

EVALUACIÓN CITOTÓXICA DE FRACCIONES OBTENIDAS DE LA ESPONJA MARINA DEL CARIBE COLOMBIANO

Topsentia ophiraphidites

CYTOTOXIC EVALUATION OF FRACTIONS FROM THE COLOMBIAN CARIBBEAN SEA SPONGE *Topsentia* *ophiraphidites*

LINA BLANDÓN ^{a*}, MARÍA MÁRQUEZ ^b, JUAN LÓPEZ ^c, DIANA MÁRQUEZ ^c,
ALEJANDRO MARTÍNEZ ^b

Recibido 07-03-2013, aceptado 21-06-2013, versión final 28-06-13.

Artículo Investigación

RESUMEN: A partir de las esponjas marinas se han obtenido gran cantidad de sustancias con potencial antitumoral. En este estudio se realizó la evaluación de la actividad citotóxica, de cinco fracciones de la esponja marina del Caribe colombiano *Topsentia ophiraphidites* en las líneas celulares Jurkat y CHO, mediante las pruebas de MTT y azul de tripano. Sólo la fracción número 4 (T4) presentó actividad citotóxica significativa, obteniendo una concentración inhibitoria media (IC₅₀) de 33 µg/mL para las células Jurkat y 58 µg/mL para las células CHO, sugiriendo la necesidad de realizar posteriores ensayos de genotoxicidad y efectos sobre el ciclo celular.

PALABRAS CLAVE: Jurkat, CHO, citotoxicidad.

ABSTRACT: A great quantity of anticancer potential substances have been obtained from marine sponges. In this study was performed the evaluation of the cytotoxic activity of fractions from the Colombian Caribbean marine sponge *Topsentia ophiraphidites* in the cell lines Jurkat and CHO, through MTT assay and tripan blue staining. Only the fraction number four (T4) had cytotoxic activity, with a median inhibitory concentration (IC₅₀) of 33 µg/mL for Jurkat cells and 58 µg/mL for CHO cells. Future trials of genotoxicity and effects on cell cycle could be perform with fraction T4.

KEYWORDS: Jurkat, CHO, cytotoxicity.

^aM.Sc en Biotecnología. Grupo Biotecnología Animal. Línea Bioactividad de Productos Naturales y Sintéticos. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín

* Autor para correspondencia: lmblando@unal.edu.co

^bM.Sc en Biología. Grupo Biotecnología Animal. Línea Bioactividad de Productos Naturales y Sintéticos. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín

^cDoctor en Ciencias Químicas. Grupo de Productos Naturales Marinos. Departamento de Farmacia, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte especialmente en países en desarrollo. La eficacia de los medicamentos con los que se trata la enfermedad es menor del 100%, su especificidad es limitada, además ocasionan daños en células y tejidos no cancerosos y generan resistencia a la quimioterapia (Pereira *et al.*, 2012).

En las últimas décadas se ha incrementado la búsqueda de nuevas sustancias de origen natural con potencial antitumoral como alternativas de tratamiento. Debido a su gran diversidad biológica y química, los océanos constituyen una fuente inmensa para el descubrimiento de drogas antitumorales y las esponjas marinas son los principales organismos de estudio ya que debido a su naturaleza sésil y mecanismo de protección a predadores, producen metabolitos secundarios con gran potencial antitumoral (Sepčić *et al.*, 2010).

A partir de las esponjas marinas se ha logrado obtener una gran cantidad de sustancias con potencial antitumoral (Sipkema *et al.*, 2005). El análogo ara – C sintetizado a partir de los nucleósidos espongotimidina y espongouridina extraídos de la esponja *Cryptotethia cripta* es quizás uno de los compuestos más usados en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda y su análogo fluorado Gemcitabina, es una importante herramienta terapéutica en el tratamiento del cáncer pancreático y de pulmón (Jimeno *et al.*, 2006). Otras sustancias que han mostrado actividad antitumoral se encuentran en etapa preclínica avanzada, como las topsentinas (aislada de *Topsentia genitrix*, *Spongisorites* sp. y *Hexadella* sp.), la debromohymenialdisina (aislada de *Plakellia flabellata*, *Hymeniacion aldis* y *Stylotella aurantia*), la halichondrina B (aislada de *Halichondria okadai*), la jasplakilonida (aislada de *Jaspis* sp. o *Dorypleres splendens*), el discodermolido (aislado de *Discodermia dissoluta*) y el mycaperóxido B (aislado de *Mycale* sp.). Otros compuestos también aislados de esponjas marinas, como la isohomohalichondrina B, las espongistatinas y la lamellarina N, así como, un alcaloide citotóxico aislado de *Biemna* sp. y las bastadinas (aisladas de *Ianthella* sp.) han mostrado actividad *in vitro* contra líneas de células tumorales (Mora *et al.*, 2007).

En la Bahía de Santa Marta, Colombia, *T. ophiraphidites*, se aisló de la fracción bioactiva del extracto metanólico, el compuesto triacetato de halistanol, el cual mostró actividad *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* (Galeano *et al.*, 2006).

Algunos reportes, muestran que las esponjas del género *Topsentia* producen varios tipos de compuestos, como esteroides, esteroides sulfatados, derivados de ácidos grasos (oxilipinas) y alcaloides especialmente tipo indol (Guzii *et al.*, 2008). La esponja *T. genitrix* posee alcaloides tipo indólico, los cuales han mostrado actividad ictiotóxica, antitumoral, antiviral, antiinflamatoria, antimitótica y antibacteriana, entre otras (Gupta *et al.*, 2007). De la esponja marina *Topsentia ophiraphidites* se han aislado una gran cantidad de esteroides con potencial antitumoral el más importante conocido

es el ophirasptanol trisulfato (Gunasekera *et al.*, 1994).

La primera evaluación *in vitro* para encontrar posibles sustancias antitumorales descrita por el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos (NCI) utiliza un panel de líneas celulares derivadas de diferentes tumores, en las cuales se realizan pruebas de citotoxicidad usando un rango de concentraciones de las sustancias candidatas para determinar el grado relativo de inhibición del crecimiento o citotoxicidad en cada línea celular (Boyd, 1995). Estas líneas celulares son conocidas como las líneas NCI – 60 y están conformadas por células provenientes de ocho melanomas, seis leucemias, ocho cánceres de mama, dos de próstata, nueve de pulmón, siete de colon, seis de ovarios, ocho de riñón y seis de cáncer del sistema nervioso central. Con los resultados de las pruebas de citotoxicidad se halla la concentración inhibitoria media (IC₅₀) como la requerida para inhibir el crecimiento celular (Chakravarti y Klopman, 2008).

Estudios recientes han demostrado que extractos provenientes de esponjas del Caribe colombiano poseen actividad citotóxica sobre las líneas celulares tumorales A – 549, HT29 y MDA – MB – 231 (Márquez *et al.*, 2011; Márquez *et al.*, 2011); y sobre líneas celulares de leucemia humana Jurkat y K562 (Márquez *et al.*, 2012). Lo anterior, ha conducido al fraccionamiento de los extractos con potencial bioactivo de la esponja marina *Topsentia ophiraphidites* con el fin de evaluar el potencial citotóxico *in vitro* en las líneas celulares establecidas CHO y Jurkat.

2. METODOLOGÍA

2.1. Fracciones evaluadas

Todos los experimentos se realizaron con cultivos en fase exponencial de las líneas celulares Jurkat clon E6-1 (leucemoide humana ATCC TIB-152) y CHO-K1 (ovario de hámster chino, ATCC N° CCL-61) y propagadas en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Estados Unidos), suplementado con 5 % de suero fetal bovino (Lonza, Estados Unidos). Los cultivos celulares fueron incubados a una temperatura de 37°C y en el caso de la línea celular Jurkat en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5 %.

La línea celular Jurkat, fue obtenida de sangre periférica de un niño de 14 años con leucemia linfoblástica aguda (Schneider, 1977). El cariotipo de las células es pseudodiploide, el número de cromosomas es 46, XY, en el 74 % de los casos y contiene poliploidías en el 5,3 % con alteraciones tales como 2-18 del (2) (p21p23), del (18) (p11.2), con cromosomas X y Y normales. Esta línea celular crece en suspensión formando racimos, su ciclo celular estimado es de 18 horas.

La línea celular CHO es una línea celular establecida obtenida a partir de un explante de tejido de

ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*) (Kao y Puck, 1968). En esta evaluación, se usó el clon CHO-K1 subclon derivado de la línea parental CHO. La línea original se caracteriza por ser euploide con un número modal cromosómico de 20-21, posee 10-13 marcadores cromosómicos bien definidos, cariotipo heteromórfico. Este tipo de células crecen en monocapa adheridas al sustrato y su ciclo celular estimado es de 14 horas. Es ampliamente utilizada en estudios para evaluar genotoxicidad por su pequeño número de cromosomas y su fácil manejo (Sánchez-Lamar, 1999).

2.2. Fracciones evaluadas

Las muestras de la especie *Topsentia ophiraphidites* fueron recolectadas mediante buceo autónomo en el Golfo de Urabá (Colombia) a una profundidad de 15-21 metros en 2002; luego se limpiaron cuidadosamente y posteriormente se conservaron a una temperatura de 4 °C y protegidas de la luz. La especie fue identificada por el Dr. Sven Zea, y una parte de la muestra se encuentra en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Antioquia.

Para la obtención de los extractos cada muestra de esponja húmeda fue cortada en pequeños pedazos (aproximadamente 3 x 3 cm) y extraída con solventes de diferente polaridad (etanol, diclorometano y n-hexano) de la siguiente manera: la muestra de esponja se extrajo exhaustivamente con el solvente hasta la desaparición del color, el extracto fue filtrado y posteriormente evaporado a sequedad con presión reducida y agitación constante a una temperatura menor a 40 °C. Los extractos secos obtenidos se conservaron refrigerados, protegidos de la luz, el aire, el calor y la humedad (Márquez, 2009).

El extracto etanólico se sometió a fraccionamiento cromatográfico mediante cromatografía instantánea en fase reversa (C18) usando como fase móvil 500 mL de la siguiente serie elutrópica: agua, agua /metanol (1:1), agua /metanol (1:3), metanol, metanol /diclorometano (3:1), metanol /diclorometano (1:1), y diclorometano. Cada fracción se concentró en un rotaevaporador a una temperatura de 40 °C, con presión reducida y agitación constante. En total se recolectaron 7 fracciones y para este estudio se seleccionaron aquellas que en un estudio previo mostraron actividad sobre las líneas celulares tumorales A-549, HT29 y MDA-MB-231 (T2, T3, T4 y T5).

Las fracciones T2, T3, T4 y T5, diluidas en dimetilsulfóxido (DMSO) se evaluaron en las líneas celulares Jurkat y CHO. De cada fracción, se realizó una solución stock inicial de 40 mg/mL, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas en medio simple (RPMI 1640), con las que se trataron las líneas celulares, usando diferentes concentraciones (50 µg/mL, 70 µg/mL y 100 µg/mL), durante 20 horas (tiempo equivalente a un ciclo celular).

2.3. Líneas celulares

Las dos líneas celulares empleadas son de origen mamífero y fueron usadas para la evaluación de la citotoxicidad de las fracciones de la esponja marina *Topsentia ophiraphidites* entre un modelo de células normales (CHO) y otro de células leucemoides (Jurkat), disponibles y ampliamente usadas en el laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

La línea celular CHO-HB4K1(ATCC CCL-61) es un Subclon de la línea parental CHO derivada de ovario de hámster chino adulto (Nolan y Kyongbum, 2012), es adherente, aneuploide con número modal cromosómico entre 20-21 cromosomas y posee entre 10-13 marcadores cromosómicos bien definidos. Su ciclo celular estimado es de 14 horas y la línea celular Jurkat (ATCC TIB-152), establecida a partir de células de sangre periférica de un niño de 14 años de edad con leucemia linfocítica aguda de linfocitos T (Cai *et al.*, 2010). El cariotipo es pseudo-diploide, muchas células presentan poliploidía, pero los cromosomas X y Y son normales.

Las células en cultivo crecen en suspensión, adoptan una morfología de linfoblastos y se agregan formando racimos. Su ciclo celular estimado es de 18 horas.

Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 5 % de suero fetal bovino y fueron mantenidas a una temperatura de 37°C. La línea celular Jurkat, además fue mantenida en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5 %.

2.4. Ensayos de citotoxicidad

Se evaluó la actividad citotóxica de las fracciones en las dos líneas celulares mediante dos ensayos:

2.4.1. Prueba de MTT

La prueba MTT (3-(4,5-dimetihylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) es un ensayo empleado para medir viabilidad celular. La medida de la absorción del formazán disuelto se correlaciona con el número de células vivas intactas. Los compuestos citotóxicos son capaces de dañar y destruir las células y disminuir la reducción del MTT a formazán.

Para realizar la prueba MTT, se emplearon platos de cultivos de 96 pozos, en cada uno de los cuales se adicionaron 5000 ó 8000 células Jurkat ó CHO obtenidas de un cultivo subconfluyente en medio RPMI 1640 suplementado con SBF 5 % y después de 48 horas, se adicionaron 10µl de cada una de las concentraciones (50, 70 y 100µg/ml) de las fracciones a evaluar. Se realizó un control negativo (células sin tratamiento) y un control del solvente DMSO a una concentración de 0.03 %.

El protocolo de MTT se basó en el descrito por Ulukaya *et al.* (2008) con algunas modificaciones. Después de 20 horas de tratamiento, se adicionó 20 μl de MTT (Sigma, 5mg/ml) a cada pozo, se incubó por 4 horas en oscuridad y luego se adicionó 100 μl de isopropanol-ácido para diluir los cristales de formazán formados, se agitó y se incubó en oscuridad toda la noche. Finalmente, se leyó en un lector de placas (Lector de placas Multiskan Spectrum, ThermoScientific) a una longitud de onda 570 nm. En todos los experimentos, se realizaron tres réplicas y por duplicado.

El porcentaje de viabilidad para cada una de las concentraciones fue obtenido mediante la ecuación 1.

$$\% \text{Porcentaje de Viabilidad} = \frac{\text{Absorbancia del Tratamiento}}{\text{Absorbancia del Control Negativo}} \times 100 \quad (1)$$

El análisis estadístico se realizó comparando los promedios de los tratamientos y del control negativo, obteniendo como variable respuesta el porcentaje de viabilidad. Por otro lado, para hallar los valores de Concentración Inhibitoria Media (IC₅₀) se realizó un análisis Probit con el programa Statgraphics Centurion.

2.4.2. Prueba de Azul de tripano

Se evaluó la viabilidad celular como consecuencia de daño en la membrana celular, por conteo del porcentaje de células dañadas (coloración azul), y células sanas (sin color). El protocolo realizado es el reportado por Costa *et al.* (2008). Brevemente, se incubaron con azul de tripano al 0,4 %, alícuotas de las suspensiones celulares tratadas con las diferentes concentraciones de las fracciones (50, 70 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 20 horas. Se cuantificó la viabilidad celular por conteo del porcentaje de células dañadas, las cuales se diferenciaron de las células sanas por presentar coloración azul como consecuencia del daño en su membrana celular. Se realizó un control negativo (células sin tratamiento) y un control del solvente DMSO con una concentración de 0.03 %. La viabilidad celular se cuantificó mediante la ecuación (2). En todos los experimentos se realizaron tres réplicas y por duplicado.

$$\% \text{Viabilidad} = \frac{\# \text{ de Células vivas}}{\# \text{ de Células totales}} \times 100 \quad (2)$$

El análisis estadístico se basó en la comparación de los promedios de los tratamientos con los del control negativo, obteniendo como variable respuesta el porcentaje de viabilidad (Ecuación 2).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dado que las esponjas marinas han sido reconocidas como fuentes de metabolitos secundarios con actividad biológica, continuamente son reportados varios estudios con el objetivo de estudiar dicha actividad en extractos obtenidos con solventes de diferente polaridad (Belarbi *et al.*, 2003; Bell, 2008; Pereira *et al.*, 2012).

Estudios preliminares de los extractos de la esponja marina *Topsentia ophiraphidites* fueron evaluados mediante el ensayo colorimétrico de la Sulforhodamina B y mostraron efecto *in vitro* de los extractos y fracciones sobre la viabilidad de líneas celulares tumorales de carcinoma de pulmón A 549, carcinoma de colon HT29 y cáncer de mama, MDA-MB-231 (Márquez, 2009). Por esa razón, la fracción T4 de la esponja marina *Topsentia ophiraphidites* fue evaluada con las pruebas de MTT y azul de tripano en otras líneas celulares de mamífero como CHO y Jurkat para evaluar su efecto citotóxico en esas líneas. Estudios similares se han hecho en esponjas del sur de Argentina (Bartolotta *et al.*, 2009).

En la búsqueda de sustancias bioactivas con potencial antitumoral, se requieren que posean actividad citotóxica, la cual se mide mediante la evaluación de la viabilidad celular luego del tratamiento de las células con una sustancia con potencial citotóxico. Para esto, el NCI realiza la prueba MTT (Boyd, 1995) (3-(4,5 – dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) y el ensayo con colorantes como el azul de tripano. A partir de esta evaluación, puede establecerse una batería estándar de fracciones para ser posteriormente evaluados a nivel genotóxico.

Por lo anterior, en este trabajo, se evaluó el efecto sobre la viabilidad celular de 4 fracciones de la esponja marina *Topsentia ophiraphidites* mediante el ensayo MTT. Esta sal de tetrazolio es reducida por la deshidrogenasa mitocondrial, a un producto de color púrpura (formazán) y la medida de la absorbancia del compuesto disuelto, se correlaciona con el número de células viables, sin embargo, los compuestos citotóxicos usados en el tratamiento de las células de mamífero, pueden destruir las células disminuyendo la reducción del MTT a formazán. Por esta razón, con la prueba MTT no es posible discriminar si el daño que sufrieron las células fue a nivel de la membrana celular por lo cual el hecho de que las células estén metabólicamente inactivas, no implica que estén muertas (Ulukaya *et al.*, 2008), y con el fin de evaluar un posible daño en la membrana celular, el NCI recomienda realizar evaluación con azul de tripano en las mismas concentraciones evaluadas con el MTT.

Los resultados de la prueba de MTT de las fracciones mostraron que T2, T3 y T5 presentaron viabilidad cercana al 100 % en las dos líneas celulares evaluadas. Por otro lado, la fracción T4 mostró viabilidad entre el 20 % y 70 % de manera dependiente de la dosis y mucho menor que las otras tres fracciones evaluadas (Ver Tabla 1).

Tabla 1: Resumen de los principales resultados obtenidos con las pruebas de MTT y azul de tripano.

Fracción	IC ₅₀ (μg/mL)		Significancia Estadística	
	Jurkat	CHO	Jurkat	CHO
T2	<100*	<100*	p>0.05	p>0.05
T3	<100*	<100*	p>0.05	p>0.05
T4	33 (33.62 - 33.10)**	58 (58.10 - 58.42)**	P<0.05	p <0.05
T5	<100*	<100*	p>0.05	p>0.05

*Se asume una IC₅₀ mayor que 100 μg/ml por su baja citotoxicidad, dato no hallado

**Intervalo de confianza

De la misma manera, los resultados de viabilidad obtenidas con azul de tripano (Figura 2) para las fracciones T2, T3, y T5 fue concordante con lo encontrado con la prueba de MTT (Figura 1), así que las fracciones T2, T3 y T5 tampoco mostraron efecto citotóxico sobre las líneas celulares evaluadas. Al comparar el efecto de la fracción T4 la prueba de azul de tripano demostró que la membrana de las células CHO fue más afectada y dependiente de la dosis que la membrana de las células Jurkat, la cual fue poco afectada, esto se refleja en la viabilidad mayor del 90 % encontrada con las tres concentraciones evaluadas de la fracción T4, sin embargo la mitocondria si resultó afectada de acuerdo a lo observado con MTT (Ulukaya *et al.*, 2008).

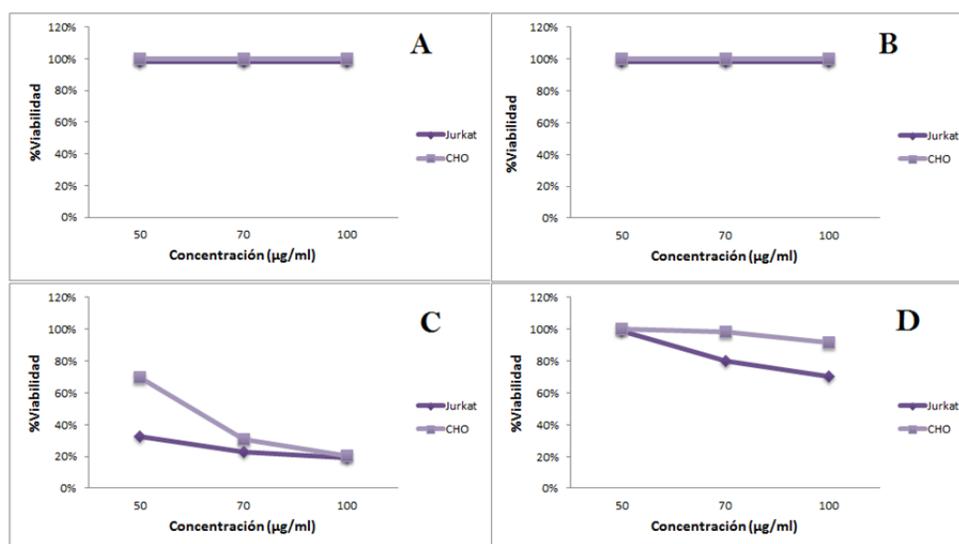


Figura 1: Viabilidad obtenida con la prueba de MTT. Fracción T2(A), T3 (B), T4 (C) y T5 (D) de la esponja *Topsentia ophiraphidites*.

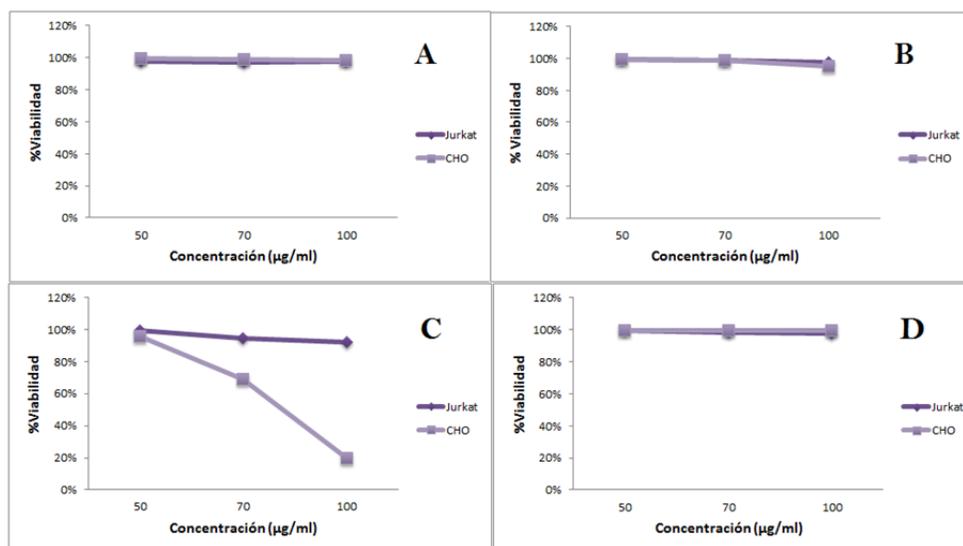


Figura 2: Viabilidad obtenida con azul de tripano. Fracción T2(A), T3 (B), T4 (C) y T5 (D) de la esponja *Topsentia ophiraphidites*.

Con la prueba MTT también se obtuvo el valor de la IC_{50} de 16 concentraciones evaluadas (de 10 a 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de cada una de las fracciones estudiadas, mediante un análisis Probit. Las IC_{50} obtenidas fueron de 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Valor $p < 0,05$) para las Células Jurkat y 58 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las Células CHO (Valor $p < 0,05$) (Figura 3).

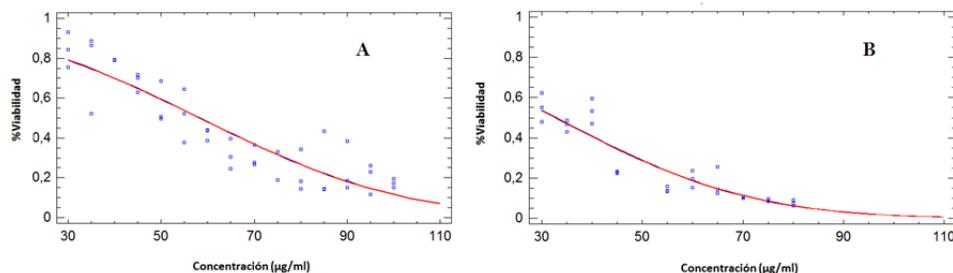


Figura 3: Gráficos de regresión mediante análisis probit, para la obtención de la IC_{50} . Células CHO $R^2 = 0.94$ (A), células Jurkat $R^2 = 0.92$

Teniendo en cuenta que la fracción T4 mostró actividad citotóxica significativa, se considera que es una fracción con potencial bioactivo a la que se le debe evaluar su efecto genotóxico y sobre el ciclo celular, se recomienda la evaluación de las demás fracciones en otras líneas celulares.

4. CONCLUSIONES

La fracción T4 mostró actividad citotóxica significativa en las líneas celulares evaluadas (CHO y Jurkat) con una dosis letal media de $33\mu\text{g}/\text{ml}$ en células Jurkat y $58\mu\text{g}/\text{ml}$ en células CHO. Por el contrario, las fracciones T2, T3 y T5 no mostraron citotoxicidad en las concentraciones evaluadas.

Los resultados de citotoxicidad encontrados para la fracción T4 sugieren realizar estudios de genotoxicidad de esta fracción T4 en las líneas celulares CHO y Jurkat, y en otras líneas celulares humanas derivadas de tumor. Es recomendable además, evaluar otros tipos de actividades biológicas como antimicrobiana, antileishmania, entre otras de la fracción citotóxica y de las no citotóxicas. Estas últimas podrían también ser evaluadas en otras líneas celulares de mamífero antes de ser declaradas inocuas.

AGRADECIMIENTOS

A Colciencias por la financiación del Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores Virginia Gutierrez de Pineda y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín por la financiación del proyecto “Actividad Biológica, Caracterización Química y Estimación de la Factibilidad de Producción in vitro de Compuestos Bioactivos de Esponjas Marinas del Caribe Colombiano”. Este trabajo también fue apoyado con la Estrategia de Sostenibilidad. Universidad de Antioquia 2009/2010.

Referencias

- Bartolotta, S. A., Scuteri, M. A., Hick, A. S., Palermo, J., Rodríguez Brasco, M. F., Hajdu, E., Mothes, B., Lerner, C., Campos, M., and Carballo, M. A. (2009), Evaluation of genotoxic biomarkers in extracts of marine sponges from Argentinean South Sea. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 369, 144–147.
- Belarbi, E. H., Contreras Gómez, A., Chisti, Y., García Camacho, F., and Molina Grima, E. (2003), Producing drugs from marine sponges. *Biotechnol. Adv.*, 21, 585–598.
- Bell, J.J. (2008), The functional roles of marine sponges. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 79, 341–353.
- Boyd, M. (1995), Some Practical Considerations and Applications of the National Cancer Institute In Vitro Anticancer Drug Discovery Screen. *Teicher Humana PressInc.*, Totowa, N edn. B. Teicher (ed.).
- Cai, X.; Xiaobo, X.; Jiye, C.; *et al.* (2010), Connection Between Biomechanics and Cytoskeleton Structure of Lymphocyte and Jurkat Cells: An AFM Study. *Micron*, 41(3): 257–262.

- Chakravarti, S., Klopman G. (2008), A structural analysis of the differential cytotoxicity of chemicals in the NCI-60 cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 7, 4052–4063.
- Costa, P.; Pinheiro, P.; Da Silva, V.; *et al.* (2008), Antiproliferative Activity of Pristimerin Isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in Human HL-60 Cells. *Toxicology in Vitro*, 22(4): 854–863.
- Freshney, I. (2005), *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, Fifth. Edition edn. John Wiley & Sons, Inc. 577p.
- Galeano, E.; Higuera, E.; Martínez, A. (2006), Triacetato de Halistanol, un derivado del metabolito bioactivo de la Esponja Marina Colombiana *Topsentia ophiraphidites*. *Vitae*, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. 13(2). 83–87.
- Galeano, E.; A. Martínez. (2007), Antimicrobial Activity of Marine Sponges from Urabá Gulf, Colombian Caribbean Region. *Journal De Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*, 17(1): 21–24.
- Gunasekera, .P; Sennet, S.; Borges, M. (1994), Ophirapstanol Trisulfate, a New Biologically Active Steroid Sulfate from the Deep Water Marine Sponge *Topsentia ophiraphidites*. *Journal of Natural Products*, 57: 1751 – 1754.
- Gupta, L.; Talwar, A.; and Chauhan, P. M. S. (2007), Bis and tris indole alkaloids from marine organisms: new leads for drug discovery. *Curr. Med. Chem.*, 14, 1789–1803.
- Guzii, A. G.; Makarieva, T. N.; Denisenko, V. A.; Dmitrenok, P. S.; Burtseva, Y. V.; Krasokhin, V. B.; and Stonik, V. A. (2008), Topsentiasterol sulfates with novel iodinated and chlorinated side chains from the marine sponge *Topsentia* sp. *Tetrahedron Lett.*, 49, 7191–7193.
- Jimeno, J.; Aracil, M.; and Tercero, J. C. (2006), Adding pharmacogenomics to the development of new marine-derived anticancer agents. *J. Transl. Med.*, 4, 3.
- Mal, S. K.; Bohé, L., and Achab, S. (2008), Convenient access to bis-indole alkaloids. Application to the synthesis of topsentins. *Tetrahedron*, 64, 5904–5914.
- Márquez, D. (2009), Estudio Químico y Evaluación Biológica de Esponjas Marinas del Caribe Colombiano. Tesis Doctoral. Universidad de Antioquia.
- Márquez, D.; Laville, R.; Thomas, O.; *et al.* (2009), Bioactive Guanidine Alkaloids from Two Caribbean Marine Sponges. *Journal of Natural Products*. 72(9): 1589– 1594.

- Márquez, D.; Márquez, M.; Martínez, A.; *et al.* (2011a), Isolation of a Bromotyrosine Derivative Compound of a Bioactive Fraction from the Marine Sponge *Iotrochota birotulata* from the Urabá Gulf (Colombia). *30(2)*: 392–396.
- Márquez, D.; Martínez, A.; Higuera, C.; *et al.* (2005), Efecto citotóxico y clastogénico en linfocitos humanos de la fracción de 5a-, 8a-epidioxisteroles de la esponja marina *Ircinia campana* del Caribe Colombiano. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, *24*: 75–79.
- Márquez, D.; Martínez, A.; Márquez, E.; *et al.* (2012), Efecto de extractos de la esponja calcarea *Leucetta aff. floridana* sobre el ciclo de líneas celulares leucemoides. *Revista Cubana de Farmacia*, *46 (4)*: 436 - 445.
- Márquez, D; Thomas, O; Martínez, A; *et al.* (2011b), Antiproliferative Effect of Extracts and Fractions from the Calcareous Sponge *Leucetta aff. floridana* from the Colombian Caribbean. *Acta Farmacéutica Bonarense*, *34(4)*: 683 - 689.
- McKee, T. C., Cardellina II, J. H., Tischler, M., Snader, K. M., and Boyd, M. R. (1993), Ibisterol sulfate, a novel HIV-inhibitory sulfated sterol from the deep water sponge *Topsentia sp.* *Tetrahedron Lett.*, *34*, 389–392.
- Mora, J; Zea, S.; Santos, M.; Newmark-Umbreit, F (2007), Capacidad Antimitótica de Extractos de Esponjas del Caribe Colombiano. *Bol. Invest. Mar. Cost.*, *36*, 167–169.
- Nolan, R.; and Kyongbum L. (2012), Dynamic Model for CHO Cell Engineering. *Journal of Biotechnology*, *158(1–2)*: 24
- Pereira, J. R. C. S.; Hilário, F. F.; Lima, A. B.; Silveira, M. L. T.; Silva, L. M.; Alves, R. B.; de Freitas, R. P.; Varotti, F. P. and Viana, G. H. R. (2012), Cytotoxicity evaluation of marine alkaloid analogues of viscosaline and theonelladin C. *Biomed. Prev. Nutr.*, *2*, 145–148.
- Sepčić, K.; Kaufenstein, S., Mebs, D. and Turk, T. (2010), Biological Activities of Aqueous and Organic Extracts from Tropical Marine Sponges. *Mar. Drugs*, *8*, 1550–1566.
- Sipkema, D.; Franssen, M. C.; Osinga, R.; Tramper, J. and Wijffels, R. H. (2005), Marine sponges as pharmacy. *Mar Biotechnol Ny*, *7*, 142–162.
- Ulukaya, E.; Ozdikicioglu, F.; Oral, A. Y. and Demirci, M. (2008), The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicol. In Vitro*, *22*, 232–239.