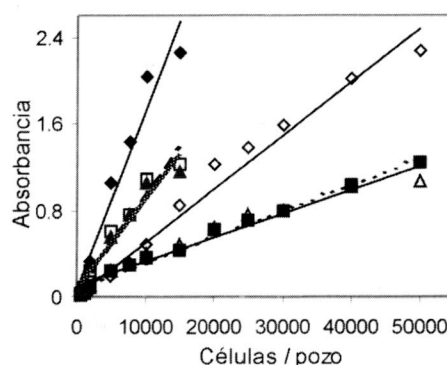


Gráfico 1. Determinación del rango de linealidad de la relación número de células-absorbancia; se muestran los resultados para MCF-7, con 0 h de incubación (sólo preincubación): \diamond SRB 0,4%, \triangle MTT 0,25 mg/mL, \blacksquare MTT 0,5 mg/mL; con 48 h de incubación: \blacklozenge SRB 0,4%, \blacktriangle MTT 0,25 mg/mL, \blacksquare MTT 0,5 mg/mL.

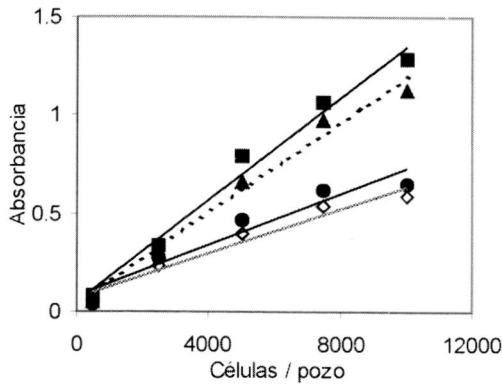


Gráfico 2. Selección de concentración de MTT. Se muestran los resultados para dos líneas celulares tras 48 h de incubación. HEP-2: ■ MTT 0.5 mg/ml, ▲ MTT 0.25 mg/ml; SiHa: ● MTT 0.5 mg/ml, ◇ MTT 0.25.

de linealidad incluyó la menor densidad empleada (5×10^2 células), indicando que, en las condiciones de trabajo, los dos métodos colorimétricos permiten detectar bajas densidades celulares y por tanto no presentan diferencias de sensibilidad notables.

Para establecer el efecto de la concentración inicial de MTT en los valores de absorbancia obtenidos, durante la determinación de los rangos de linealidad de la relación entre absorbancia y número de células se realizaron tratamientos paralelos de placas semejantes con las concentraciones de 0.25 y 0.5 mg/ml de MTT, frecuentemente empleadas en valoraciones de citotoxicidad (Fricker y Buckey, 1996; Ezpeleta, 1998; Kepers et al., 1991; Scudiero et al., 1988). Las respuestas obtenidas con las dos concentraciones de MTT no difirieron significativamente; en los dos casos se observó un aumento de la absorbancia al aumentar el número de células y la correlación fue similar; por tanto se decidió emplear la concentración más baja (0.25 mg/ml). (véanse gráficos 1 y 2).

Se evaluó la sensibilidad de las cuatro líneas celulares a la Doxorubicina HCl, empleando en cada caso tres densidades celulares contenidas en el rango de linealidad preestablecido y períodos de tratamiento de 12 h, 24 h y 48 h. Las cuatro líneas celulares mostraron ser sensibles a la acción de la Doxorubicina HCl en concentración 10^{-4} M e inferiores, con períodos de tratamiento de 24 h y 48 h, mientras que con 12 h no se detectaron cambios (véase gráfico 3); con base en estos resultados se seleccionó la densidad celular por emplear para cada

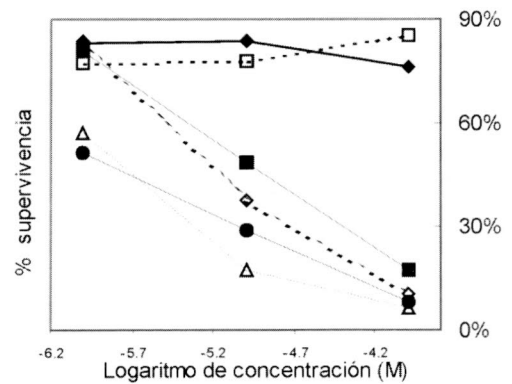


Gráfico 3. Valoración de sensibilidad a Doxorubicina HCl. Se muestran los resultados para HEP-2, 7.500 células/pozo: ◆ 12 h, ◇ 24 h y ▲ 48 h de tratamiento; 10^4 células/pozo, □ 12 h, ■ 24 h y ● 48 h de tratamiento.

línea celular. Éstas fueron, respectivamente, 7.500 células/pozo para HEP-2, 10.000 células/pozo para SiHa, 15.000 células/pozo para MCF-7 y 20.000 células/pozo para HT-29.

Para seleccionar el período de tratamiento se emplearon 24 h y 48 h, con cinco diluciones seriadas de Doxorubicina HCl, en relación 1:10 y una concentración máxima de 10^{-5} M; las células fueron inoculadas en las densidades seleccionadas en el ensayo preliminar. El tratamiento de 24 h mostró ser insuficiente para determinar la concentración letal 50 (LC_{50}) del agente, esto es, la concentración 10^{-5} M presentó un porcentaje de supervivencia mayor al 50%; mientras en el tratamiento de 48 h los porcentajes de supervivencia para

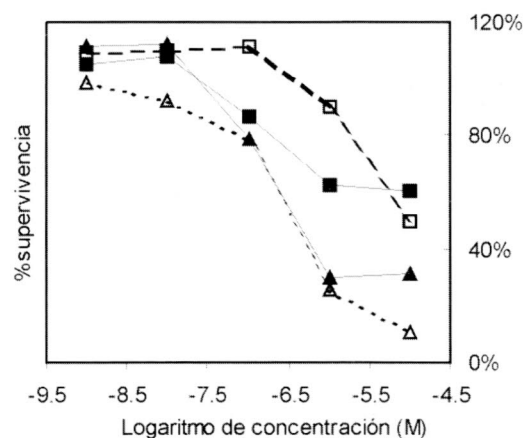


Gráfico 4. Selección del período de tratamiento. Se presentan los resultados para HT-29: 24 h: ■ MTT 0.25 mg/ml, □ SRB 0.4%; 48 h: ▲ MTT 0.25 mg/ml y △ SRB 0.4%.

las cuatro líneas celulares, con la concentración 10^{-5} M, fueron inferiores a 40%, lo que indica que con este período de tratamiento es posible determinar la concentración letal 50 de la Doxorubicina HCl en cada caso (véase gráfico 4). Los valores de absorbancia obtenidos tanto por el método de reducción del MTT como por la tinción con SRB estuvieron dentro de los rangos de linealidad preestablecidos para cada caso.

Para las cuatro líneas celulares se observó una respuesta similar al tratamiento por 48 h con Doxorubicina HCl, indicando que su sensibilidad al citotóxico es semejante. Estas relaciones mostraron una tendencia lineal en la zona central. Se realizó un ensayo confirmatorio empleando diez concentraciones de Doxorubicina HCl contenidas en el rango correspondiente ($1 \cdot 10^{-8}$ M a $1 \cdot 10^{-5}$ M), en el que se encontró que la relación Log concentración-porcentaje de supervivencia mantenía el comportamiento lineal ($r \geq 0.96$) en el rango $2,5 \cdot 10^{-8}$ M a $1 \cdot 10^{-6}$ para las cuatro líneas celulares (véase gráfico 5).

Con los porcentajes de supervivencia calculados se determinó la proporción de células que, inmediatamente después del tratamiento, se mantuvieron intactas. No se incluyó período de recuperación posterior al tratamiento; por tanto la citotoxicidad se expresa en términos de concentraciones letales (LC) (Freshney,

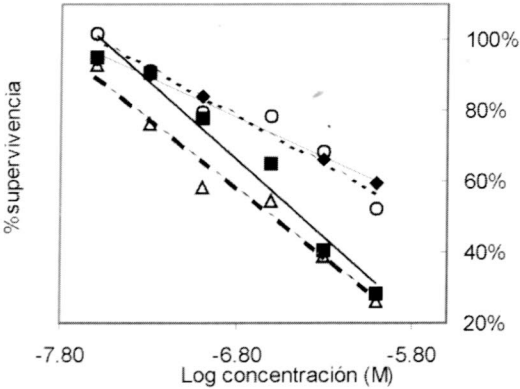


Gráfico 5. Valoración de citotoxicidad de Doxorubicina HCl sobre dos líneas celulares, 48 h de tratamiento. HT-29: ◆ SRB, ○ MTT, MCF-7: ■ SRB y △ MTT.

Tabla 2 Valores de LC ₅₀					
Método	Doxorubicina *10 ⁻⁷ M	HCl μg/ml	A.a μg/ml	C.p μg/ml	X *10 ⁻⁷ M
HEp-2					
MTT	4,44	0,26	21,7	94,4	49,32
SRB	1,62	0,09	18,8	107,4	38,57
SiHa					
MTT	4,44	0,26	29,1	103,1	24,65
SRB	5,79	0,34	16,0	100,7	13,92
MCF-7					
MTT	2,90	0,17	20,9	122,4	14,77
SRB	3,59	0,21	15,2	125,4	9,25
HT-29					
MTT	12,5	0,72	32,9	>250	11,9
SRB	9,73	0,56	26,7	>250	13,69

Valores promedio calculados para las cuatro líneas celulares. Las LC₅₀ para Doxorubicina HCl se expresan en dos unidades para efectos de comparación. A.a: extracto etanólico total de *A. arborescens*. C.p: extracto etanólico total de *C. peruviana*, X: compuesto X.

2000). Se calculó la concentración de Doxorubicina HCl causante de la muerte del 50% de las células (LC₅₀), para cada línea celular, empleando los valores obtenidos en el ensayo preliminar y en el confirmatorio; los resultados para cada línea celular en los dos ensayos estuvieron en el mismo orden de magnitud, indicando que la evaluación preliminar de citotoxicidad permite obtener un estimativo de la actividad anticáncer de una sustancia (véase tabla 2).

Comparación entre los métodos colorimétricos: los resultados obtenidos por los métodos colorimétricos para cada línea celular presentaron comportamientos similares, mostrando ser paralelos entre sí ($P \geq 0,172$, $\alpha = 0,05$). Al realizar una prueba de correlación, se observó una alta correspondencia entre los porcentajes de supervivencia obtenidos por los dos métodos ($r \geq 0,89$) (véase gráfico 6); indicando que los dos métodos proveen resultados comparables.

Una vez establecidas las condiciones y los protocolos de trabajo para la valoración preliminar de la actividad citotóxica, se procedió a estudiar los extractos etanólicos totales de *Acnistus arborescens* y *Calea peruviana*, plantas que actualmente son estudiadas por el grupo de investigación en productos naturales bioactivos del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

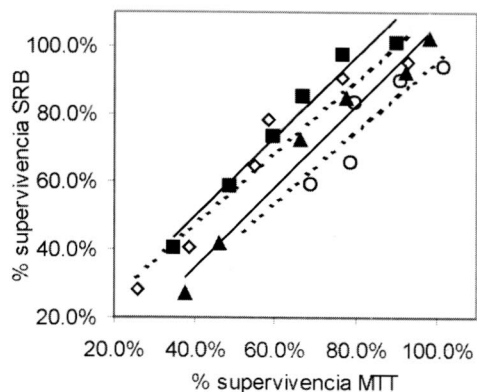


Gráfico 6. Correlación entre MTT y SRB en la valoración de citotoxicidad de Doxorubicina HCl. ○ HT-29, ▲ HEP-2, ◇ MCF-7 y ■ SiHa.

El extracto de *A. arborescens* presentó mayor actividad que el de *C. Peruviana*. Las concentraciones letales 50 calculadas estuvieron en relación aproximada de 10:1 con los valores calculados para la Doxorubicina HCl, mientras que esta relación fue de 100:1 para el extracto de *Calea peruviana*. Esto sugirió que el extracto de *A. arborescens* presentaba mayor posibilidad de contener compuestos de interés farmacológico que el extracto de *C. Peruviana*; por tanto, se evaluó un compuesto purificado a partir de éste, las LC_{50} calculadas para el compuesto estuvieron en relación 10:1 con los valores calculados para la Doxorubicina HCl, por lo que se considera que éste puede ser el responsable de la actividad mostrada por el extracto etanólico total (véase gráfico 7).

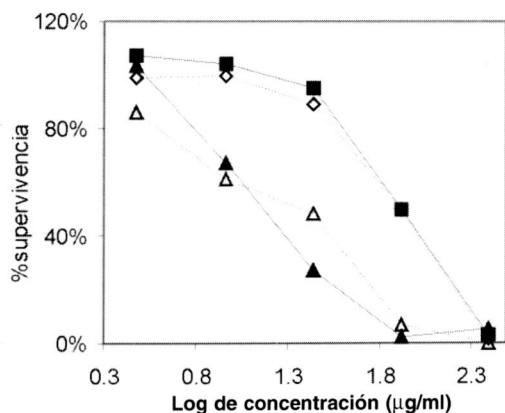


Gráfico 7. Valoración de citotoxicidad de dos extractos etanólicos totales. Se presentan los resultados para MCF-7. *Acnistus arborescens*: ▲ SRB, △ MTT; *Calea peruviana*: ■ SRB, ◇ MTT.

CONCLUSIONES

Las evaluaciones realizadas mostraron que las líneas celulares SiHa, MCF-7, HEP-2 y HT-29 presentan sensibilidad similar frente a la Doxorubicina HCl, y son sensibles a la acción de extractos vegetales. La citotoxicidad evidenciada en estos modelos puede ser un indicativo de una potencial actividad anticáncer (Monks, *et al.*, 1991; Freshney, 2000) por lo que resulta útil para guiar el fraccionamiento de los extractos vegetales con miras a detectar la presencia de fracciones y compuestos potencialmente activos. Es evidente que se debe evaluar la sensibilidad de estas líneas celulares a otros compuestos con conocida actividad citotóxica, para completar su patrón de sensibilidad, que permita definir si la actividad citotóxica evidenciada sobre una de ellas indica actividad diferencial sobre la clase de cáncer que representa.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo contó con la financiación del proyecto de Colciencias, Evaluación de actividad anticáncer y anti-HIV en extractos de productos naturales, número 1101-05-10067, y del proyecto de la Dirección de Investigación de la sede Bogotá, de la Universidad Nacional de Colombia, Evaluación de la actividad anticáncer de extractos de plantas, código No. 803625.

El trabajo se desarrolló en los laboratorios del grupo de investigación en productos naturales bioactivos del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

BIBLIOGRAFIA

- Bellamy, W. 1992. Prediction of response to drug therapy of cancer, a review of *in vitro* assays. *Drugs*. 44 (5), 690-708.
- Cordero, C. 2002. *Implementación de un método in vitro de evaluación preliminar de actividad anticáncer de extractos vegetales, empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos*. Trabajo de grado. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Colombia.
- Ezpeleta, O. 1998. *Curso teórico práctico sobre cultivo celular y ensayos de citotoxicidad*. Universidad de Navarra, Facultad de Farmacia, España.

- Freshney, I. 2000. Cytotoxicity. En: *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. Freshney, I. John Wiley and Sons Inc., Reino Unido, 329-343.
- Fricker, S., Buckley, R. 1996. Comparison of two colorimetric assays as cytotoxicity endpoints for an *in vitro* screen for antitumour agents. *Anticancer Res.* 16 (6B): 3755-3760.
- Johnson, R. 1990. Screening methods in antineoplastic drug discovery. *J. Natl. Cancer Inst.* 82(13): 1082-1083.
- Keepers, Y., Pizao, P., Peters, G., Ark-Otte, J., Winograd, B., Pinedo, H. 1991. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for *in vitro* chemosensitivity testing. *Eur. J. Cancer.* 27 (7) : 897-900.
- Lieberman, M., Patterson, G., Moore, R. 2001. *In vitro* bioassays for anticancer drug screening: effects of cell concentration and other parameters on growth inhibitory activity. *Cancer Lett.* 173: 21-29.
- López, A. 2000. Departamento de Toxicología C.I.F.A. Universidad de Navarra, Pamplona, España. Comunicación personal.
- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., 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 cultured human tumor cells lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 83(11): 757-766.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65: 55-63.
- Pinzón, R. 1997. Propuesta de un programa colombiano de bioprospección (Procolbio). En: *Tópicos en productos naturales: la biodiversidad como fuente de moléculas activas*. Echeverri, F., Quiñónez, W. Universidad de Antioquia, Colombia, 259-266.
- Sanabria, A. 1997. De la especie vegetal al medicamento: mito y realidad. En: *Tópicos en productos naturales: la biodiversidad como fuente de moléculas activas*. Echeverri, F., Quiñónez, W. Universidad de Antioquia, Colombia, 231-257.
- Scudiero, D., Shoemaker, R., Paull, K., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T., Currens, M., Seniff, D., Boyd, M. 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/ formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 48: 4827-4833.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82(13): 1107-1112.
- Soejarto, D. 1997. La biodiversidad de los bosques tropicales y la búsqueda de nuevos fármacos. En: *Tópicos en productos naturales: la biodiversidad como fuente de moléculas activas*. Echeverri, F., Quiñónez, W. Universidad de Antioquia, Colombia, 133-149.