



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Biología

ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LAHERRADURINA Y
CHERIMOLINA-2, ACETOGENINAS *DE Annona diversifolia* Saff.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

MARÍA ADELINA SCHLIE GUZMÁN

DIRECTORA DE TESIS DRA. ALMA ROSA GONZÁLEZ ESQUINCA

COTUTORA. DRA PATRICIA GUEVARA FEFER

MEXICO, D. F.

ABRIL, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

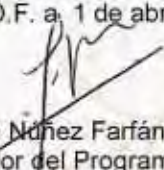
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 9 de febrero de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **SCHLIE GUZMAN MARIA ADELINA** con número de cuenta **71531003** con la tesis titulada: "**Actividad antitumoral de laherradurina y cherimolina-2, acetogeninas de *Annona diversifolia* Saff.**", realizada bajo la dirección de la **DRA. ALMA ROSA GONZALEZ ESQUINCA:**

Presidente:	DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER
Vocal:	DR. MARIANO MARTINEZ VAZQUEZ
Vocal:	DR. ALEJANDRO MANUEL GARCIA CARRANCA
Vocal:	DRA. ALICIA ENRIQUETA BRECHU FRANCO
Secretario:	DRA. ALMA ROSA GONZALEZ ESQUINCA
Suplente:	DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA
Suplente	DR. JOSE GUILLERMO AVILA ACEVEDO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 1 de abril de 2009.


Dr. Juan Nñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

RECONOCIMIENTOS AL:

Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Programa de Mejoramiento del Profesorado, SEP. Beca 103.5/04/130.

Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

Consejo de Ciencia y Tecnología de Chiapas.

COMITÉ TUTORAL

Dra. Alma Rosa González Esquinca.

Dra. Patricia Guevara Fefer.

Dr. Luis Felipe Jiménez García

A RAÚL, PAUL Y MANUEL

POR EL CAMINO QUE JUNTOS RECORRIMOS

A MIS PADRES:

MINERVA Y PAUL

HORTENSIA Y PEDRO

A MIS HERMANOS

Índice de General	Página
<i>Resumen</i>	1
<i>Summary</i>	2
<i>Introducción</i>	3
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	6
1.1. Las acetogeninas de la familia Annonaceae	6
1.1.1. La familia Annonaceae	6
1.1.2 El género <i>Annona</i>	8
1.1.3 <i>Annona diversifolia</i> Safford.....	9
1.1.4 Los metabolitos secundarios de las plantas	11
1.1.5 Actividad biológica y potencial farmacológico de extractos y metabolitos secundarios de las anonáceas	13
1.1.6 Las acetogeninas de la familia Annonaceae	15
1.6.1.1 Estructura general	15
1.1.6.2. Clasificación de las acetogeninas	16
1.1.6.3 Biosíntesis	20
1.1.6.4 Actividad biológica	21
1.1.6.5 Mecanismo de acción	21
1.1.7 Líneas de investigación asociadas a la actividad antineoplásica de las acetogeninas	22
1.1.8 Actividad citotóxica y mecanismos de acción sobre las células neoplásicas y normales.....	23
1.1.8.1. Estudios <i>in vitro</i>	24
1.1.8.2 Estudios <i>in vivo</i>	33

1.1.9 Estudios para establecer la estructura óptima de la molécula de las acetogeninas que permita la mayor actividad biológica (estructura-actividad).....	34
1.1.10. Determinación de la estereoquímica absoluta y síntesis de acetogeninas	39
1.2 La cadena respiratoria mitocondrial	41
1.2.1. La mitocondria.....	41
1.2.1.1 Los estados respiratorios de la mitocondria	44
1.2.2. La NADH ubiquinona oxidoreductasa o complejo I mitocondrial	45
1.2.3. Lanzadera para la oxidación mitocondrial del NADH citosólico.....	47
1.2.4. Inhibidores de la NADH- ubiquinona oxidoreductasa.	47
1.2.5. Efecto de las acetogeninas sobre la respiración celular	50
1.3 El cáncer y los fármacos utilizados en su tratamiento	54
1.3.1 El proceso de la carcinogénesis y sus fases	55
1.3.2 La invasión y la metástasis.....	57
1.3.3 La resistencia de las células cancerosas	58
1.3.4 Mecanismos de acción de los fármacos antineoplásicos	59
1.3.5 Los ratones atómicos como modelo para estudiar el efecto de los fármacos oncológicos	62
CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	64
4.1 Justificación	64
4.2 Hipótesis de trabajo	66
4.3 Hipótesis alternativa	66
4.4 Objetivo general	66
4.4.1 Objetivos particulares	66
CAPÍTULO III. DESARROLLO DE LOS OBJETIVOS	67

3.1 Susceptibilidad de cinco líneas tumorales humanas en cultivo a las acetogeninas laherradurina y cherimolina-2	67
3.1.1. Descripción general	67
3.1.2. Material vegetal	67
3.1.3. Las acetogeninas laherradurina y la cherimolina-2	68
3.1.4 Origen y características de las líneas celulares neoplásicas.....	70
3.1.5. Método	72
3.1.5.1 Mantenimiento de las líneas neoplásicas	72
3.1.5.2. Conteo de células viables con azul de tripán:.....	73
3.1.5.3. Cuantificación de la viabilidad celular en los ensayos de proliferación celular utilizando el reactivo de MTT	74
3.1.5.4 Ensayos de proliferación celular	74
3.1.5.5. Análisis estadístico de los datos	76
3.1.6 Resultados	77
3.1.6.1 Susceptibilidad de las líneas celulares neoplásicas a las concentraciones variables de laherradurina, cherimolina-2 y doxorubicina.77	
3.1.6.2 Susceptibilidad de las líneas celulares neoplásicas en función del tiempo de exposición a laherradurina, cherimolina-2 y doxorubicina	83
3.1.7 Análisis de los resultados	87
3.1.8 Conclusiones	91
3.2 Efecto de la laherradurina y cherimolina-2 en el desarrollo de los tumores inducidos en ratones atímicos de dos líneas neoplásicas	92
3.2.1 Descripción.....	92
3.2.2 Origen y manejo de los ratones atímicos	92
3.2.3 Selección de las líneas tumorales	92

3.2.4 Método	94
3.2.4.1 Inoculación de células neoplásicas a ratones atímicos	95
3.2.4.2 Dosis de las acetogeninas administradas a los ratones atímicos ...	95
3.2.4.3 Cálculo del tamaño (volumen) de los tumores	96
3.2.5 Resultados	96
3.2.5.1 Efecto de laherradurina	97
3.2.5.1.1 Efecto de laherradurina en el desarrollo de los tumores de células HeLa inducidos en los ratones atímicos.....	97
3.2.5.1.2 Efecto de laherradurina en el desarrollo de los tumores de células SW-480 inducidos en los ratones atímicos	104
3.2.5.2. Efecto de la Cherimolina-2	110
3.2.5.2.1. Efecto de la cherimolina-2 en el desarrollo de los tumores de células HeLa inducidos en los ratones atímicos.....	110
3.2.5.2.2. Efecto de la cherimolina-2 en el desarrollo de los tumores de células SW-480 inducidos en los ratones atímicos	116
3.2.6 Análisis de los resultados	121
3.2.7 Conclusiones	124
3.3. <i>Potencial inhibitorio de las acetogeninas sobre el consumo de oxígeno celular</i>.....	125
3.3.1 Descripción.....	125
3.3.2. El hepatoma de rata AS-30D.....	125
3.3.3 Método	126
3.3.3.1. Evaluación del consumo de oxígeno por las células AS-30D.....	126
3.3.3.2. Evaluación del consumo de oxígeno en mitocondrias de las células AS-30D.....	128
3.3.4 Resultados	131

3.3.4.1. Consumo de oxígeno en las células AS-30D en presencia de las acetogeninas	131
3.3.4.2. Consumo de oxígeno de las mitocondrias en presencia de acetogeninas	133
3.3.5 Análisis de los resultados	135
3.3.6 Conclusiones	138
CAPÍTULO IV CONSIDERACIONES FINALES	139
CAPÍTULO V. REFERENCIAS	144

Índice de Cuadros	Página
Cuadro 1.1 Clasificación taxonómica de <i>A. diversifolia</i> (Hutchinson,1964).....	11
Cuadro 1.2 Clasificación de las acetogeninas de Anonáceas (Bermejo <i>et al.</i> , 2005).	17
Cuadro 1.3. Dosis efectivas medias ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de las acetogeninas de anonáceas sobre líneas celulares de tumores sólidos humanos.....	26
Cuadro 1.4 Actividad inhibitoria de algunas acetogeninas sobre la NADH oxidasa.	38
Cuadro 1.5 Características de los estados respiratorios 3 y 4 mitocondriales.	45
Cuadro 1.6 Clasificación funcional de los inhibidores del complejo I mitocondrial. Modificado de Degli 1998.	49
Cuadro 1.7 Clasificación funcional de las acetogeninas como inhibidores del complejo I mitocondrial*.	53
Cuadro 3.1.1 Características generales de la línea celular Ca Ski.....	70
Cuadro 3.1.2 Características generales de la línea celular MCF-7.	71
Cuadro 3.1.3 Características generales de la línea celular SW-480.	71

Cuadro 3.1.4 Características generales de la línea celular HeLa.	71
Cuadro 3.1.5 Características generales de la línea celular SiHa.	72
Cuadro 3.1.6. Molaridad de los compuestos en los cultivos celulares.	76
Cuadro 3.1.7 Dosis efectiva media (CE50) de las ACG y doxorubicina sobre las líneas celulares neoplásicas humanas.	83
Cuadro 3.2.1. Efecto de las acetogeninas en las células tumorales de cervix HeLa y colorectal SW-480.	93
Cuadro 3.2.2. Dosis administradas de laherradurina y doxorubicina en los ratones implantados con células HeLa.	97
Cuadro 3.2.3 Dosis administradas de laherradurina y doxorubicina en los ratones implantados con células SW-480.	104
Cuadro 3.2.4. Dosis administradas de cherimolina-2 y doxorubicina a los ratones implantados con células HeLa.	110
Cuadro 3.2.5. Dosis administradas de cherimolina-2 y doxorubicina a los ratones implantados con células SW-480.	116
Cuadro 3.3.1 Respiración de las células control AS-30D.	131
Cuadro 3.3.2 Consumo de oxígeno de las células AS-30D en presencia de las acetogeninas.	132
Cuadro 3.3.3 Consumo de oxígeno por las mitocondrias en presencia de las acetogeninas.	134
Cuadro 8.1 Reducción final de los tumores en los animales que recibieron las concentraciones 100 y 500 veces la CE ₅₀ de laherradurina y la cherimolina-2. .	142

Índice de Figuras	Página
Figura 1.1 Distribución de la familia Annonaceae.	7
Figura 1.2 Especies frutículas de anonas.	8
Figura 1.3 Distribución geográfica de <i>Annona diversifolia</i>	10
Figura 1.4 Árbol y frutos de <i>Annona diversifolia</i>	11
Figura 1.5 Estructura general de las acetogenina de anonáceas.....	16
Figura 1.6 Tipos de anillos encontrados en las acetogeninas de anonáceas.	19
Figura 1.7 Acetogeninas de Briofitas.....	20
Figura 1.8 Esquema de la cadena respiratoria acoplada a la síntesis de ATP. ...	43
Figura 1.9 Estados respiratorios en la mitocondria.	44
Figura 1.10. Posibles sitios de unión de los inhibidores al complejo I mitocondrial. Modificado de Tormo <i>et al.</i> , 1999b.	50
Figura 1.11. Esquema de la prueba de inhibición de la: a) NADH: decilubiquinona oxidoreductasa y b) de la NADH oxidasa (modificado de Tormo <i>et al.</i> , 1999b). ..	52
Figura 1.12 Ratón atímico de seis semana de edad.	63
Figura 3.1.1. Ubicación geográfica de Copoya en el Municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.	68
Figura 3.1.2. Estructura de laherradurina.	69
Figura 3.1.3. Estructura de cherimolina-2.	70
Figura 3.1.4 Flujograma de los ensayos de proliferación celular.....	75
Figura 3.1.5 Actividad de los compuestos en las células Ca Ski.....	78
Figura 3.1.6. Actividad de los compuestos en las células SiHa.....	79
Figura 3.1.7. Actividad de los compuestos en las células MCF-7.	80
Figura 3.1.8. Actividad de los compuestos en las células HeLa.	81
Figura 3.1.9 Actividad de los compuestos en las células SW-480.	82
Figura 3.1.10 Efecto del tiempo de exposición a 1.6 μ M de laherradurina.	84
Figura 3.1.11 Efecto del tiempo de exposición a 1.56 μ M de cherimolina-2.	85
Figura 3.1.12 Efecto del tiempo de exposición a 1.8 μ M de doxorubicina.....	87

Figura 3.2.1 flujograma para la evaluación de los tumores inducidos en ratones atímicos.....	94
Figura 3.2.2 Efecto de 0.024 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina y de 0.028 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células HeLa.	98
Figura 3.2.3 Efecto de 0.024 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina y de 0.028 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células HeLa.	99
Figura 3.2.4 Efecto de 2.4 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina y de 2.8 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células HeLa.	100
Figura 3.2.5 Efecto de 12 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina y de 13.8 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células HeLa.	101
Figura 3.2.6 Efecto de 24 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina en los ratones atímicos.	102
Figura 3.2.7 Efecto comparativo de las dosis de laherradurina en el desarrollo de los tumores de células HeLa.	103
Figura 3.2.8 Efecto de 0.024 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina y de 0.028 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células SW-480.....	105
Figura 3.2.9 Efecto de 0.024 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina y de 0.028 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células SW-480.....	106
Figura 3.2.10 Efecto de 2.4 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina y de 2.8 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células SW-480.....	107
Figura 3.2.11 Efecto de 12 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina y de 13.8 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células SW-480.....	108
Figura 3.2.12 Efecto comparativo de las dosis de laherradurina en el desarrollo de los tumores de células SW-480.....	109
Figura 3.2.13 Efecto de 0.078 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de cherimolina-2 y 0.092 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células HeLa.	111
Figura 3.2.14 Efecto de 0.078 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de cherimolina-2 y 0.092 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células HeLa.	112
Figura 3.2.15 Efecto de 0.78 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de cherimolina-2 y 0.92 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células HeLa.	113
Figura 3.2.16. Efecto 39 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de cherimolina-2 y 46 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células HeLa.	114
Figura 3.2.17 Efecto comparativo de las dosis de cherimolina-2 en el desarrollo de los tumores de células HeLa.	115

Figura 3.2.18. Efecto de $0.78 \mu\text{mol g}^{-1} \text{día}^{-1}$ de cherimolina-2 y $0.9 \mu\text{mol g}^{-1} \text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células SW-480.....	117
Figura 3.2.19. Efecto de $7.8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{día}^{-1}$ de cherimolina-2 y $9 \mu\text{mol g}^{-1} \text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células SW-480.....	118
Figura 3.2.20 Efecto de $78 \mu\text{mol g}^{-1} \text{día}^{-1}$ de cherimolina-2 y $90 \mu\text{mol g}^{-1} \text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células SW-480.....	119
Figura 3.2.21 Efecto comparativo de las dosis de cherimolina-2 en el desarrollo de los tumores de células SW-480.....	120
Figura 3.3.1 Flujograma para medir el consumo de oxígeno en célula AS-30 D y en mitocondrias aisladas.....	126
Figura 3.3.2 Consumo de oxígeno celular en presencia de las acetogeninas. ...	132
Figura 3.3.3 Consumo de oxígeno de las mitocondrias en presencia de las acetogeninas. Actividad respiratoria del estado 3 (A) y 4 (B).....	134
Figura 3.3.4 Porcentajes del control respiratorio (CR) y del cociente ADP/O en mitocondrias expuestas a las acetogeninas.....	135

Resumen

Las acetogeninas de la familia Annonaceae (ACG) son potentes inhibidores del complejo I mitocondrial y son citotóxicas en células tumorales en cultivo. Sin embargo, no existen reportes acerca de la relación entre su actividad inhibitoria en los cultivos celulares y su efecto antitumoral en animales.

Las ACG laherradurina y la cherimolina-2 aisladas de *Annona diversifolia* inhibieron la proliferación de las células tumorales humanas de cervix (Ca Ski, SiHa y HeLa), mama (MCF-7) y colon (SW-480) de manera dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. La Concentración Efectiva 50 de las acetogeninas (CE_{50}) fue menor o semejante a la del fármaco oncológico doxorubicina, siendo laherradurina el compuesto más activo.

Lotes de ratones atímicos implantados con células HeLa o SW-480 recibieron diferentes dosis de acetogeninas. La dosis inicial correspondió a la CE_{50} de la ACG multiplicada por el peso del animal. Laherradurina a 2.4 y 12 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ redujo en 53 y 65 % el desarrollo de los tumores de células HeLa y en 44 y 60 % los de SW-480. Por su parte la cherimolina-2 a 7.8 y 39 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ inhibió el desarrollo de los tumores de células HeLa en 30 y 40% pero no mostró efectos significativos sobre los de SW-480.

Las células de hepatoma de rata AS-30D expuestas a las ACG, redujeron el consumo de oxígeno de manera concentración-dependiente en tanto que las mitocondrias expuestas a las ACG y estimuladas con ácido glutámico, ADP y P_i , mostraron disminuido el estado 3 respiratorio asociado a la síntesis de ATP.

La reducción de los niveles de ATP causados por laherradurina y la cherimolina-2 puede comprometer los procesos celulares dependientes de energía; así, la proliferación disminuida en los cultivos celulares y el menor desarrollo de los tumores en los ratones atímicos pueden explicarse. Los resultados señalan a las ACG como buenas candidatas en el desarrollo de fármacos antineoplásicos.

Summary

Acetogenins from Annonaceae (ACG) are potent inhibitors of mitochondrial complex I and they show cytotoxic activity on culture tumor cells. However, no information is available regarding the relationship between their inhibitory activity in cell cultures and their antitumoral effect in animals.

Laherradurin and cherimolin-2 acetogenins isolated from *Annona diversifolia*, showed a time- and concentration-dependent inhibition on human tumor cells from cervix (Ca Ski, SiHa and HeLa), breast (MCF-7) and colon (SW-480). The ACG Effective Concentration 50 (EC₅₀) was smaller or similar to the oncology drug doxorubicin, being laherradurin the most active compound.

Groups of athymic mice implanted with HeLa or SW-480 cells received different doses of acetogenins. The acetogenin EC₅₀ multiplied by the weight of the animal was taken as the initial dose. Laherradurin at 2.4 and 12 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{day}^{-1}$ significantly reduced in 53 and 65 % HeLa and in 44 and 60 % SW-480 tumor developments, respectively. On the other hand, doses of 7.8 and 39 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{day}^{-1}$ of cherimolin-2 had inhibitory effect of 30 and 40 % on HeLa tumors, but showed no significant effect on SW-480 tumor development.

Rat hepatoma AS-30D cells exposed to the ACG, showed concentration-dependent reduced oxygen consumption, meanwhile the mitochondria exposed to ACG and stimulated with glutamate, ADP and Pi, showed the rate of state 3 respiration associated with ATP synthesis decreased.

The ATP levels reduction caused by laherradurin y cherimolin-2, could compromise the energy-dependent cellular processes; thus, the decreased proliferation in cell cultures and the lesser development of tumors in athymic mice can be explained. The results point out that the ACG are good candidates in the development of antineoplastic agents.

Introducción

El conocimiento de las propiedades medicinales de las plantas es inmemorable, por lo que no es sorprendente que en los textos mas antiguos encontrados en la antigua Mesopotamia (actual Irak), se describan en caracteres cuneiformes, la preparación de pócimas y remedios con diferentes partes vegetales para fines curativos (Margotta, 1972). Actualmente, se conoce un número aproximado de 300 000 especies de plantas y de ellas, las que son cultivadas o explotadas por el hombre constituyen un porcentaje muy pequeño, con lo cual el potencial de la mayoría de las plantas se desconoce o en el mejor de los casos, se encuentra en la farmacopea de los pueblos autóctonos (Cowan, 1999).

Las plantas producen una variedad de moléculas de bajo peso molecular denominadas metabolitos secundarios (fenoles, flavonoides, taninos, cumarinas, esteroides, alcaloides y otros compuestos) cuya función se ha relacionado en la comunicación de las plantas con su entorno; también al ser químicamente activos, pueden interaccionar con receptores o moléculas blanco de otros sistemas biológicos modificando sus procesos fisiológicos y exhibiendo de manera natural actividades biológicas como la antifúngica, antimicrobiana, insecticida, citotóxica etc. (Anaya y Espinosa-García, 2006) convirtiéndose para el hombre en compuestos de gran interés biotecnológico. Algunas de sus aplicaciones se encuentran en la industria farmacéutica (como antibióticos y antineoplásicos), alimentaria (saborizantes y colorantes), cosmética (esencias y perfumes) y agroquímica (insecticidas y repelentes), entre otros.

En las últimas décadas los avances tecnológicos han ayudado al aislamiento y purificación de algunos metabolitos secundarios, lo que a su vez ha permitido la identificación y su caracterización como principios activos (Butler, 2005). El potencial de los productos naturales como fuente primaria de fármacos o en su desarrollo puede ser apreciado durante el periodo 1981-2002, en el cual 877 moléculas fueron señaladas como recursos para nuevas fármacos. Si bien el 67% de ellos podían ser sintetizados, 16% contenían farmacóforos derivados de productos naturales y 12%

fueron modelados sobre estructuras de inhibidores naturales (como inhibidores de ATP) (Newman *et al.*, 2003).

Se ha estimado que aproximadamente un cuarto de los medicamentos que son prescritos para el tratamiento de enfermedades neurológicas, cardiovasculares, metabólicas, del sistema inmune, infecciosas, parasitarias y neoplásicas, contienen extractos de plantas o ingredientes activos obtenidos o modelados de productos naturales. Entre los fármacos de origen natural más conocidos por su utilidad clínica, se encuentran la morfina y la codeína, alcaloides extraídos del opio o latex de la cápsula de la amapola *Papaver somniferum*; los glucósidos cardiotónicos: digoxina obtenido de las hojas de *Digitalis lanata* y la digitoxina de *Digitalis purpurea*, así como los alcaloides con efecto antimuscarínico: atropina (o *dl*- hioscina), extraída de las plantas *Atropa belladonna* y *Datura stramonium* y la escopolamina (o *l*- hioscina) obtenida de *Hyoscyamus niger*; asimismo la aspirina, profusamente consumida como analgésico y útil para prevenir la trombosis e infartos, es un derivado del ácido salicílico que se encuentra naturalmente en las especies de sauce *Salix* y *Spiraea* (Anaya y Espinosa- García, 2006).

En el área oncológica, el 67% de los medicamentos utilizados tiene un origen natural. Entre ellos se incluyen a agentes derivados de las plantas como los alcaloides vinblastina y vincristina aislados de *Catharanthus roseus*, planta originaria de Madagascar (Huan *et al.*, 2004), el paclitaxol (taxol), aislado de la corteza de los árboles del noroeste del Pacífico, *Taxus brevifolia*, y su análogo docetaxol, un etopósido derivado semisintéticamente de la podofilotoxina, aislada de las raíces de las especies de *Podophyllum*, (Huang y Fan, 2002) y la camptotecina, aislada de la corteza de *Camptotheca acuminata*, un precursor de la droga semi-sintética topotecan (Brantley-Finley *et al.*, 2003).

Algunas otras están en fase de pruebas clínicas como la homoharringtonina, un alcaloide de *Cephalotus harringtonia*; el flavopiridol, un compuesto sintético basado en estructuras de *Dysoxylum binectariferum* y la combretastina A4 obtenida de la planta del sureste africano *Combretum caffrum* (Butler, 2005; Cragg, 2006).

Adicionalmente, existen fármacos anticancerosos de origen microbiano como las antraciclinas, actinomicinas, bleomicinas y mitomicinas, entre otros (Minotti *et al.*, 2004; Bredel, 2001).

Desde 1991 el National Cancer Institute, de Estados Unidos de Norteamérica (NCI), ha analizando extractos de diversas familias de plantas y entre las que se consideran interesantes por el número de especies “activas” se encuentran: Fabaceae, Myrsinaceae, Annonaceae, Apocynaceae, Meliaceae, y Solonaceae. Las familias Clusiaceae, Flacourtiaceae, Myrtaceae y Sapindaceae son moderadamente activas. Dentro de la familia Annonaceae, los moléculas denominadas “acetogeninas de anonáceas” pudieran tener un papel importante por su actividad citotóxica (Cragg *et al.*, 2006).

Si bien la búsqueda de nuevos medicamentos anticáncer es una de las áreas mas dinámicas de la farmacología, uno de los mayores retos es la búsqueda de compuestos que durante su administración sean lo menos agresivos y no produzcan efectos indeseables, tengan especificad a las células neoplásicas y de manera importante, que no induzcan mecanismos de multiresistencia a los fármacos o que actúen sobre los tumores que los expresan; esto último reduciría en gran medida la mortalidad de los pacientes con cáncer y podría ser de vital importancia en el control de las neoplasias.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. Las acetogeninas de la familia Annonaceae

1.1.1. La familia Annonaceae

La familia Annonaceae (anonácea) se ubica dentro de las Angiospermas primitivas, en la subclase Magnoliidae y orden Magnoliales y aunque el número de géneros y especies incluidos esta en debate, Hutchinson (1964) reconoce 122 géneros y 1100 especies. Las plantas se distribuyen en regiones tropicales y con menor frecuencia en las subtropicales, hasta el norte de Australia y las islas del Pacífico y sólo algunas de los géneros *Asimina* y *Deeringothamnus* se encuentran en zonas templadas de Norteamérica. Existen pocas coincidencias en la distribución de las plantas entre los continentes siendo *Xilopia* el único género que se presenta en los trópicos de ambos Hemisferios; *Guatteria* en América y una especie en África Occidental; *Anaxagorea* es común en el centro y noreste de América del Sur y en el Indomalaya (Figura 1.1) (González Esquinca, 2005).

Las anonáceas son plantas dioicas, raramente monoicas o androdioicas, que presentan hojas simples, alternas, dísticas. Las flores son generalmente bisexuales, simples o en inflorescencias terminales o axilares; de color verde, amarillento o purpúreo, frecuentemente con tres sépalos y seis pétalos en dos verticilos de tres; los pétalos son libres o fusionados; la mayoría de las especies tienen más de 12 estambres. Los frutos son de diverso tamaño, pueden ser lisos o con proyecciones; las semillas son lisas o tuberculadas con o sin tapón micropilar (Standley y Steyermark, 1946). La polinización la efectúan frecuentemente pequeños escarabajos que llegan a utilizar las flores como lugar de puesta, mientras que escarabajos más grandes destruyen partes florales al alimentarse de ellas. Para defenderse de estos últimos, algunas especies impiden el acceso a los carpelos mediante el cierre de los pétalos internos, produciéndose autopolinización. La dispersión de frutos y semillas la efectúan fundamentalmente animales frugívoros. (Coates-Estrada y Estrada, 1988)

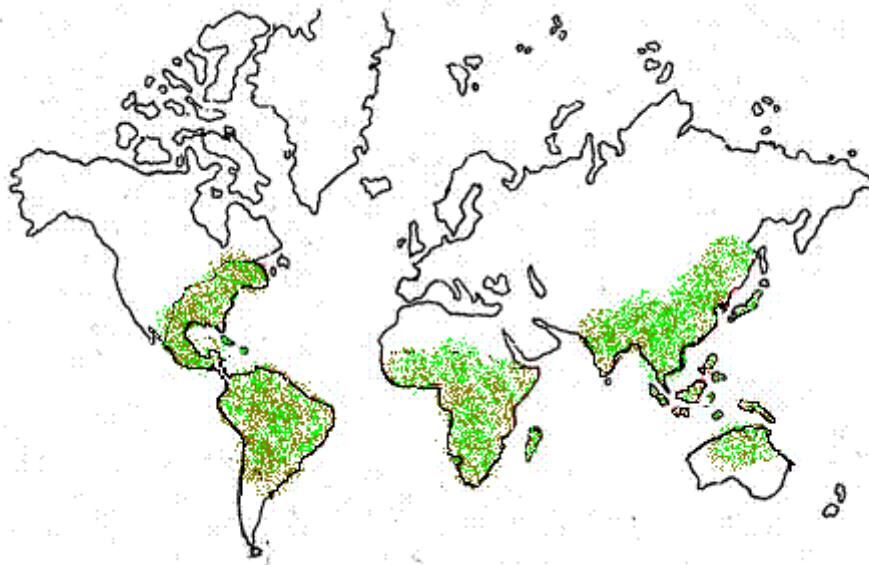


Figura 1.1 Distribución de la familia Annonaceae.

El principal interés económico de la familia se centra en la extracción de esencias de las flores del "ylang-ylang" (*Cananga odorata*) de origen asiático, las cuales son ampliamente utilizadas en la industria perfumera, así como en los frutos comestibles de algunas especies de *Annona* de origen americano. Otros usos importantes incluye a las semillas de *Monodora myristica* como sustituto de la nuez moscada y las de *Xylopia aethiopica* en lugar de pimienta ("pimienta de Guinea") en África; algunas maderas como la "yaya" (*Oxandra lanceolata*) son de interés en la fabricación de mangos y de tacos de billar y otras son de uso local en la construcción y para postes. Muchas especies tienen usos en la farmacopea local de culturas asiáticas y americanas para curar diversas enfermedades (Morton, 1987). En México, las anonáceas fueron usadas desde tiempos prehispánicos, entre ellas la "orejuela" o "flor de oreja" (*Cymbopetalum penduliflorum*) que es la "xochinacaztli", o flor sagrada de los aztecas, además de que existen indicios del consumo de sus frutos por los antiguos mayas (Pincemín, 1999)

Los estudios fitoquímicos muestran que en las raíces y tallos se producen alcaloides bencilisoquinolínicos y aporfínicos en grandes cantidades (Waterman, 1984). Asimismo, los aceites fijos y aceites esenciales, terpenos, flavonas, flavinas y glucósidos son compuestos abundantes en la familia (Pérez Amador et al., 1997). Otras moléculas de interés filogenético y característicos de la familia

son las acetogeninas, ya que compuestos semejantes a sus precursores biogénicos han sido aislados de esponjas (Guerrero *et al.*, 1998) y hepáticas (briofitas) (Asakawa, 2001) lo que tiende a confirmar el arcaísmo de la familia; además de presentar diversas actividades citotóxicas sobre células, parásitos y bacterias lo que las convierte en moléculas de gran interés biotecnológico.

1.1.2 El género *Annona*

En América la familia Annonaceae comprende 38 géneros y 740 especies; de ellos *Annona* es el más abundante (120 especies) agrupando plantas que producen frutos de delicado sabor como las “anonas” (*A. lutescens*), la “guanábana” (*A. muricata*), la “papausa” (*A. diversifolia*) y las “chirimoyas” (*A. cherimolia*) (González-Esquinca, 2005).

El nombre “anona” deriva del latín “cosecha anual” y las especies que integran este género presentan características en común como su altura, sistema radicular, corteza, tallo, biología floral, polinización, fijación y tipo de fruto. Son arbustos o árboles pequeños, cuya altura varía de 5 a 11 metros dependiendo de la especie y de factores como el clima, suelo y manejo del cultivo; erectos o algo ramificados, con corteza café-grisácea, a menudo áspera o arrugada, tomentosos cuando son jóvenes y mas tarde llegan a ser glabros; con pocas excepciones son deciduos, incluso las especies tropicales (Pinto *et al.*, 2005).



Figura 1.2 Especies frutícolas de anonas.

Las flores son hermafroditas, usualmente algo fragantes, solitarias o en fascículos de 2 a 4 flores, con sépalos verdes y seis pétalos ordenados en dos verticilos. El verticilo externo y el interno tienen tres pétalos. Las flores poseen varios conglomerados de estambres distribuidos espiralmente debajo y alrededor de una cúpula de carpelos unidos, los cuales tienen un óvulo cada uno. Después de la fertilización, los carpelos unidos formarán un sincarpo o fruto compuesto (*Ibidem*) (Figura 1.2).

La floración inicia a los cuatro años, aunque puede ocurrir antes dependiendo de las condiciones ambientales. La antesis comienza lentamente, con la separación del ápice de los pétalos externos y toma de seis a ocho horas en completarse. La polinización se realiza principalmente por insectos o algunas veces mediante anemocoria. El hecho es que las flores son protóginas (los pistilos están maduros antes de que el polen sea liberado desde las anteras) sugiriendo que la autopolinización no es una regla para la anonas. Debido a las flores protóginas, la fijación de los frutos puede ser pobre cuando las poblaciones de insectos polinizadores son pequeñas y pueden producirse frutos asimétricos y pequeños, ya que el tamaño y la forma del fruto dependen del número y posición de los óvulos fertilizados (Pinto *et al.*, 2005).

1.1.3 *Annona diversifolia* Safford

El origen de esta especie se ubica entre el sur de México, Guatemala y El Salvador; aunque relativamente poco difundida, es muy apreciada por sus frutos en las regiones donde existe. En México se distribuye entre los 0 y los 800 msnm, desde el Centro hasta al Sureste de México (Figura 1.3). El cultivo de la anona es considerado rústico y soporta condiciones adversas, propio de suelos arcillosos y pedregosos. La planta requiere de un clima cálido, con temperaturas entre 24 y 37°C con una estación seca y otra húmeda. Algunos de sus nombres comunes en México son ilama, ilama zapotl (“zapote de las viejas” en náhuatl), hilama, o papusa; en Guatemala se le denomina anona blanca o papausa, y en El Salvador anona blanca (De la Cruz. 2001).

Annona diversifolia es un árbol pequeño, de ramas glaucas, completamente glabras. Presenta dos clases de hojas: las ordinarias de 4-6 cm

de ancho con pecíolos de 8-18 mm de largo, redondeadas o subacutadas en el ápice, acutadas o redondeadas en la base, glabras por abajo; y otras que son inferiores a los brotes florales en forma de brácteas, orbiculares y cordado-ceñidas de 2-4 cm de longitud. Las flores son solitarias de color rosa a púrpura, con 3 pétalos exteriores de 2.5 cm de longitud y cerca de 6 cm de ancho en la base; linear-oblongas, obtusas, minuciosamente pubescentes por fuera y 3 pétalos internos rudimentarios; los sépalos de 2-3 mm de longitud son redondeados a triangulares, ferruginoso-pilosos en la superficie de arriba. Los pedicelos de 3-5 cm de longitud son adelgazados, glabros, recurvados o pendulosos (Standley and Steyermark, 1946).



Figura 1.3 Distribución geográfica de *Annona diversifolia*.

Los frutos son ovoides, tomentosos, generalmente 13-15 cm de longitud y 12-15 cm de ancho, cubiertos con ligeras protuberancias. Los frutos cuando maduran, tienden a abrirse en su base, dejando al descubierto parte de su pulpa carnosa y eventualmente las semillas. La pulpa es aromática, blanca o rosa, con un sabor ligeramente ácido y rica en carbohidratos, lo cual la hace susceptible a los hongos. Las semillas son oblongo-ovoides de 2 cm de largo y 1 cm de ancho y tomadas del fruto maduro presentan un periodo de latencia por varias semanas o meses hasta por un año (Figura 1.4).



Fotografía: Paul Perezgrovas

Figura 1.4. Árbol y frutos de *Annona diversifolia*.

En Chiapas los frutos se cosechan de agosto a octubre y se comercializan en el mismo lugar de producción o llevándolos al mercado local. Debido a sus características perecederas, éstos se consumen únicamente en fresco o en bebidas, helados y paletas, (De la Cruz. 2001). Su clasificación taxonómica se presenta a continuación.

Cuadro 1.1 Clasificación taxonómica de *A. diversifolia* (Hutchinson,1964).

Reino	Plantae
Subreino	Magnoliophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Magnoliidae
Orden	Magnoliales
Familia	Annonaceae
Género	<i>Annona</i>
Especie	<i>diversifolia</i>

1.1.4 Los metabolitos secundarios de las plantas

Las plantas producen y liberan compuestos químicos que son producto de su adaptación al ambiente y que pueden afectar de manera significativa a otros organismos, estableciendo interacciones químicas entre ellos; estas señales

(compuestos nitrogenados, terpenos y compuestos fenólicos) están constituidas por moléculas de bajo peso molecular, originadas en las vías metabólicas secundarias. Debido a que las moléculas precursoras son utilizadas para sintetizar compuestos del metabolismo primario (carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos), ambos metabolismos están interconectados en una amplia extensión que dificulta establecer una clara división entre ellos (Bode y Müller, 2003).

En las plantas se han descrito alrededor de 50,000 metabolitos secundarios considerándose que este número pudiera ser de cientos de miles y cuya variedad de estructuras aún se desconoce (Pichersky y Gang, 2000). Su papel en las últimas décadas ha sido relacionado con la interacción de los organismos con su ambiente; su biosíntesis y/o liberación pueden ser de manera constitutiva o bien inducida por daño mecánico, presencia de parásitos, herbívoros y por factores ambientales. (Espinosa-García, 2001).

Entre las funciones documentadas de estos compuestos esta la acción de repeler a los insectos, desalentando su ovipostura o alimentación, interferir con su desarrollo o causar su muerte. También se conoce la liberación de compuestos volátiles (terpenoides, aceites esenciales, fenil-propanoides etc.) que pueden movilizar a los depredadores de sus atacantes en lo que se ha llamado defensa indirecta (Dudareva *et al.*, 2004; Kant *et al.*, 2004).

Su gran complejidad espacial y temporal podría explicar por qué una población vegetal puede soportar conjuntos de consumidores diferentes, y su heterogeneidad química y diferentes mezclas, ofrecer efectos sinérgicos o aditivos entre ellos lo que dificultaría la adquisición de la resistencia de los atacantes e incrementaría la competencia de los herbívoros y patógenos por los recursos vegetales (Cates, 1996). Así, las interacciones entre las plantas y sus consumidores ha llevado a estrategias de adaptación y coevolución ente ellos.

Todas las especies ocupan un nicho ecológico y están sujetas a un equilibrio inestable con su ambiente (factores climáticos, biológicos, o una alteración en el equilibrio presa-consumidor), por lo que deben adaptarse, emigrar o extinguirse. Como las plantas no pueden emigrar, excepto por la vía de

dispersión de las semillas, es probable que esta sea una de las razones de la presencia y diversificación de las rutas metabólicas secundarias, lo que les permiten hacer frente a los desafíos del ambiente y a la defensa contra sus consumidores y otros competidores. Todo ello tiene costos (en última instancia de energía), lo que permite suponer que la biosíntesis de los metabolitos secundarios y su variabilidad debe estar regulada por las condiciones del entorno ecológico, que a su vez se traduce en la transcripción y regulación oportuna de elementos genéticos (Doebley y Lukens, 1998) que inducen una plasticidad metabólica con consecuencias ecológicas y evolutivas.

1.1.5 Actividad biológica y potencial farmacológico de extractos y metabolitos secundarios de las anonáceas

Siendo las anonáceas una familia ampliamente distribuida en el planeta, no es sorprendente que fueran utilizadas como recursos herbolarios importantes en Asia y América. Por ejemplo, las semillas en polvo y los extractos de las hojas de *Annona* sp. son empleados en Asia para matar piojos, mientras que la corteza de *Goniothalamus* sp. para repeler mosquitos (Leatemala e Isman, 2004). En México el jugo de la fruta de *A. purpurea* se utiliza para aliviar fiebres y escalofrío; el cocimiento de su corteza es efectivo contra la disentería y un té de la corteza interna se administra para aliviar edemas (Morton, 1987).

El estudio de los extractos obtenidos de las diferentes partes de las plantas, indica la presencia de metabolitos con actividades biológicas y farmacológicas interesantes. Así, algunos extractos han sido evaluados contra plagas en busca de insecticidas ambientalmente seguros. Por ejemplo, los extractos acuosos de las hojas de *A. squamosa* produjeron descensos en la oviposición, eclosión y emergencia de *Anastrepha obliqua* (Perales y Martínez 1999) y los acetónicos y etanólicos sobre los huevos, larvas y adultos del gorgojo del garbanzo *Callosobruchus maculatus*, (Dharmasena *et al.* 2001); la combinación del polvo de semillas de *A. squamosa* con piperonil butóxido redujo la fecundidad, eclosión y sobrevivencia de los caracoles *Lymnaea acuminata* (Singh *et al.*, 2005). Su efecto tóxico es también significativo sobre insectos vectores de enfermedades tropicales como los extractos etanólicos de semillas *A. muricata* que produjeron un 100% de mortalidad en larvas del mosquito *Aedes*

aegypti L., el principal vector del dengue (Bobadilla *et al.*, 2005); los extractos acuosos de semillas de *A. squamosa* sobre *Culex quinquefasciatus* (Pérez-Pacheco *et al.*, 2004) y los extractos etanólicos de semillas de *A. cherimolia* y *A. muricata* sobre las larvas del IV estadio de *Anopheles* sp. (Bobadilla 2002).

Más aún, los extractos tienen buena actividad para el control de microorganismos como protozoarios, bacterias y virus de importancia médica, destacando los etanólicos de tallo de *Enantia polycarpa* sobre *Plasmodium falciparum* y *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Kamanzi *et al.*, 2004); los metanólicos y acuosos de hojas y tallos de *A. squamosa* sobre *Plasmodium falciparum* (El Tahir *et al.*, 1999); los hexánicos y de acetato de etilo del pericarpio de *A. muricata* contra promastigotes de *Leishmania braziliensis* y *L. panamensis* (Jaramillo *et al.*, 2000); los etanólicos de tallos de *A. muricata* sobre los aislados clínicos del virus Herpes simple-1 (HSV-1) (Padma *et al.*, 1998) y los hexánicos y de acetato de etilo de las raíces de *Uvaria hookeri* y *Uvaria Nahum* sobre bacterias, hongos y el helminto adulto de bovinos *Haemonchus contortus* (Padmaja *et al.*, 1993).

Los metabolitos aislados también tienen efectos importantes y pueden actuar de manera individual o en sinergismo con otros compuestos para producirlos. El heptapéptido cíclico cherimolaciclopeptido C de semillas de *A. cherimolia* presenta actividad citotóxica sobre las células del carcinoma nasofaríngeo (KB) (Wélé *et al.*, 2004) y el ácido traquilobánico obtenido de *X. frutescens*, *X. amazonica* y *A. ambotay* tiene actividad bactericida contra *B. subtilis* y *S. aureus* (Takahashi *et al.*, 2006). Los aceites esenciales extraídos de semillas de *Monodora myristica* son citotóxicos sobre protozoarios y bacterias de pacientes con infecciones clínicas (Cimanga *et al.*, 2002) y los del fruto de *Dennetia tripetala* sobre los microorganismos que habitan en diversos alimentos (Ejечи y Akpomedaye, 2005).

Debido a que las anonáceas sintetizan grandes cantidades de alcaloides bencilisoquinolínicos y aporfínicos, el estudio de su actividad biológica ha sido uno de los campos de mayor interés, mencionándose que la *R*-roemerina de *A. senegalensis* interacciona con las P glicoproteínas de células cancerosas multiresistentes a los fármacos evitando su funcionamiento, actividad que la

propone como un buen adyuvante en la terapia anticáncer. La oxopurpureina y la O- metilaterolina de *A. purpurea* son citotóxicas para las células tumorales 9-KB al igual que la kuafumina de *Fissistigma glaucescens*. El alcaloide liriodenina que se encuentra en diversas familias botánicas, es citotóxico para las células de carcinoma nasofaríngeo (KB), de pulmón (A-549), intestino (HCT-8) y leucemia (P-388 y L-1210) (Stévigny *et al.*, 2005) y los alcaloides annonanina, asimilobina y nornuciferina de las semillas de *A. muricata* tienen efectos sedativos y son afines a los receptores 5-HT1A del sistema nervioso central, involucrados en la modulación de las emociones (Hasrat *et al.*, 1997).

Otros compuestos importantes, son las acetogeninas, las cuales son características de esta familia botánica. El hecho de que muestren actividad antitumoral, citotóxica, antiparasitaria, insecticida, antimicrobiana, antifúngica e inmunosupresiva, ha dado un gran impulso a las investigaciones bioquímicas y farmacológicas de estas moléculas (Zafra-Polo *et al.*, 1998).

1.1.6 Las acetogeninas de la familia Annonaceae

1.6.1.1 Estructura general

Las acetogeninas están consideradas dentro del grupo de los policétidos y junto con los ácidos grasos, son los principales compuestos originados a partir de la AcetilCoA (Piñol y Palazón, 1993). Los policétidos son compuestos de cadena lineal, cuya disposición estructural se caracteriza por una alternancia de átomos de carbono con o sin oxígeno, en unidades ceto y metilo alternantes (-CH₂-CO)-n o (CH₃-CH₂-CO)-n formando cadenas policetometilénicas del tipo -(CH₂-CO) n-, conocidos como cetopolímeros, que frecuentemente se modifican por la introducción de grupos hidroxilo, metilo, átomos de halógenos o por procesos de ciclación (Gros *et al.*, 1985).

En 1982, Joland reportó al primer miembro de una nueva clase de metabolitos secundarios en las plantas, la uvaricina, aislada de las raíces de *Uvaria acuminata* (Annonaceae). El nombre de acetogeninas fue una terminología basado en su origen biosintético (ruta de los policétidos). En la actualidad y dentro del mismo grupo, se han identificado a más de cuatrocientos compuestos naturales bien definidos y únicamente encontrados en las especies de la familia

Annonaceae, por lo que se les conoce genéricamente como acetogeninas de anonáceas (ACG) (Bermejo *et al.*, 2005).

La estructura general de las acetogeninas muestra una cadena alifática de 35 ó 37 átomos de carbono con un anillo lactona metil sustituido, α , β insaturado terminal, que en ocasiones está arreglado como ceto-lactona. (Fig.4.1). Adicionalmente pueden poseer uno, dos o tres anillos tetrahidrofuránicos (THF) y algunos sustituyentes oxigenados (hidroxilos, acetoxilos, cetonas y epóxidos); en algunos casos existen dobles enlaces. También, en menor proporción, se han descrito compuestos con anillos tetrahidropiránicos (THP) y compuestos lineares (Cavé y col., 1997; Zafra-Polo *et al.*, 1996).

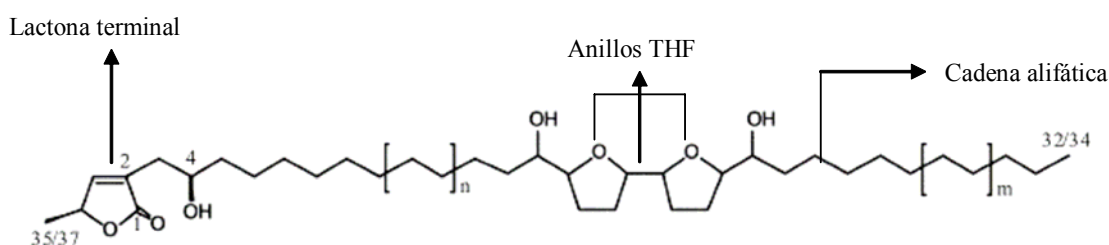


Figura 1.5 Estructura general de las acetogenina de anonáceas.

1.1.6.2. Clasificación de las acetogeninas

De aproximadamente 122 géneros de la familia Annonaceae (Hutchinson, 1964), las acetogeninas han sido aisladas en únicamente 10 % de ellos, siendo el género *Annona* el que hasta ahora presenta mayor diversidad, quizás porque ha sido el más estudiado. Se conocen cerca de 420 estructuras naturales y es probable que esta cifra se eleve con el reporte de nuevos compuestos en géneros poco estudiados; asimismo, el aislamiento de nuevas moléculas que difieren de los patrones establecidos ha hecho que su clasificación se modifique continuamente. A continuación se presenta la descrita por Bermejo *et al.* (2005) la cual está asociada al sistema THF o THP y al tipo de lactona terminal en cada grupo (Cuadro 1.2; Figura 1.6).

Cuadro 1.2 Clasificación de las acetogeninas de Anonáceas (Bermejo *et al.*, 2005).

Grupo	Descripción	Sistema THF o THP	Lactona terminal
<u>Acetogeninas lineares (grupo 1).</u> Se incluyen cuatro subgrupos con diferente grado de insaturación e hidroxilación de su cadena alifática:			
1a	Con dos grupos hidroxilo adyacentes u oleofínicas; algunas presentan uno o dos dobles enlaces. Se incluyen a veintiún compuestos (tipo giganina).		L-A L-B1 L-D
1b	Con uno o dos grupos hidroxilo (o cetona) no adyacentes. Se incluyen tres compuestos (tipo reticulatamol).		L-A
1c	Olefínicas y acetilénicas. Sin grupos hidroxilo en la cadena alifática. Se incluyen catorce compuestos (tipo muridienina-1).		L-A L-C L-E L-F
1d	Lineares bis-lactónicas. Contienen 1 ó 2 grupos hidroxilo y presentan una lactona en ambos lados de la cadena alifática. Se incluyen dos compuestos (tipo rollicosina)		L-A
<u>Acetogeninas oleofínicas con anillos epoxi (grupos 2-4).</u> Estos compuestos probablemente se originan por oxidación de acetogeninas lineares y oleofínicas; se consideran metabolitos clave en la biosíntesis de ACG mono-, bis- y tri- THF			
2	Con un grupo epoxi. Se incluyen seis compuestos (tipo epoximurina-A).	E-A	L-A
3	Con dos grupos epoxi. Se incluyen nueve compuestos (tipo diepomuricanina-A)	E-B	L-A
4	Con tres grupos epoxi. Solo un compuesto ha sido aislado (tipo tripoxirollina).	E-C	L-A
<u>Acetogeninas con un anillo tetrahidrofurano (mono-THF) α, α'-dihidroxiladas (Grupos 5–8); α' ó α-hidroxiladas (Grupo 9); isoacetogeninas (ceto-acetogeninas) posiblemente formadas por translactonización de acetogeninas 4-hidroxil durante los procesos de extracción y por lo tanto no naturales (grupo 10) y acetogeninas con una lactona- β-hidroxil (grupo 11)</u>			
5	Con dos grupos hidroxilo. Se incluyen diecinueve compuestos (tipo uvariamicina-I).	T-A	L-A
6	Con grupos cetónicos y dos o tres grupos hidroxilo. Se incluyen veintiséis compuestos (tipo murisolina).	T-A	L-A

7	Con grupos cetónicos y tres o cuatro grupos hidroxilo; un grupo OH en el C4 (tipo annonacina) o ausente (plagionicina-A). Se incluyen sesenta y tres compuestos.	T-A	L-A
8	Con grupos cetónicos, tetra-hidroxiladas y poli-hidroxiladas. Se incluyen veintisiete compuestos (tipo annonomicina).	T-A	L-A
9	Con anillo THF α -monohidroxilado; Con un grupo OH presente en el C4 (tipo gigantetrocina-A) o ausente (tipo gigantriocina). Se incluyen treinta y cinco compuestos.	T-B	L-A
10	Iso-acetogeninas (cetoacetogeninas). Se incluyen veintidós compuestos (tipo isoannonacina).	T-A T-B	L-B1 L-B2
11	Con un grupo hidroxilo en posición β (tipo jeteina) o en C34 ó C36 en el anillo lactona (tipo donnaienina-A). Se incluyen catorce compuestos.	T-A T-B	L-C L-D
<u>Acetogeninas con dos anillos tetrahydro furano (bis-THF) adyacentes (grupos 12–15), no adyacentes (grupos 16-18) o presentar lactonas saturadas (grupos 19 y 20).</u>			
12	Con dos grupos hidroxilo. Se incluyen a nueve compuestos (tipo uvaricina).	T-C	L-A
13	Con tres o cuatro grupos hidroxilo (con OH en C4). Incluye veintiséis compuestos (tipo asimicina).	T-C	L-A
14	Trihidroxiladas o dihidroxiladas con grupos cetónicos, tetrahidroxiladas y pentahidroxiladas. Sin grupos OH en el C4 (tipo esquamocina), o estar presentes en el C5 (tipo panalicina). Se incluyen cincuenta y tres compuestos.	T-C	L-A
15	Acetogeninas α -monohidroxiladas. Incluye quince compuestos (tipo goniodenina).	T-E	L-A
16	Bis-THF no adyacentes con un OH en el C4. Se incluyen diez compuestos (tipo silvaticina).	T-D	L-A
17	Bis-THF no adyacentes sin OH en el C4. Se incluyen seis compuestos (tipo almunequina).	T-D	L-A
18	Con los anillos THF no adyacentes en posiciones 4–7/16–19. Se incluyen tres compuestos (tipo aromina).	T-H	L-A
19	Con lactona saturada ó “Iso”-acetogeninas bis-THF. Se incluyen veinte compuestos (tipo bullatacinona).	T-C T-D T-E	L-B1
20	Con β -hidroxil- γ -lactona saturada. Se incluyen cuatro compuestos (tipo laherradurina).	T-C T-D	L-C

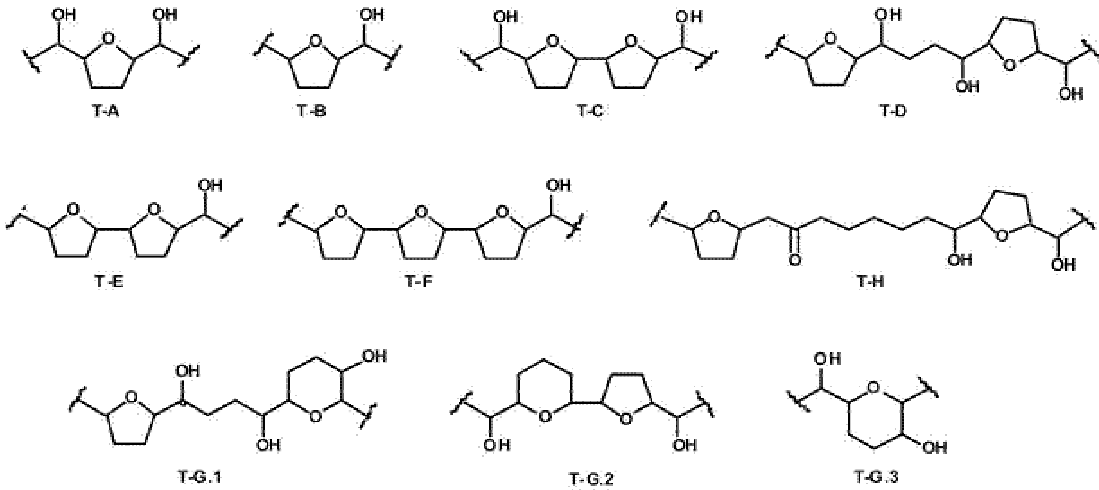
Acetogeninas con tres anillos THF (Tri-THF). Solo un compuesto ha sido aislado de la corteza de *Goniothalamus giganteus*

21	Tri-THF. Solo un compuesto ha sido aislado (tipo goniocina).	T-F	L-A
----	--	-----	-----

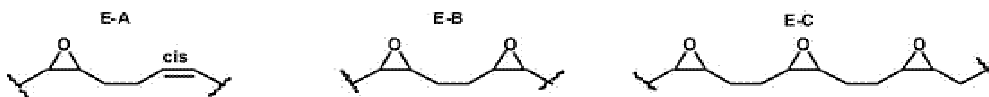
Acetogeninas con anillos tetrahidropirano (THP) en la cadena alifática. Son denominadas no clásicas

22	Acetogeninas Mono-THP (tipo piranicina); con un sistema THF-THP adyacente (tipo muconina) o no adyacente (tipo mucocina) Se incluyen ocho compuestos.	T-G1 T-G2 T-G3	T-A
----	---	----------------------	-----

Sistemas de anillos THF o THP



Sistemas de anillos epoxi



Tipos de lactona

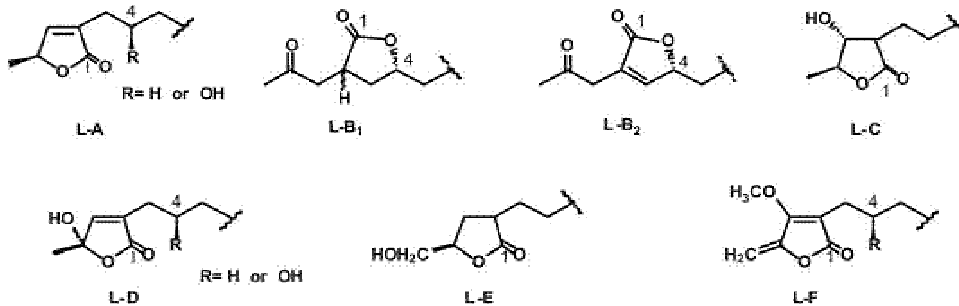


Figura 1.6 Tipos de anillos encontrados en las acetogeninas de anonáceas (Bermejo et al., 2005).

1.1.6.3 Biosíntesis

Aunque la biosíntesis de las acetogeninas aún no ha sido descrita, se ha propuesto con base en sus precursores y hemisíntesis biomimética, que el anillo lactónico se forma por la condensación aldólica de un precursor de tres carbonos y un ácido graso. Se cree que la formación de anillos tetrafurano es posterior a la lactonización ya que se han encontrado acetogeninas lineales (sin anillos tetrafurano) pero con grupos hidroxilo, cetona, y epoxi, que se consideran los precursores biogénéticos de las acetogeninas. Esta hipótesis es favorecida por la presencia en la misma planta de acetogeninas con diferentes niveles estructurales incluyendo las lineales (Cavé *et al.*, 1997; Gleye *et al.*, 1998).

El descubrimiento de las muridieninas (consideradas como precursoras de las mono-THF) y de las chatenaitrieninas (propuestas como precursoras de las bis-THF), ha hecho que algunos autores sugieran que las ACG derivan de ácidos grasos como el laceroico (C-32) y el geodoico (C-34), que se unen con una unidad de tres carbonos. Sin embargo, los ácidos grasos mencionados aún no han sido encontrados en los extractos vegetales (Alali *et al.*, 1999).

Compuestos semejantes a los precursores biogénéticos se han aislado de esponjas (Guerrero *et al.*, 1998) y hepáticas (briofitas) (Asakawa, 20001) (Figura 1.7) y aunque son de gran importancia filogenética su biosíntesis tampoco ha sido dilucidada.

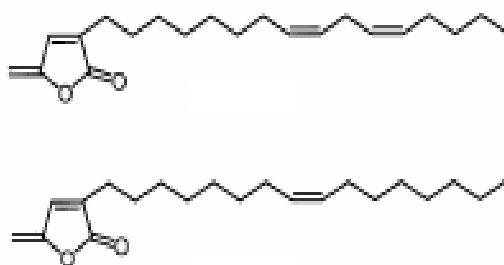


Figura 1.7 Acetogeninas de Briofitas.

1.1.6.4 Actividad biológica

Las acetogeninas de las anonáceas presentan actividades insecticidas y repelentes a dosis muy bajas, lo que pudiera explicar su permanencia durante la evolución de las plantas como parte de su mecanismo de defensa (Cavé *et al.*, 1997; Dharmasena *et al.*, 2001). Más aún, el efecto inhibitorio de las acetogeninas sobre el complejo I mitocondrial, con reducción en la respiración celular fue descrito inicialmente sobre las células del intestino de larvas de 5º instar de *O. nubilalis* utilizando la annonacina (Lewis *et al.*, 1993) y de *Manduca sexta* con la bullatacina (Ahammadsahib *et al.*, 1993).

La asimicina es tóxica al pulgón del melón (*Aphis gossypii*) y al gorgojo del frijol (*Epilachna varvestis*) en tanto que la esquamocina y la neoannonina exhiben una fuerte actividad larvicida sobre *Drosophyla* spp. (Cavé *et al.*, 1997); la actividad de las acetogeninas puede ser más potente que la de algunos insecticidas convencionales, como la cipermetrina (de origen piretroidico), el clorpirifos (de origen fosforado), la hidrametilnona (con base en la amidinohidrazona), el propoxur y el bendiocarb (con estructuras químicas basadas en el carbamato) (Alali *et al.*, 1999). Además pueden tener efectos diferentes en una misma especie de insecto como es el caso del escarabajo de la papa (*Leptinotarsa decemlineata* Say) en donde la esquamocina tuvo una actividad insecticida en tanto que la annonacina fue antialimentaria (Guadaño *et al.*, 2000).

Las acetogeninas también presentan actividad contra bacterias gram (+) (*Staphylococcus* y *Bacillus*) y gram (-) (*Escherichia* y *Proteus*), algunos hongos (*Candida* y *Trichophyton*) (Hasan *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 2006), leishmania (Raynaud-Le Grandic *et al.*, 2004), plasmodio (Rakotomanga *et al.*, 2004) o moluscos (Singh *et al.*, 2005).

1.1.6.5 Mecanismo de acción

Se han propuesto algunos mecanismos para explicar la actividad biológica de las acetogeninas, describiéndose que actúan como potentes inhibidores de la NADH ubiquinona oxidoreductasa (complejo I) en la mitocondria y de la NADH oxidasa

de la membrana plasmática (Morré *et al.*, 1995; Estornell *et al.*, 1997; Tormo *et al.*, 1999b).

Las consecuencias de la inhibición del complejo I son evidentes si se considera que una molécula de glucosa que ingresa a la glucólisis acoplada al ciclo de Krebs produce 10 NADH+H, 2 FADH₂, 2 GTP y 2 ATP; cada NADH+H que entra a la cadena respiratoria por el complejo I produce aproximadamente 2.5 moléculas de ATP (25 totales) en contraste con el FADH₂ que entra por el complejo II y que genera 1.5 moléculas de ATP (3 totales) (Lodish *et al.*, 2003).

Así, la amplia actividad biológica de las acetogeninas se fundamenta en la reducción de los niveles de ATP y como consecuencia sobreviene la muerte celular. Se postula que las células cancerosas requieren de altos niveles energéticos al estar en continuo crecimiento y reproducción, por lo que son más sensibles a estos inhibidores que las células normales, siendo lo anterior, una de las razones de la actividad antitumoral selectiva observada en ellas (Zafra-Polo *et al.*, 1996; Tormo *et al.*, 2003a)

1.1.7 Líneas de investigación asociadas a la actividad antineoplásica de las acetogeninas

Desde el primer reporte en 1982 de la actividad citotóxica de la uvaricina sobre la línea tumoral de leucemia murina P388, los estudios sobre las acetogeninas se han incrementado de manera sostenida, debido a varias razones como:

1. El amplio y potente rango de actividad exhibida por estos compuestos como la antiparasitaria, insecticida, antimicrobiana, antifúngica, citotóxica y antitumoral.
2. Su mecanismo de acción que los sitúa como uno de los grupos inhibitorios del complejo I mitocondrial más eficaces que se conoce.
3. La variación estructural de las moléculas al existir cerca de 420 compuestos naturales que permiten estudios de estructura-actividad, y este número continúa incrementándose.
4. El perfeccionamiento de los procedimientos de semi-síntesis que permiten aumentar la variación natural de estos compuestos

El potente efecto citotóxico de las acetogeninas sobre las células neoplásicas fue señalada desde los primeros trabajos y el descubrimiento de que esta actividad no es afectada por los mecanismos de resistencia a los fármacos (MDR) desarrollados por algunas líneas cancerosas, ha favorecido que se les considere como compuestos atractivos para el desarrollo de nuevos quimioterapéuticos (Oberlies *et al.*, 1997). Bajo estos criterios, las principales líneas de investigación asociadas a su actividad sobre las células cancerígenas son:

1. Estudios sobre su actividad citotóxica y mecanismos de acción sobre las células neoplásicas y normales. Estudios *in vitro* e *in vivo*.
2. Estudios para establecer la estructura óptima de la molécula que permita su mayor actividad biológica (estructura-actividad).
3. Determinación de la estereoquímica absoluta y síntesis de las acetogeninas.

1.1.8 Actividad citotóxica y mecanismos de acción sobre las células neoplásicas y normales.

La mayoría de los estudios se han realizado en cultivos de líneas celulares neoplásicas expuestas a las acetogeninas en diferentes concentraciones o tiempos de exposición y comparando su efecto con el producido por algunos fármacos utilizados en la terapia anti-cáncer. Los estudios se han dirigido a establecer:

1. Cual(es) de estos compuestos, presentan la mayor actividad inhibitoria sobre el crecimiento de las líneas celulares cancerígenas.
2. La concentración que permita el mayor efecto en las líneas celulares cancerosas.
3. La selectividad sobre las líneas tumorales humanas sin afectar a las normales
4. Su efectividad contra las células tumorales resistentes a los fármacos utilizados en la quimioterapia actual y
5. La inducción de la muerte celular programada o apoptosis.

1.1.8.1. Estudios *in vitro*

Los estudios de actividad en líneas celulares en cultivo (*in vitro*) muestran que aunque la mayoría de las acetogeninas son citotóxicas, algunas presentan una inusual potencia. Por ejemplo, en las vesículas de membranas plasmáticas de células cervicouterinas cancerosas humanas (HeLa) y de leucemia promielocítica (HL-60), la NADH oxidasa fue inhibida por la bullatacina de manera concentración-dependiente (1nM-1µM) y con una dosis eficaz media (DE₅₀) entre 5 a 10 nM; por el contrario, las derivadas de las células normales de hígado de rata, no fueron afectadas a esas concentraciones, mostrando así una selectividad en su actividad (Morré, *et al.* 1995).

Debido a que los estudios han sido realizados con diversas líneas celulares o que las condiciones en ellos han sido diferentes, es difícil establecer comparaciones con todas las moléculas, sin embargo, el cotejo de la actividad de 53/433 de ellas (3/41 lineales, 0/16 epoxi, 26/215 mono-THF, 20/133 bis-adyacentes, 7/19 bis-THF no adyacentes, 0/1 Tri-THF y 3/8 THP) analizadas en las líneas celulares de tumores sólidos humanos de pulmón (A-549), mama (MCF-7), colon (HT-29), riñón (A-498), próstata (PC-3) y páncreas (PaCa-2) y como control el fármaco antineoplásico adriamicina (Cuadro 1.3), permite corroborar algunas observaciones hechas por otros autores, entre ellas, que la mayoría de las ACG son citotóxicas y algunas presentan una actividad inusual, aunque también existen diferencias notables de susceptibilidad a ellas (Bermejo *et al.*, 2005; Alali *et al.*, 1999; Tormo *et al.*, 1999b). Así, en el cuadro 1.3 se observa que la mono-THF, longifolicina tuvo una dosis efectiva media (DE₅₀) de 4.22×10^{-13} µg/mL en las células de páncreas, en tanto que en las de colon aumentó a 1.23 µg/mL (Ye *et al.*, 1996a) y la bis-THF parviflorina mostró una DE₅₀ de 2.83×10^{-11} y $< 1 \times 10^{-12}$ µg/mL en las células de pulmón y mama respectivamente, en tanto que en las de colon fue de 2.5 µg/mL (Ratnayake *et al.*, 1994).

Algunas acetogeninas superan la actividad del fármaco control como las mono-THP piranicina y piragonicina que tuvieron una actividad 10 veces mayor que la adriamicina sobre las células de carcinoma pancreático (DE₅₀ 1.3×10^{-3} µg/mL), en tanto que la mono-THF goniotrionina (DE₅₀ 5.3×10^{-6}) fue 1×10^5 más potente en las de mama (Alali *et al.*, 1998); las bis-THF trilobacina y la

trilobacinona fueron 1×10^6 más activas en las células de carcinoma de pulmón y de mama respectivamente (DE_{50} de 10^{-8} $\mu\text{g/mL}$), (He *et al.*, 1997); y la asimirina (DE_{50} 1.72×10^{-6}) y la 4-hidroxitribolina (DE_{50} 1.54×10^{-6}) entre 1×10^5 - 1×10^4 más potentes que la droga antineoplásica mencionada (Kim *et al.*, 2005).

Las ACG pueden inhibir la proliferación de las células con mecanismos de resistencia a los fármacos (MDR) y esta inhibición puede ser incluso mayor a la exhibida por las líneas originales. En particular las líneas P-gp+ se caracterizan por tener proteínas que atraviesan la membrana celular y cuya función es actuar como bombas que expulsan los fármacos al exterior, evitando su concentración intracelular. Este mecanismo es dependiente de ATP por lo que a las glicoproteínas involucradas también se les denomina por sus siglas en Inglés transportadores ABC (ATP binding cassettes) (Lage, 2003).

Cuadro 1.3. Dosis efectivas medias ($\mu\text{g/mL}$) de las acetogeninas de anonáceas sobre líneas celulares de tumores sólidos humanos.

Dosis efectivas medias (DE_{50})*							
Acetogenina	A-549 ^a	MCF-7 ^b	HT-29 ^c	A 498 ^d	PC-3 ^e	PaCa-2 ^f	Referencia
Acetogeninas lineares							
Annojahnina	1.5	2.8	0.06	4.9	0.016	1.123	Colman-Saizarbitoria <i>et al.</i> , 1998
Venezinona	1.04×10^{-1}	1.24	1.55	3.48	2.50×10^{-1}	2.22	Colman-Saizarbitoria <i>et al.</i> , 1996
Longanina	4.9×10^{-2}	3.4	6.0×10^{-1}	3.9×10^{-2}	4.0×10^{-1}	1.1×10^{-2}	Alali <i>et al.</i> , 1999
Acetogeninas Mono-THF							
Goniotrionina	7.7×10^{-3}	5.3×10^{-6}	3.4×10^{-1}	2.0×10^{-3}	3.6×10^{-1}	5.4×10^{-3}	Alali <i>et al.</i> , 1988
Muricoreacina	0.23	1.3	0.57	0.71	0.025	2.3	Kim <i>et al.</i> , 1998
Murihexocina C	1.1	3.8	1.3	2.5	0.86	0.49	Kim <i>et al.</i> , 1998
Muricatetrocina C	5.55×10^{-6}	3.19	1.98	3.9×10^{-2}	1.5×10^{-7}	5.7×10^{-7}	Shi <i>et al.</i> , 1996
Annopentocina A	1.7×10^{-1}	17.93	1.63	6.07×10^{-1}	1.14	3×10^{-2}	Zeng <i>et al.</i> , 1996a
Annopentocina B	2.7×10^{-2}	3.56	1.64	3.8×10^{-1}	2.1×10^{-1}	1.6×10^{-1}	Zeng <i>et al.</i> , 1996a
Annopentocina C	2.6×10^{-2}	2.97	1.24	2.7×10^{-1}	2.28×10^{-1}	4.28×10^{-1}	Zeng <i>et al.</i> , 1996a
Longifolicina	1.13×10^{-6}	1.23×10^{-5}	1.23	4.55×10^{-1}	$< 1 \times 10^{-7}$	4.2×10^{-13}	Ye <i>et al.</i> , 1996a
Goniotalamicina	8.0×10^{-3}	5.7×10^{-2}	1.1×10^{-3}				Ratnayake <i>et al.</i> , 1994

Longicina	1.77x10 ⁻⁶	> 1	2.4x10 ⁻⁵	1.99x10 ⁻⁴	4.26x10 ⁻³	1.25x10 ⁻⁹	Ye <i>et al.</i> , 1995
Gigantransenina-A	0.16	1x10 ⁻²	1.5	1.5	0.18	0.17	Zeng <i>et al.</i> , 1996b
Gigantransenina-B	0.21	2.1x10 ⁻²	1.4	1.6	0.71	1.5	Zeng <i>et al.</i> , 1996b
Gigantransenina-C	0.18	2.2x10 ⁻²	1.3	1.5	1.5	1.1	Zeng <i>et al.</i> , 1996b
Murisolina	5.9x10 ⁻⁸	3.15	6.16x10 ⁻⁸	1.09x10 ⁻⁹	2.36	1.5x10 ⁻³	Zeng <i>et al.</i> , 1995
Longicoricina	1.04	2.31	1.36x10 ⁻³	1.71	3.04x10 ⁻⁶	1.26	Ye <i>et al.</i> , 1996a
Asitrilobina B	1.65x10 ⁻³	1.69x10 ⁻³	4.4x10 ⁻¹	2.19x10 ⁻³	1.06	2.9x10 ⁻⁴	Woo <i>et al.</i> , 1999
Annonacina	<1x10 ⁻³	1x10 ⁻²	<1x10 ⁻³				Ratnayake <i>et al.</i> , 1994
4-acetil annonacina	3.38x10 ⁻⁵	2.65x10 ⁻¹	1.85x10 ⁻⁵	3.59x10 ⁻⁴	3.56x10 ⁻¹	1.4x10 ⁻³	Ye <i>et al.</i> , 1996c
4-Acetyl Xilomaticina	1.25x10 ⁻⁶	3.04x10 ⁻¹	1.12x10 ⁻⁶	2.6x10 ⁻⁴	3.51x10 ⁻¹	6.22x10 ⁻⁴	Ye <i>et al.</i> , 1996c
Annomolona A	1.29	3.03x10 ⁻¹	1.93x10 ⁻¹	9.3x10 ⁻¹	1.98x10 ⁻¹	3.12x10 ⁻³	Son <i>et al.</i> , 2003
Annomolona B	1.37	4.7x10 ⁻²	7.19x10 ⁻²	3.77x10 ⁻¹	5.53x10 ⁻²	7.48x10 ⁻³	Son <i>et al.</i> , 2003
4-desoxi annomontacina	6.45x10 ⁻⁷	5.8x10 ⁻⁷	1.41x10 ⁻¹	1.50x10 ⁻¹	1.73x10 ⁻¹	1.0x10 ⁻⁵	Alali <i>et al.</i> , 1999
Asitrilobina A	4.39x10 ⁻³	2.11x10 ⁻³	2.09	2.78	2.28	3.99x10 ⁻⁵	Woo <i>et al.</i> , 1999
Annomontacina	0.13	> 1.0	> 1.0	0.11	1.11	0.21x10 ⁻²	Colman-Saizarbitoria <i>et al.</i> , 1998
Asitrilobina C	1.12x10 ⁻¹	1.85	3.77x10 ⁻¹	2.24	1.77	1.29x10 ⁻¹	Woo <i>et al.</i> , 2000
Asitrilobina D	1.76x10 ⁻¹	1.10	2.18x10 ⁻¹	1.00	3.94	1.02x10 ⁻¹	Woo <i>et al.</i> , 2000

Bis THF-adyacentes

Mucosina	3.6x10 ⁻²	3.7x10 ⁻³	6.1x10 ⁻¹	8.4x10 ⁻¹	3.1x10 ⁻¹	3.3x10 ⁻¹	Alali <i>et al.</i> , 1999
Longimicina C	4.55x10 ⁻¹	8.8x10 ⁻²	1.0	1.27x10 ⁻¹	2.96	1.09	Ye <i>et al.</i> 1996b
Longimicina A	2.59x10 ⁻¹	8.89x10 ⁻¹	5.25x10 ⁻¹	5.44x10 ⁻¹	7.01x10 ⁻²	1.73x10 ⁻²	Ye <i>et al.</i> 1996b
Longimicina B	1.43x10 ⁻¹	154x10 ⁻²	3.32x10 ⁻³	6.4x10 ⁻²	2.2	7.92x10 ⁻²	Ye <i>et al.</i> 1996b

Rollidecina C	1.32	1.07	6.26x10 ⁻²	1.44	2.86x10 ⁻¹	1.08x10 ⁻¹	Gu <i>et al.</i> , 1997
Rollidecina A	1.04x10 ⁻²	1.78	1.42	5.40x10 ⁻¹	1.65x10 ⁻⁴	1.41x10 ⁻⁶	Shi <i>et al.</i> , 1996
Rollidecina B	3.73x10 ⁻⁵	1.32	1.69	2.28x10 ⁻⁵	1.7x10 ⁻⁵	1.41x10 ⁻⁶	Shi <i>et al.</i> , 1996
Parviflorina	<1x10 ⁻¹²	1.72	5.49x10 ⁻¹				Ratnayake <i>et al.</i> , 1994
Molvizarina	<1x10 ⁻¹²	2.77x10 ⁻⁹	1.67x10 ⁻⁶				Ratnayake <i>et al.</i> , 1994
Longimicina D	4.93x10 ⁻⁴	2.15x10 ⁻¹	1.16x10 ⁻²	3.53x10 ⁻²	2.42x10 ⁻⁴	1.69x10 ⁻⁷	Ye <i>et al.</i> , 1996b
Rollidecina D	5.9	5.0	5.4	4.0	1.9	1.0	Gu <i>et al.</i> , 1997
2,4-cis-trilobacinona	4.64x10 ⁻⁶	1.25x10 ⁻⁸	1.57	4.91x10 ⁻¹	2.75	6.86x10 ⁻²	He <i>et al.</i> , 1997
10-OH trilobacina	1.0x10 ⁻⁸	1.9x10 ⁻⁸	1.4	1.0x10 ⁻²	3.8x10 ⁻¹	2.0x10 ⁻¹	Alali <i>et al.</i> , 1999
Trilobacina	5.8x10 ⁻⁸	1.59x10 ⁻⁷	2.28	5.97x10 ⁻²	9.8x10 ⁻¹	2.75x10 ⁻¹	Zhu <i>et al.</i> , 2002
10-OH asimicina	6.73x10 ⁻¹	3.27x10 ⁻¹	7.58x10 ⁻³	> 1	2.6x10 ⁻²	> 1	Alali <i>et al.</i> , 1999
10-OH trilobacina	1.0x10 ⁻⁸	1.88x10 ⁻⁸	1.39	1.0x10 ⁻²	3.78x10 ⁻¹	1.96x10 ⁻¹	Alali <i>et al.</i> , 1999
Bullatacina	<1x10 ⁻¹²	<1x10 ⁻¹²	<1x10 ⁻¹²				Ratnayake <i>et al.</i> , 1994
Asitribina	2.25x10 ⁻¹⁰	1.24x10 ⁻⁴	7.04x10 ⁻⁵	1.69	1.3	1.25x10 ⁻⁴	Woo <i>et al.</i> , 1995
Asimitrin	1.19	2.12	1.19x10 ⁻⁴	7.5x10 ⁻¹	1.7x10 ⁻⁶	2.11x10 ⁻⁴	Kim <i>et al.</i> , 2005
4-OH trilobina	1.54	3.79	1.54x10 ⁻⁶	3.62x10 ⁻²	2.01x10 ⁻⁴	2.01x10 ⁻⁴	Kim <i>et al.</i> , 2005

Bis THF no adyacentes

Gigantecinona	2.1x10 ⁻¹	> 1	2.1x10 ⁻¹	1.1x10 ⁻³	2.6x10 ⁻¹	> 1	Alali <i>et al.</i> , 1999
Goniotriocina	3.3x10 ⁻²	3.3x10 ⁻⁵	1.2x10 ⁻³	1.1	2.6x10 ⁻¹	1.4	Alali <i>et al.</i> , 1999
Parvifloracina	2.8x10 ⁻¹¹	< 10x10 ⁻¹²	2.5				Ratnayake <i>et al.</i> , 1994
Trilobalicina	5.78x10 ⁻⁸	1.59x10 ⁻⁷	2.28	5.97x10 ⁻²	9.8x10 ⁻¹	2.75x10 ⁻¹	He <i>et al.</i> , 1997
Bullatacinona	1.8x10 ⁻³	2.16	1.29x10 ⁻⁶				Tormo <i>et al.</i> , 1999

Cherimolina-2 (bullatanocina)	$< 1.0 \times 10^{-8}$	6.0×10^{-2}	$< 1 \times 10^{-8}$					Tormo <i>et al.</i> , 1999
Cherimolina-1 (bullatalicina)	1.8×10^{-11}	> 1	> 1					Tormo <i>et al.</i> , 1999

Acetogeninas no clásicas

Muconina THF-THP adyacente	5.5×10^{-3}	2.4×10^{-4}	3.9×10^{-1}	1.08×10^{-1}	5.8×10^{-1}	5.4×10^{-4}	Alali <i>et al.</i> , 1999
Piragonicina Mono THP	2.0	1.6	2.8	1.3	1.2	5.8×10^{-2}	Alali <i>et al.</i> , 1988
Jimenezina THF-THP adyacente	1.6×10^{-2}	$> 10 \times 10^{-1}$	4.3×10^{-3}	1.9×10^{-2}	2.8×10^{-4}	1.7×10^{-4}	Alali <i>et al.</i> , 1999

DE50 Dosis efectivas capaces de inhibir el 50% de la proliferación celular; a Carcinoma de pulmón; b carcinoma de mama; c adenocarcinoma de colon; d carcinoma de riñón; e adenocarcinoma de próstata; f Carcinoma pancreático

Debido al mecanismo de acción de las ACG, la expresión de Pgp+ en las células expuestas a estos compuestos, pudiera ser desventajosa o bien volverlas ineficientes lo que fundamentaría su mayor sensibilidad. De esta manera, la proliferación de las líneas cancerosas de mama humanas (MCF-7/Adr) resistentes a la adriamicina, vincristina o vinblastina fue inhibida por la bullatacina de manera dosis- dependiente en el rango de 1.0 a 1×10^{-4} $\mu\text{g/ml}$. (DI_{50} de 1×10^{-2} $\mu\text{g/ml}$). Sorprendentemente las células originales (MCF-7) mostraron una estabilidad en su crecimiento a esas mismas concentraciones. Cuando la bullatacina fue retirada a las 24 h de tratamiento, las células originales recuperaron su actividad proliferativa en contraste con las adriamicina-resistentes que permanecieron inhibidas, indicando que la actividad de esta acetogenina pudiera ser citoestática en las primeras y citotóxica en las segundas, sugiriendo los autores la utilidad de este compuesto como un adyuvante en los pacientes con tratamiento largos de adriamicina o drogas similares (Oberlies *et al*, 1997b).

En estas mismas líneas celulares pero tratadas con esquamocina, los resultados fueron similares, adicionalmente, se encontró el ciclo celular bloqueado en la fase G1, un decremento en la concentración de ATP y por el contrario una elevación de lactato; esto último pudiera reflejar un mecanismo de salvamento temporal de las células, al aumentar la glicólisis en búsqueda de energía (Raynaud *et al.*, 1999). La estabilidad en el crecimiento celular también fue observada en la línea de carcinoma ovárico humano 1A9 expuesta a 28 acetogeninas a pesar de que la concentración de la acetogenina fue elevada hasta 100 000 veces (Nakanishi *et al.*, 2003).

La rotenona, el clásico inhibidor del complejo I mitocondrial, induce en roedores parkinsonismo con degeneración de las células dopaminérgicas, lo que ha llevado a investigar si las acetogeninas como inhibidores de este complejo pudieran tener el mismo efecto. Más aún, en un estudio de casos y controles realizado en la Isla de Guadalupe, se estableció una alta relación entre el porcentaje de enfermos con parkinsonismo resistente a levodopa y el uso y consumo de anonáceas, particularmente de *Annona muricata* que contiene cantidades importantes de

annonacina (Caparros-Lefebvre *et al.*, 1999) (Caparros-Lefebvre *et al.*, 2005; Champy *et al.*, 2004, 2005).

Para encontrar algunas claves de este fenómeno, se expusieron a annonacina células dopaminérgicas derivadas del mesencéfalo de embriones de rata, la cual inhibió su proliferación a las 24 horas de exposición (DI₅₀, 0.18 µM). Buscando proteger a las células del efecto inhibitorio de la acetogeninas mediante la adición de agentes antioxidantes como el NAC (N-acetilcisteína) o el trolox a los cultivos, se encontró que esta acción fue ineficaz, en tanto que el retiro de la acetogenina antes de 6 h de tratamiento o con la adición de 50 mM de glucosa o manosa al medio, fue efectivo. Lo que al parecer indicó que la estimulación de la glicólisis por altas concentraciones de glucosa previene la muerte neuronal inducida por este compuesto (Lannuzel *et al.*, 2003).

El hecho de que inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial como la rotenona, la antimicina A y la oligomicina induzcan la apoptosis (muerte celular programada) y niveles bajos de ATP (Wolvetang *et al.*, 1994); así como que la rotenona incrementa los aniones súper oxido y peroxido de hidrógeno (ROS) que pueden atacar los complejos de la cadena respiratoria, la membrana y el genoma mitocondrial (Sherer *et al.*, 2003) ha abierto la posibilidad de buscar aproximaciones bioquímicas y genéticas para explicar como se manifiesta la citotoxicidad de las acetogeninas que conlleva a la muerte celular, y responder a la pregunta si ésta es una muerte necrótica u apoptótica, debido a las implicaciones inmunológicas que pudieran suscitar su administración en los individuos.

En general, las células que mueren por necrosis presentan aumento en el tamaño celular, ruptura de la membrana plasmática y liberación del contenido celular al exterior, lo que desencadena un proceso inflamatorio que puede dañar a las células vecinas; la cromatina se observa condensada de manera irregular y se degrada en sitios al azar. Por el contrario, la muerte celular programada, es un proceso altamente coordinado que permite la homeostasis eliminando las células redundantes o potencialmente peligrosas, y en donde la célula que ha sido inducida,

pierde la señal de contacto con las células vecinas; la membrana pierde su asimetría exponiendo al exterior fosfolípidos que únicamente se localizan en el lado citoplásmico; en la mitocondria, el transporte de electrones se desacopla con la síntesis de ATP, se libera el citocromo *c* y se activan los factores pro-apoptóticos; en el núcleo, la cromatina se fragmenta en porciones mas o menos constantes y finalmente se realiza la desintegración celular con formación de cuerpos apoptóticos. Estas células son fagocitadas, lo que evita la liberación de desechos al exterior y la respuesta inflamatoria. Estos eventos son generados por una transducción de señales en cascada, en donde la activación de las proteasas de la familia de las caspasas, tienen un papel fundamental (Kaufmann y Earnshaw, 2000).

La muerte por apoptosis fue asociada al tratamiento con bullatacina en células del hepatocarcinoma humano (2.2.15), transfectadas con el virus B de la hepatitis y en donde los cambios de la membrana plasmática aparecieron antes de las 24 h de exposición, con la fosfatidil- serina en su lado externo (normalmente confinado al lado citoplásmico) y la cromatina condensada y marginada. Adicionalmente se manifestó una inhibición de la proliferación con una DI_{50} de 7.8 ng y el decremento de antígenos Hb liberados al medio (Chih *et al.*, 2001). Seis horas antes de la transposición de la fosfatidil- serina, las concentraciones de AMPc y GMPc se encontraron bajas y no fue efectiva la adición al medio de cultivo de foskrolina, (activador de las adelinato ciclasas) o de GSNO, (activador de guanilato ciclasas) para incrementarlas (Chiu *et al.*, 2003).

La activación de proteasas de la familia de las caspasas relacionadas con la apoptosis, se puso de manifiesto en las células de leucemia HL-60 expuestas a 10 μ g de esquamocina por periodos de 2 h a 6 h. En ellas, se observó un incremento de la concentración de la caspasa-3 aunque no se encontró evidencia en la expresión de las proteínas bcl 2 (antiapoptótica) o bax (proapoptótica) y cuyo cociente pudiera explicar la muerte por apoptosis mediante esta ruta. Por el contrario, el incremento en la proteína JNK supone que pudiera darse a través de la activación de otros intermediarios de la misma, posiblemente JNK/SAPK (Zhu *et al.*, 2002).

La expresión de los genes proapoptóticos Bad y Bax fue reportada en las células cancerosas de vejiga T24 tratadas por 4 horas con 10 µg/ml de annonacina. La fase S del ciclo celular fue la más vulnerable a la acción de la acetogenina impidiendo la progresión de la fase G1 a S en las células estudiadas (Yuan *et al.*, 2003). Estos mismos efectos fueron observados cuando las células se trataron con esquamocina. (Yuan *et al.*, 2006). La annonacina también incrementó en las células de leucemia K562, los niveles de las proteínas inhibitoras de la progresión del ciclo celular (CDKIs) p21 y p27 de manera dosis dependiente (Lu *et al.*, 2006).

Los extractos orgánicos y acuosos de *A. squamosa* presentan una actividad selectiva en las líneas tumorales humanas de mama (MCF-7), leucemia eritrocítica (K-562) y de colon (COLO- 2059. En las dos primeras se encontró condensación nuclear, fragmentación del ADN, inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la reducción de los niveles intracelulares de glutatión, signos indicativos de apoptosis. Por el contrario en la línea de COLO- 205 la muerte celular fue semejante a la necrosis. (Pardhasaradh 2005). Sin embargo, hay que considerar que este estudio se realizó con extractos cuya composición implica otras moléculas de diferente naturaleza química a las acetogeninas.

1.1.8.2 Estudios *in vivo*

Si la actividad antitumoral se define como una acción en contra de las células neoplásicas sin que exista toxicidad al hospedero, entonces los resultados publicados con este criterio son escasos.

En ratones atímicos implantados con la línea celular de carcinoma ovárico humano A2780, la bullatacina por vía intraperitoneal a dosis de 0.1 mg/kg/día, logró una inhibición del desarrollo de los tumores del 68 % cuando se comparó con cisplatina a 5 mg/kg por día como fármaco control (Ahammadsahi *et al.*, 1993). La annonacina a 10 mg/kg durante dos semanas en ratones BDF-1 con carcinoma de pulmón (LLC), logró una inhibición del crecimiento de los tumores del 57.9 % (tratados/controles) y comparable a adriamicina a 2 mg/kg (54.6 %). El número de

animales vivos en el grupo tratado con la acetogenina fue mayor (6/6) al de adriamicina (5/6) (Wang *et al.*, 2002).

Los estudios muestran que la actividad de las acetogeninas está limitada por su toxicidad cuando su vía de administración es intraperitoneal, lo que se reduce por el uso de isoacetogeninas (con lactona saturada terminal) o acetogeninas de menor toxicidad. Por ejemplo, en ratones con la línea murina de leucemia L1210, la bis-THF-bullatacina administrada intraperitonealmente a razón de 50 µg/kg por día, posibilitó una sobrevida del 38 %, en tanto que la bullatacinona (isorolliniastatina-2) a 400 µg/kg lo hizo en el 44 %; en ratones atímicos y de acuerdo con los resultados anteriores, la isorolliniastatina-1 presentó una DL₅₀ de 200 mg/kg, considerablemente menos tóxica que la rolliniastatina-1 (DL₅₀ de 5 mg/kg) (Duret *et al.*, 1999).

1.1.9 Estudios para establecer la estructura óptima de la molécula de las acetogeninas que permita la mayor actividad biológica (estructura-actividad)

Uno de los retos en el estudio de cualquier fármaco con fines preventivos o curativos, es establecer la estructura óptima de la molécula que permita ejercer su mayor actividad biológica. Como ya se mencionó, las acetogeninas tienen una estructura molecular relativamente sencilla, aunque presentan diversos centros quirales que determinan su conformación espacial, así como una flexibilidad de la cadena alifática, que pueden influir en su actividad. En este sentido, se han examinando las acetogeninas a fin de evaluar la contribución de los diferentes grupos que conforman su estructura: el sistema THF, la cadena alifática espaciadora que lo une al grupo lactona y el arreglo molecular de este último, buscando los factores esenciales que puedan explicar su acción inhibitoria sobre la NADH-U-oxidoreductasa, la NADH oxidasa y finalmente sobre el crecimiento de células neoplásicas. Los estudios dirigidos a establecer la relación estructura- actividad se han realizado con todas las variaciones estructurales de las acetogeninas y con derivados semisintéticos que pueden desarrollar potencias inhibitorias semejantes a la bullatacina.

Sistema tetrahidrofurano

Los trabajos iniciales pusieron de manifiesto que, aunque las acetogeninas estudiadas son citotóxicas en general, algunos arreglos moleculares dentro de ellas pueden potencializar su acción (Zafra-Polo *et al.*, 1998). En la prueba de difusión en gel con las líneas cancerosas murinas de páncreas (PO3), linfoma de células B (P388) y mamario resistente a la adriamicina (M17/adr); con las líneas humanas de colon (H8) y de pulmón (H125) así como las epiteliales G1 de rata inmortalizadas (no cancerosas) como control, se encontró que todas fueron inhibidas por las 10 AGG representativas de los tres tipos estructurales de anillos tetrafurano (THF) (bis-adyacentes, bis no adyacentes y monotetrafurano). Sin embargo y de manera general, las acetogeninas bis THF mostraron ser más potentes que las bis THF no adyacentes y estas a su vez que las mono THF. En particular la bullatacina (bis-THF) mostró ser 10 veces más potente que el fármaco adriamicina, con selectividad frente a las células normales (Oberlies *et al.*, 1995).

Esta misma tendencia fue reportada en 20 acetogeninas sobre la inhibición del consumo de oxígeno de mitocondrias de hígado de rata. Nuevamente, las acetogeninas bis THF adyacentes o bis THF no adyacentes, presentaron una potencia 10 veces mayor que las mono THF. La asimicina, bullatacinona, bullatacina y trilobacina fueron las más efectivas (DE_{50} 32-76 nM/mg), pero perdieron su potencia 10 veces cuando se deshidroxilaron en el C4, en relación a sus homólogos hidroxilados (Landolt *et al.*, 1995).

La débil actividad inhibitoria de compuestos semisintéticos como las esquamostolidas (4R,15R,16R,21S)- y (4R,15S,16S,21S)-rollicosina (compuestos con dos γ lactonas y sin sistema THF) en comparación con acetogeninas como la bullatacina, refuerza la idea de la necesaria presencia del sistema THF para la potente actividad de las acetogeninas naturales (Makabe *et al.*, 2005).

Los grupos hidroxilo flanqueando el sistema THF.

Los estudios en ensayos de inhibición sobre el complejo I mitocondrial utilizando análogos de la bullatacina con diferente número de grupos OH flanqueando el sistema THF, mostraron que la presencia de cualquiera de ellos (o ambos) es suficiente para mantener su actividad inhibitoria (Abe *et al.*, 2004). Sin embargo, resultados contradictorios se reportan con derivados aminoacil tri- esterres en C15, C24 y C28 de la esquamocina, los cuales redujeron notablemente su actividad inhibitoria sobre el complejo I y la citotoxicidad en el carcinoma humano nasofaríngeo KB-1 en relación con el compuesto original (Duval *et al.*, 2005a).

Los derivados lineares como la dihidroxi-cohibina (derivado de la ACG linear cohibina A, con un grupo tetraol en lugar del sistema THF muestran que los grupos OH si son esenciales, aunque no tan efectivos como si co-existieran con el sistema THF (Konno *et al.*, 2004).

Polaridad de la molécula

La hidrofobicidad de las acetogeninas pudiera ser un factor crucial debido a que el sitio de su interacción en el complejo I parece estar inmerso en la membrana mitocondrial; una excesiva hidrofobicidad (-polaridad) ocasionaría la retención del compuesto por la bicapa lipídica de la membrana, en tanto que una gran hidrofiliidad (+polaridad) implicaría la parcial exclusión de la molécula. Lo anterior se analizó con seis acetogeninas mono-THF con diferentes arreglos oxigenados en la cadena alifática de las moléculas y en donde la annonacina (la menos hidrofóbica; +p) y la solamina (la mas hidrofóbica; -p) presentaron la menor actividad inhibitoria sobre la NADH:U oxidoreductasa y NADH oxidasa. Una hidrofobicidad media incrementó la acción inhibitoria. Sin embargo, algunas acetogeninas tuvieron incrementos (annonacinona vs. annonacina) o decrementos (crossolona vs. crossolina) dramáticos en su acción, y cuya mínima diferencia en polaridad no es factor suficiente para justificarla (Tormo *et al.*, 1999a). Así, además del número de grupos OH, la posición de ellos en la cadena alifática puede ser crucial.

Cadena espaciadora que une el anillo γ -lactona con el sistema THF

Con el fin de encontrar la estructura óptima de estas moléculas sobre las células de adenocarcinoma mamario resistente a adriamicina, vincristina y vinblastina (MCF-7/adr), se analizaron 13 acetogeninas en ensayos de proliferación celular; en este estudio, el mayor efecto se encontró con las ACG de 13 carbonos en la cadena espaciadora (tipo bullatacina) y cuya actividad fue de hasta 250 veces mayor que la adriamicina. Sin embargo, la gigantetrocina A (mono-THF) con solo 7 carbonos fue la más activa, e inclusive dos veces más potente que la bullatacina (Oberlies *et al.*, 1997a)

Utilizando compuestos semisintéticos derivados de la bullatacina y midiendo su actividad inhibitoria sobre la NADH oxidasa (CI), se encontró que ni la estereoquímica del grupo γ lactona o de los anillos THF, ni la presencia (o ausencia) del C4-OH y otros grupos del tallo hidrofóbico fueron factores estructurales esenciales para su actividad. La estructura esencial encontrada fue el largo de la cadena alifática espaciadora con 13 átomos de carbono (CI_{50} 1.2 nM), que permitiría flexibilidad a fin de posicionar correctamente el anillo γ lactónico y el sistema THF, para que actuaran sobre el complejo I mitocondrial. Las cadenas alifáticas del espaciador mayores de 13 átomos de carbono (16 y 19) presentaron decrementos significativos (CI_{50} 15-250 nM), en tanto que menores (11 y 7 átomos de carbonos) los disminuyeron aunque en menor proporción (CI_{50} 1.9-14 nM). La presencia de los grupos OH libres adyacentes a los anillos THF podrían favorecer la actividad inhibitoria (aunque no sean cruciales) proporcionando grupos polares (hidrofílicos) alrededor de los anillos de THF reteniendo al inhibidor (acetogeninas) en el complejo enzimático (Takada *et al.*, 2000; Motoyama *et al.*, 2002; Abe *et al.*, 2004) (cuadro 1.4).

Asimismo, la presencia de dobles enlaces no parece ser crítica en la flexibilidad de la molécula, lo que sugiere que su conformación activa no es en estado extendido (Abe *et al.*, 2005).

Cuadro 1.4 Actividad inhibitoria de algunas acetogeninas sobre la NADH oxidasa.

Acetogenina	Cadena espaciadora (No de carbonos)	Posición de grupos OH en cadena alifática	*Cl ₅₀ (nM)	Referencia
γ metil γ lactona no saturada				
Rolliniastantina-2 (Bullatacina)	13	C4, C15, C24	1.2	Takada <i>et al.</i> , 2000
Rolliniastantina-1		C4, C15, C24	1.2	Tormo <i>et al.</i> , 2001
Esquamocina		C15, C24, C28,	1.6	Miyoshi <i>et al.</i> , 1998
Esquamocina B	11	C13, C26, C26	1.8	Miyoshi <i>et al.</i> , 1998
Parviflorina		C4, C13, C22	1.9	Takada <i>et al.</i> , 2000
Longimicina D		C10, C13, C22	5.5	Miyoshi <i>et al.</i> , 1998
Longimicina C	7	C4, C9, C18	14	Takada <i>et al.</i> , 2000
Semisintético	16	C18, C27	15	Takada <i>et al.</i> , 2000
Semisintético	19	C21, C30	250	Takada <i>et al.</i> , 2000
γ lactona β -hidroxil γ -metil- saturada				
Laherradurina	13	C15, C24	1.6	Tormo <i>et al.</i> , 2001
Itrabina	11	C13, C22	3.4	Tormo <i>et al.</i> , 2001

*Cl₅₀ (nM)= Concentración necesaria para reducir a la mitad la actividad de la NADH oxidasa

El anillo lactona

La mayoría de las acetogeninas naturales comparten una α β insaturada γ metil γ lactona terminal y sólo los grupos 11 y 20 presentan lactonas saturadas (18 compuestos en total) Las isoacetogeninas o cetoacetogeninas (grupos 10 y 19) se consideran artefactos producidos durante los procedimientos de extracción, pero que exhiben una buena actividad inhibitoria que inclusive puede superar a las moléculas originales (Tormo *et al.*, 2003b; Tormo *et al.*, 2005). Pese a lo anterior, se ha encontrado que el anillo γ metil γ lactona de la bullatacina puede ser substituido por

un anillo de ubiquinona reteniendo su actividad y cuestionando su papel como factor esencial para su potencia inhibitoria (Yabunaka *et al.*, 2003). La introducción de un grupo amino terminal en la lactona insaturada de esta acetogenina, la convierte en un inhibidor dual de los complejo I y III (Duval, 2005b).

Los análogos heterocíclicos de la esquamocina como el híbrido esquamocina-benzimidazol ilustran una analogía funcional entre el butenólido terminal de las acetogeninas y las subestructuras heteroaromáticas de los inhibidores clásicos del complejo I (Duval, 2006).

1.1.10. Determinación de la estereoquímica absoluta y síntesis de acetogeninas

Una de las líneas de investigación más fructíferas en el estudio de estos compuestos naturales, ha sido el establecimiento de métodos que permitan dilucidar la estereoquímica absoluta de las diferentes acetogeninas, su síntesis y la elaboración de nuevos compuestos con propiedades biológicas importantes.

Debido a la naturaleza grasa de estas moléculas, no es fácil la obtención de cristales para su análisis por cristalografía de rayos X, lo que ayudaría a determinar su configuración absoluta. La estereoquímica de los centros estereogénicos, puede influenciar la potencia relativa y la especificidad biológica de las moléculas, determinando su actividad. Más aún, algunas acetogeninas pueden diferenciarse una de otra, solo por su configuración.

Los métodos para elucidar su estructura generalmente se basan en la preparación de esteres de Mosher (R y S) aunado a la ^1H -NMR y ^{13}C -NMR y otro tipo de determinaciones espectrométricas. De esta manera, la estereoquímica relativa de estos compuestos, ha sido ratificada en algunos casos o revisada en otros. (Warmerdam, *et al.*, 1998., Bermejo *et al.*, 2005). La síntesis total, la semi-síntesis de sus derivados (aminos, esteres, o unidas a azúcares) así como los análogos estructurales (quimeras o compuestos miméticos) han posibilitado muchos de los estudios de estructura-actividad sobre el complejo I mitocondrial.

Por ejemplo, se ha reportado la síntesis del fragmento hidroxibutenólido de la murisolina (Gudipati, *et al.*, 2006), unidades *trans*- mono- tetrafurano, *trans*-bis-tetrafurano y *trans*- tri- tetrafurano, relativas a la estructura de los anillos THF de la gigantetrocina A, asimilobina y goniocina respectivamente, lo que representa un papel central para la síntesis total de estas moléculas (Tian *et al.*, 1999); la construcción de unidades bis-hidroxil-THF (Ramu *et al.*, 2006; Mertz *et al.*, 2005; Kojima *et al.*, 2004) incluyendo 36 diferentes estereoisómeros (Das *et al.*, 2005) y la construcción de unidades mono-THF (Prestat *et al.*, 2004),

Más de 70 acetogeninas pueden ser sintetizadas totalmente (Bermejo *et al.*, 2005), entre las que se encuentra la (-)muracatacina (Baylon *et al.*, 2000), la +longicina (Hanessian *et al.*, 2006; He *et al.*, 2005), solamina (Wang *et al.*, 2005), cis solamina (Hu *et al.*, 2006; Makabe *et al.*, 2004a) y reticulataina (Makabe *et al.*, 2004b), así como varios estereoisómeros de rollicosina, (Makabe *et al.*, 2005; Quinn *et al.*, 2005) entre otras. También se reporta la síntesis de moléculas lineales (Fujita *et al.*, 2005) y acetogeninas no clásicas con anillos THP como la piranicina y piragonicina (Strand *et al.*, 2006).

Los derivados lineales de la bullatacina (sin sistema THF) designados AA005 presentan una alta citotoxicidad en líneas cancerosas sin afectar a las normales, sugiriéndose que la posible incorporación de deuterio en su molécula, las podría convertir en potentes drogas antitumorales (Liu *et al.*, 2005).

Otros derivados importantes de la bullatacina son las denominadas deltalac-acetogeninas que poseen dos tallos alifáticos sin anillo lactónico terminal y que mantienen una alta actividad inhibitoria sobre el complejo I. En ellos, la longitud de 11 carbonos en ambos tallos es esencial para su actividad que es comparable a la bullatacina. En contraste con las acetogeninas naturales, es necesaria la presencia de los anillos $\alpha\alpha$ dihidroxilados bis THF adyacentes, la estereoquímica semejante a la bullatacina (Hamada *et al.*, 2004; Ichimaru *et al.*, 2005), el balance en la hidrofobicidad, y la simetría de las cadenas laterales (Ichimaru *et al.*, 2006).

1.2 La cadena respiratoria mitocondrial

La fosforilación oxidativa (síntesis de ATP impulsada por la transferencia de electrones al oxígeno) y la etapa fotoquímica de la fotosíntesis (síntesis de ATP impulsada por fotones) son las dos transducciones de energía más importantes en la biosfera y significan la mayor parte del ATP sintetizado por los organismos aeróbicos. Todos los pasos enzimáticos de la degradación oxidativa de glúcidos, grasas y aminoácidos en las células aeróbicas convergen en una etapa final, en donde los electrones fluyen desde los intermediarios catabólicos al O₂, produciendo ATP a partir del ADP y Pi (Lehninger, 2005)

1.2.1. La mitocondria

La mitocondria es el organelo productor de energía y el lugar en donde se realiza la fosforilación oxidativa. Estructuralmente presenta dos membranas: la membrana externa permeable a moléculas pequeñas y a iones, con canales transmembrana que permiten el paso de moléculas de hasta 5,000 Da y la membrana interna con pliegues o crestas que se proyectan hacia la matriz, es permeable sólo a pocos compuestos como el agua, O₂, CO₂ y NH₃. Otros metabolitos hidrofílicos así como iones de importancia biológica, pueden cruzar la membrana por medio de canales específicos y de proteínas transportadoras; entre las últimas y de especial importancia se encuentran las transportadoras de fosfato (Pi), de los nucleótidos de adenina ADP y ATP y de los substratos mono-, di- y tricarboxílicos de la respiración. Debido a su permeabilidad selectiva, separa a los intermediarios y enzimas de las rutas citosólicas de los procesos metabólicos que se producen en la matriz mitocondrial y aloja a los componentes de la cadena respiratoria y al complejo enzimático responsable de la síntesis de ATP (ATP sintetasa) (Lodish *et al.*, 2003).

Muchos compuestos lipofílicos se introducen libremente en la membrana interna, entre ellos se encuentran los ácidos grasos. Las moléculas de cadena larga pueden llegar fácilmente mediante mecanismos de “flip-flop”; en contraste, el cruzamiento de la bicapa lipídica por los ácidos grasos aniónicos es extremadamente lento debido a la carga negativa de su grupo polar carboxílico; su paso es

probablemente facilitado de manera inespecífica por proteínas transportadoras de aniones. De esta manera muchos fármacos lipofílicos y anfifílicos son buenos penetrantes de la mitocondria (Szewczyk y Wojtczak, 2002).

La matriz, -el espacio acotado por la membrana interna- contiene el ADN mitocondrial que es una doble cadena circular con 37 genes, incluidos 13 que codifican para proteínas de la cadena respiratoria, al complejo de la piruvato deshidrogenasa, las enzimas del ciclo de Krebs, la ruta de la β -oxidación de los ácidos grasos y de oxidación de los aminoácidos (Lodish *et al.*, 2003).

La mayor parte de los electrones que entran a la cadena respiratoria provienen de la acción de las deshidrogenasas que captan electrones de las reacciones oxidativas de las ruta metabólicas de la matriz. Estas deshidrogenasas utilizan nucleótidos de piridina (NAD o NADP) o nucleótidos de flavina (FMN o FAD) como aceptores electrónicos.

La cadena respiratoria mitocondrial está constituida por el complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa), el complejo II (succinato-ubiquinona reductasa), el complejo III (ubiquinol-citocromo c reductasa), y el complejo IV (citocromo oxidasa) que son en su mayoría, proteínas integrales de membrana con grupos prostéticos capaces de aceptar y donar uno o dos electrones. Los tipos de transferencia electrónicas que se presentan son: 1) transferencia directa de electrones (reducción Fe^{3+} a Fe^{2+}), 2) transferencia de un átomo de hidrógeno ($\text{H}^+ + \text{e}^-$) y 3) transferencia de un ion hidruro ($:\text{H}^-$) portador de dos electrones) (Lehninger, 2005).

La denominación de cadena respiratoria es descriptiva, ya que el proceso está constituido por una secuencia acoplada de reacciones que dan como resultado la respiración o consumo de oxígeno. Este sistema multienzimático es conocido también como cadena de transporte de electrones, lo que pone énfasis en que las reducciones y oxidaciones son fenómenos caracterizados por la ganancia o pérdida de electrones (Figura 1.8).

El producto final de la cadena respiratoria es la generación de agua por parte del complejo IV mitocondrial (citocromo oxidasa) al ceder cuatro electrones provenientes de la cadena transportadora de electrones al oxígeno molecular.

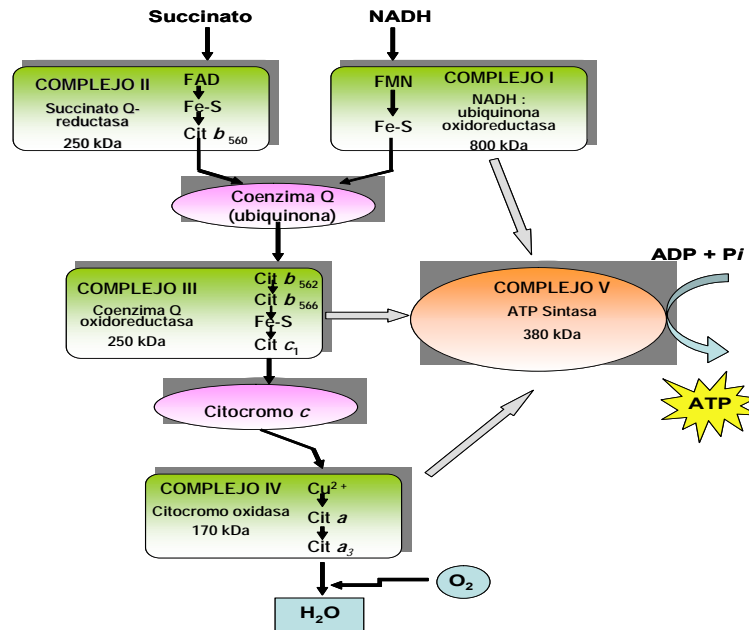


Figura 1.8 Esquema de la cadena respiratoria acoplada a la síntesis de ATP.

Una proporción menor de O₂ puede estar involucrada en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el anión superóxido O₂⁻, el peróxido de hidrógeno H₂O₂ y el extremadamente reactivo radical HO[·]. Si bien la generación de ROS ocurre en su mayoría en el complejo III debido al ciclo de protones entre la ubiquinona, los citocromos *b* y *c*₁ y las proteínas con centros de hierro-sulfuro, el complejo I también puede ser un importante generador de ROS. Estas especies de oxígeno reactivas son tóxicas y como tales deben de ser descompuestas por enzimas especializadas como las catalasas, peroxidasas y las superóxido dismutasas. Sin embargo, algunas de ellas pueden escapar de su remoción y tener efectos dramáticos sobre la mitocondria así como activar la cascada de eventos que induce la muerte celular programada o apoptosis (Szewczyk y Wojtczak, 2002).

1.2.1.1 Los estados respiratorios de la mitocondria

Las reacciones de oxidación de los sustratos en las mitocondrias dependen de la presencia de ADP y fosfato inorgánico. En condiciones fisiológicas normales la membrana mitocondrial tiene una alta concentración de P_i , de manera que la concentración de ADP es la reguladora de la velocidad de los procesos. La respiración mitocondrial medida con métodos adecuados (por ejemplo, polarografía de oxígeno) permite observar que en ausencia de ADP la actividad es limitada, mientras que después de añadirlo la respiración se activa a velocidades que pueden llegar a ser cinco o diez veces mayores que en su ausencia. Cuando todo el ADP añadido es convertido en ATP, la actividad respiratoria retorna a una velocidad similar a la inicial (Figura 1.9) (Álvarez *et al.*, 1994).

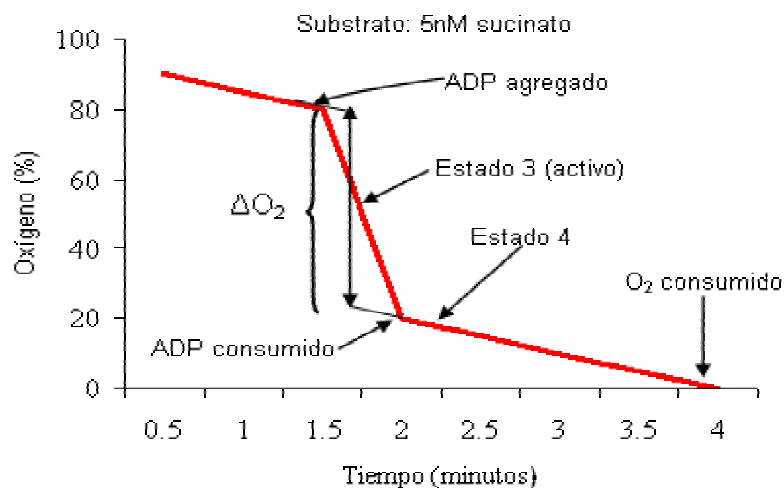


Figura 1.9 Estados respiratorios en la mitocondria.

Al estado metabólico caracterizado por la presencia de sustrato oxidable, ausencia de ADP y consumo lento de oxígeno se le denomina estado controlado o estado 4. La adición de ADP establece un consumo rápido de oxígeno y por ello este estado se designa estado activo o estado 3, que se mantiene hasta que todo el ADP es transformado a ATP, retornando entonces al estado 4. La relación entre la respiración en estado 3 y la correspondiente al estado 4 se denomina control respiratorio (*ibidem.*).

El control respiratorio y el índice P:O (relación entre el fosfato incorporado al ATP y el oxígeno utilizado) se usan para expresar el grado de acoplamiento entre los procesos de oxidación y de fosforilación. Valores bajos o extremadamente altos de control respiratorio o de índice P:O indican mitocondrias dañadas o desacopladas (Cuadro 1.5) (Álvarez *et al.*, 1994; Boveris, 1998).

Cuadro 1.5 Características de los estados respiratorios 3 y 4 mitocondriales.

Estado metabólico	Disponibilidad de O ₂	Nivel de ADP	Nivel de sustrato	Velocidad de respiración	Factor determinante de la actividad respiratoria
3	si	alto	alto	rápida	cadena respiratoria
4	si	bajo	alto	lenta	ADP

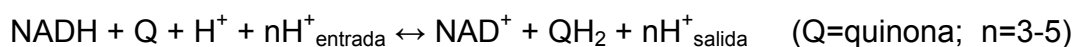
1.2.2. La NADH ubiquinona oxidoreductasa o complejo I mitocondrial

La NADH-ubiquinona oxidoreductasa (Complejo I mitocondrial) (EC 1.5.6.3) es la primera de los tres complejos enzimáticos que forma parte de la cadena transportadora de electrones del NADH al oxígeno. Este complejo acopla la oxidación del NADH y la reducción de la ubiquinona para la generación de un gradiente de protones que es utilizado posteriormente en la síntesis de ATP. El complejo es muy semejante en las mitocondrias de los organismos eucariontes, en tanto que los procariotes poseen una contraparte estructuralmente simple pero altamente homóloga en secuencia, función y grupos prostéticos, denominada NDH-1 (Kao *et al.*, 2004)

El complejo I de los mamíferos esta formado por cuando menos 46 subunidades, 7 de las cuales (N1 a N6 mas ND4L) son codificadas en el genoma mitocondrial y las otras son de origen nuclear. Contiene una molécula FMN y centros Fe-S binucleares (2) y tetranucleares (6) como grupos prostéticos. (Bai *et al.*, 2004). Los estudios bioquímicos y de microscopia electrónica, revelan un complejo enzimático en forma de "L inversa" que puede ser dissociado en dos regiones

principales. Una región vertical orientada hacia la matriz mitocondrial que contiene los sitios de acoplamiento para el NADH y una región horizontal embebida en la membrana, formada por proteínas hidrofóbicas codificadas por el genoma mitocondrial. En la última región es posible que se encuentre el sitio catalítico donde la ubiquinona se reduce así como el sitio de unión de los diversos inhibidores (Matsuno-Yagi and Yagi, 2001)

El complejo I cataliza la reacción global:



en la que la ubiquinona oxidada (Q) acepta un ion hidruro (dos electrones y un protón) desde el NADH y un protón desde el agua disolvente de la matriz. El complejo enzimático transfiere un par de equivalentes de reducción del NADH a su grupo prostético FMN, los cuales posteriormente viajan por los centros Fe-S en su camino hacia la ubiquinona. El amital, la rotenona y la piericidina A inhiben el flujo de electrones desde estos centros Fe-S a la ubiquinona.

El ubiquinol (QH₂) que es la forma totalmente reducida, difunde en la membrana desde el complejo I al complejo III en donde nuevamente se oxida a Q. Lo anterior va acompañado del movimiento de protones desde la matriz mitocondrial al lado exterior (citósico) de la membrana interna (espacio intermembrana) (Miyoshi, 2001)

Algunos de los defectos estructurales y funcionales del complejo I, han sido involucrados en diversas enfermedades como la neuropatía óptica hereditaria de Lebers, relacionada con mutaciones en las subunidades mitocondriales ND1, ND4 y ND6 y la enfermedad de Parkinson inducida por rotenona y por 1- metil-4- fenilpiridinium (MPP⁺), entre otras (Orth y Schapira, 2002; Procaccio *et al.*, 1999).

Si bien se ha avanzado sobre el conocimiento de la estructura del complejo I, todavía existen aspectos poco claros en los caminos internos de transferencia de los electrones y en el acoplamiento energético que involucra al grupo N2-Fe-S y una o

más subunidades a la quinona. Se ha postulado que la subunidad PSST y su homólogo bacteriano NQO6 pudieran ser los componentes proteicos involucrados en la transferencia de electrones desde el grupo N2 a la quinona y posiblemente los sitios de unión de los inhibidores como la rotenona, piericidina A, bullatacina y rolliniastantina-1, piridaben, etc. (Schuler *et al.*, 1999).

1.2.3. Lanzadera para la oxidación mitocondrial del NADH citosólico.

La membrana interna mitocondrial no es permeable al NADH citosólico y el complejo I mitocondrial sólo puede aceptar electrones del NADH de la matriz, por lo que existen sistemas especiales de lanzadera que transportan equivalentes de reducción desde el NADH citosólico a la matriz mitocondrial mediante una ruta indirecta. En las células del hígado y corazón, la lanzadera más activa es la malato-aspartato. En ella, los equivalentes de reducción del NADH citosólico se transfieren primero al oxalato citosólico, obteniéndose malato por la acción de la deshidrogenasa citosólica. El malato pasa a través de la membrana interna a la matriz, vía el sistema de transporte malato- α cetoglutarato. Dentro de la matriz, los equivalentes de reducción pasan por acción del malato deshidrogenasa al NAD de la matriz formando NADH, el cual puede pasar los electrones al complejo I. El oxaloacetato citosólico se regenera vía reacciones de transaminación, así como la actividad de los transportadores de membrana para iniciar un nuevo ciclo (Lehninger, 2005).

1.2.4. Inhibidores de la NADH- ubiquinona oxidoreductasa.

Alrededor de 60 familias de compuestos sintéticos o naturales son conocidos como inhibidores del complejo I mitocondrial e incluyen a diversos tipos de antibióticos, insecticidas, agroquímicos y neurotoxinas y cuya potencia se expresa generalmente con relación a la rotenona, que es clásico inhibidor del complejo I. Las mitocondrias de los insectos y peces parecen ser particularmente sensibles a la inhibición del complejo I, en contraste, las mitocondrias de los hongos y plantas son naturalmente resistentes. Entre las bacterias, *Rhodobacter capsulatum* y *Paracoccus denitrificans* presentan sensibilidades semejantes a las de los mamíferos, pero *Escherichia coli* es

extremadamente insensible a la rotenona y otros inhibidores (Yagi *et al.*, 1998; Dupuis *et al.*, 1998).

En esencia, la estructura de los inhibidores del complejo I es similar a la ubiquinona, con una “cabeza” cíclica que corresponde al anillo de la ubiquinona y un “tallo” hidrofóbico. Las variaciones naturales dentro de cada familia de inhibidores están normalmente restringidas a sustituciones y al grado de oxigenación sobre el tallo (Degli Esposti, 1998).

Tomando en consideración las características estructurales y funcionales del complejo I no es sorprendente que la estructura-actividad de los inhibidores también presente dificultades. La característica común de ellos, es que son moléculas lipofílicas debido a que parte del complejo I -donde la ubiquinona reacciona- parece estar inmerso en la membrana mitocondrial interna o al menos su acceso. Por lo tanto la potencia inhibidora de cada compuesto esta determinada por las interacciones específicas con la enzima, y por factores no específicos que afectan su acceso al sitio de unión (Miyoshi, 2001).

Muchos de los inhibidores del complejo I han sido empleados para tratar de identificar los sitios de transferencia energética en este complejo multienzimático. A pesar del gran número de reportes, aún no está claro si la unión de estas moléculas se realiza en un sitio activo amplio, donde las zonas de reacción pueden sobreponerse, o bien en diferentes dominios cercanos, en los que la ocupación de uno de ellos, pueda causar cambios conformacionales en otros.

Se postula que dentro del dominio membranoso de la enzima, pudiera existir tres sitios (o zonas) de reacción de la ubiquinona. Dos de ellos (A ó NA y B ó P1 respectivamente) ligados a la transferencia de protones a través del intermediario ubisemiquinona, y el tercero (C ó NB) asociado a la formación del ubiquinol sin desplazamiento de protones (Degli Esposti, 1998).

En paralelo, los inhibidores también pueden ser clasificados en dos o tres tipos funcionales acorde con el modelo anterior. Uno de los dos sitios de acoplamiento

energético es bloqueado por el inhibidor rotenona y otros inhibidores que actúan sobre el sitio B ó P₁. La piericidina A, y la ACG rolliniastatina-1 son capaces de inhibir ambos sitios de acoplamiento energético. En tanto que las ACG rolliniastatina-2 (bullatacina) y cherimolina-1 bloquean el sitio mas interno de traslocación de protones o sitio (A ó N_A) (Tormo *et al.*, 1999c) (Cuadro 1.6 y Figura 1.10).

Cuadro 1.6 Clasificación funcional de los inhibidores del complejo I mitocondrial. Modificado de Degli 1998.

Tipo de inhibidor y acción	Inhibidores representativos	Otros inhibidores
Tipo A— Antagonistas de la quinona	Rolliniastatina-2 Piericidina A (primer sitio) ^a Idebenona	Otras acetogeninas de anonáceas Eritrosina, iodoacetamida Penalamida Ranolazina
Tipo B— Antagonistas de la semiquinona	Rotenona Piericidin A (segundo sitio) ^a Piericidina B Amital Fenoxán	Otros rotenoides Ubicidinas Q-2 reducidas ^b Acaricida pirazole Quinolonas
Tipo C— Antagonistas del quinol	Productos del Quinol Q-2 reducido ^b Mixotiazol Estigmatelina TDS Meperidina Demerol	Análogos de 4'-alquil-MPP ^c 4'-alquil-piridinas Mixalamida Vacor Colorantes de carbocianina DNP y otros desacoplantes
^a Piericidina A presenta dos sitios de unión. ^a Q-2 reducido también actúa en el sitio del quinol. ^c Análogos del 4-alquil del MPP presenta dos sitios de interacción.		

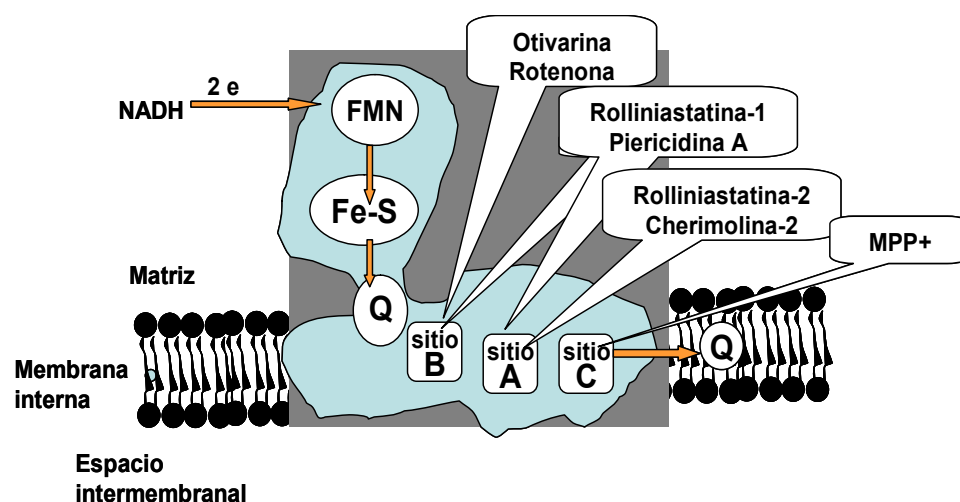


Figura 1.10. Posibles sitios de unión de los inhibidores al complejo I mitocondrial. Modificado de Tormo *et al.*, 1999b.

1.2.5. Efecto de las acetogeninas sobre la respiración celular

A pesar de que la gran mayoría de los estudios de inhibición con las acetogeninas han sido realizados en partículas submitocondriales, su actividad inhibitoria sobre el complejo I fue reportada inicialmente con el uso de polarografía de oxígeno y midiendo la respiración de las mitocondrias expuestas a estas moléculas.

De esta manera, la respiración de las mitocondrias aisladas de hígado de rata y del intestino medio de larvas del 5º instar del gusano del tabaco *Manduca sexta* expuestas a bullatacina, procedió a velocidades normales en presencia del sustrato oxidable del complejo III, el succinato, sin embargo, la respiración fue abatida y completamente inhibida cuando el sustrato se cambió a ácido glutámico que es oxidable por el complejo I. La adición de succinato a las mitocondrias inhibidas, liberó el bloqueo del consumo de oxígeno inducido con ácido glutámico. La bullatacina tuvo una potencia inhibitoria del doble de la rotenona y su CI_{50} fue de 9nM en las células de hígado y de 11 nM en *M. sexta*. (Ahammadsahibb *et al.*, 1993).

Resultados semejantes fueron obtenidos con las células del intestino de larvas del 5º instar de *Ostrinia nubilalis* expuestas a asimicina. Esta acetogenina redujo el estado 3 de la respiración cuando se utilizaron los sustratos oxidables del complejo I, malato o piruvato (CI_{50} de 0.55 nM/mg de proteína mitocondrial) sin modificación en

el cociente ADP:O. En las mitocondrias parcialmente inhibidas el consumo de oxígeno fue restablecido y el estado 3 se normalizó cuando fue añadido succinato (Lewis *et al.*, 1993).

En un estudio de relación entre la estructura y la actividad de 20 acetogeninas naturales y semisintéticas sobre la respiración de mitocondrias aisladas del hígado de rata, los resultados analizados como valores del control respiratorio (CR), indicaron una variación en la CI_{50} de 15 a 800 nM/mg de proteína mitocondrial. La tendencia de acuerdo a la estructura de las acetogeninas señaló que las bis THF adyacentes y no adyacentes poseen una actividad 10 veces mayor que las mono THF. La acetogenina natural más activa fue la bullatacina con una $CI_{50} = 71$ nM/mg de proteína (Landolt *et al.*, 1995).

1.2.6. Las acetogeninas como inhibidores del complejo I mitocondrial

Para medir la potencia de los inhibidores sobre el complejo I, el sistema más empleado es el de las partículas abiertas de mitocondrias (SMP) a las que se les agrega concentraciones crecientes de los inhibidores y se mide espectrométicamente la oxidación de una cantidad constante de NADH. Dependiendo del aceptor de los electrones, los ensayos son de inhibición de la NADH:ubiquinona oxidoreductasa o de inhibición de la NADH oxidasa (Figura 1.11).

En el primer tipo de ensayo, el NADH soluble en agua cede sus electrones al complejo I y éste los transfiere a un aceptor (quinona) artificial. Adicionalmente se utilizan otros inhibidores para bloquear la acción del complejo III como la antimicina y del complejo IV como el KCN. Debido a que las quinonas fisiológicas son compuestos insolubles en el agua, la decil ubiquinona (DB) ha sido la más utilizada como aceptor de los electrones ya que reacciona completamente con los sitios del complejo I, es soluble en agua y tiene disponibilidad comercial, por lo que también se denominan ensayo de NADH: DB oxidoreductasa (Tormo *et al.*, 1999b)

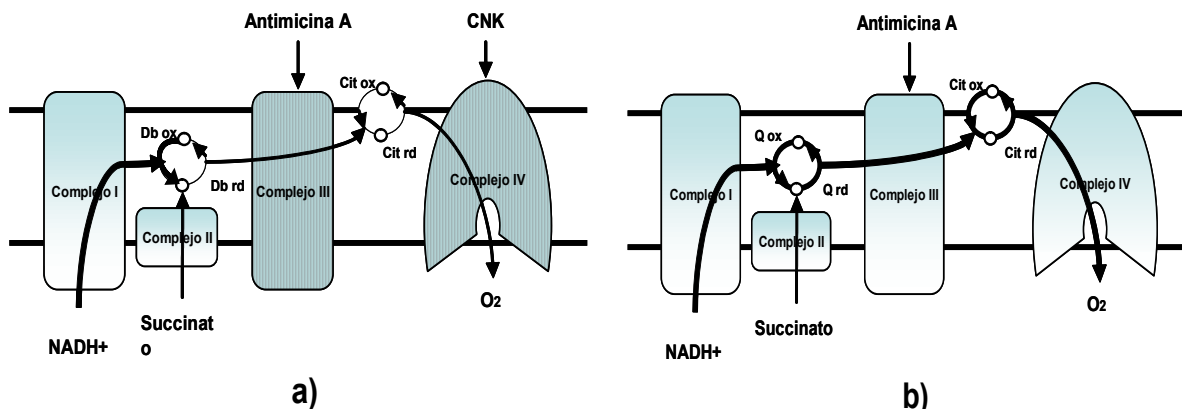


Figura 1.11. Esquema de la prueba de inhibición de la: a) NADH: decilubiquinona oxidoreductasa y b) de la NADH oxidasa (modificado de Tormo *et al.*, 1999b).

Por otro lado, el ensayo de inhibición de la NADH oxidasa representa una actividad integrada, en donde el NADH se oxida y los electrones son transferidos a lo largo de la cadena respiratoria y finalmente aceptados por el oxígeno molecular, por lo que se considera con condiciones más cercanas a las fisiológicas. Debido a que hasta el momento no se ha reportado que las ACG actúen sobre otros complejos mitocondriales, la inhibición de la actividad de la NADH oxidasa es directamente atribuida a la inhibición de la NADH ubiquinona oxidoreductasa (*ibidem*).

Es posible que las diferentes formas de inhibición de las ACG se deban a los diversos arreglos moleculares en su estructura, por lo que se han convertido en herramientas valiosas para estudiar este complejo mitocondrial e intentar comprender mejor su mecanismo. En comparación con otros inhibidores, se ha postulado que existen grupos químicos en la cadena alifática que pueden modular su actividad inhibitoria.

Bajo este esquema, en los ensayos de inhibición de la NADH oxidoreductasa, la cherimolina-1, (bis-THF no adyacente) mostró una curva de titulación hiperbólica, un comportamiento acompetitivo respecto a la quinona sustrato y un sitio de unión que no se sobrepone con la rotenona. Estas características, semejantes a la rolliniastatina-2, situaron a estos compuestos dentro del escaso tipo de inhibidores que bloquean el primer sitio de acoplamiento de la energía (A ó N_A) sugiriéndose que

el grupo OH situado en el C4 pudiera influir en su unión a este sitio (Estornell, *et al.*, 1997).

La rolliniastatina–1 (bis-THF *eritro/ cis/ treo/ cis/ treo*), la rolliniastatina–2 (bis-THF *eritro /trans/ treo/ trans/ treo*) y la crossolina (mono-THF; *treo/ trans/ treo*), con semejanza estructural pero estereoquímica diferente, presentaron discrepancias con relación a su comportamiento en los ensayos para la inhibición del complejo I, las cinéticas de Michaelis Menten y las cinéticas de desplazamiento con la rotenona, indicando que cada una de ellas puede actuar sobre diferentes sitios en el complejo I. Sin embargo estos estudios no pudieron definir si las acetogeninas inhiben en diferentes sitios o si el sitio de inhibición es suficientemente amplio con varios puntos de unión (Tormo *et al.*, 1999c) (Cuadro 1.7). Si bien se ha descrito que la actividad de las ACG mono-THF es menor que la exhibida por las bis-THF sobre NADH:ubiquinona oxidoreductasa, cuando se bloquea la NADH oxidasa ambos tipos de ACG lo hacen en el mismo rango de concentración. Lo anterior es señalado como una característica compartida con otros inhibidores del complejo I, incluyendo la rotenona.

Cuadro 1.7 Clasificación funcional de las acetogeninas como inhibidores del complejo I mitocondrial*.

Tipo Funcional	Curva de Titulación	Tipo de inhibición	Exclusión con Rotenona
Rolliniastatina –2 Inhibidor del sitio A	Hiperbólica	Acompetitiva	No
Crossolina Tipo general de ACG Inhibidor del sitio B	Hiperbólica	No competitiva	Si
Rolliniastatina –1 Tipo dual, Inhibidor de ambos sitios	Sigmoidal	Acompetitiva	Si
La rolliniastatina –1 es mutuamente excluyente con la rolliniastatina –2			

*De acuerdo a Tormo *et al.*, 1999c

1.3 El cáncer y los fármacos utilizados en su tratamiento

Las neoplasias malignas son la segunda causa de muerte después de las enfermedades crónico-degenerativas y supera a las defunciones conjuntas de SIDA, tuberculosis y malaria; 24.6 millones de personas en el mundo viven con cáncer y según las proyecciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), el número de casos nuevos por año aumentará de 10.9 millones en el año 2000 a 16 millones para el 2020 (Ochoa, 2008).

Se estima que más del 40% de los cánceres se pueden prevenir. Sin embargo, el aumento de algunos factores de riesgo, como el consumo de tabaco y la obesidad, contribuyen a aumentar la incidencia de la enfermedad, sobre todo en los países de ingresos bajos y medios. Otros factores de riesgo prevenibles son los carcinógenos ambientales y las infecciones que causan el virus de la hepatitis B y el virus del papiloma humano (VPH) (*Ibidem*).

En México, el cáncer constituye un problema importante de salud pública y la mayor letalidad se presenta en los hombres con tumores malignos de tráquea, bronquios y pulmón (16%), próstata (14.8%) y estómago (9.6%) en tanto que en las mujeres, los cervicouterinos (14%) y los de mama (13%) son los más frecuentes. (IMSS, 2005).

El término “cáncer” agrupa a una colección de enfermedades con la característica común de la reproducción incontrolada de tejido, producto de una acumulación de diversas alteraciones genéticas que les permiten superar los puntos de control del ciclo celular (Vogelstein y Kinzler, 1993); el espectro de alteraciones respecto al de las células de origen, determina el comportamiento biológico y la agresividad de cada tumor (Marx, 1994).

La mayoría de los fármacos oncológicos tienen como blanco de actividad al genoma o al metabolismo celular, por lo que actúan sobre las células transformadas pero también sobre tejidos normales; por ello, los pacientes bajo tratamiento

presentan diversos efectos adversos que incluye desde la caída de cabello, náuseas y cefaleas hasta defectos en los fetos, toxicidad, disminución del número de células blancas y daño severo en la médula ósea; frecuentemente se presenta supresión gonadal con deterioro de la función testicular u ovárica. Debido a su toxicidad, su administración es usualmente combinada a fin de atenuar sus efectos indeseables, así como para evitar en las células neoplásicas la inducción de mecanismos de multiresistencia (MDR) que les permita evadir la acción de los agentes oncológicos (Volk *et al.*, 2000).

1.3.1 El proceso de la carcinogénesis y sus fases

La carcinogénesis puede resultar de la acción de gran variedad de inductores químicos, físicos, biológicos y/o genéticos o de una combinación de estos; las células adquieren la ventaja de una expansión clonal como resultado de la activación de proto-oncogenes y/o inactivación de genes supresores de tumores.

Cuando se produce una alteración del ADN se advierten 3 posibilidades para la célula: pueden actuar los mecanismos de reparación del daño y la célula regresar a la normalidad, la célula puede morir, o puede pasar a ser una célula iniciada en la transformación. En la última posibilidad y durante la evolución de normales a cancerosas, las células transitan por eventos o fases de carcinogénesis denominados: a) iniciación, b) promoción y c) progresión (Vogelstein y Kinzler, 1993).

a) La iniciación, resulta de una alteración genética irreversible, probablemente a partir de una o más mutaciones simples, transversiones, transiciones y/o pequeñas supresiones de ADN con las siguientes características:

- Las células iniciadas son el resultado de una exposición subletal a un agente iniciador (p. ej. un carcinógeno químico).
- Las células iniciadas tienen un daño genético permanente y sostenido el cual es transmitido a su progenie. El daño celular no debe ser tan severo que incapacite a la célula para replicar su ADN y llevar a cabo la

división celular. Después de una ronda de replicación, el daño en el ADN se "fija" y por lo tanto es permanente.

- Las células iniciadas no están transformadas, pero tienen un riesgo mayor de volverse neoplásicas bajo circunstancias apropiadas.

b) La promoción involucra procesos donde la célula iniciada sufre una expansión clonal selectiva y desarrollan tumores benignos e incluye:

- La producción y el mantenimiento de una hiperplasia crónica específica. La proliferación celular sostenida tiene una combinación de replicación celular incrementada y una muerte celular disminuida.
- La proliferación celular permanece dependiente de la presencia continua del estímulo promotor por lo que el crecimiento no es autónomo (los tumores benignos, que representan el producto final de la promoción, pueden exhibir crecimiento no-regulado pero no crecimiento autónomo).
- La promoción resulta de mecanismos epigenéticos y no involucra cambios en la estructura del ADN, sino en la expresión del genoma mediante las interacciones del agente promotor con algunos receptores celulares. Aunque los promotores no sean mutagénicos (no causen cambios directos en el ADN), pueden ocurrir mutaciones adicionales debido a que las células en rápida división son genéticamente inestables y porque algunos promotores inducen la formación de radicales libres e inician el daño celular oxidativo. Lo anterior puede dañar el ADN y las enzimas que participan en la replicación y reparación del genoma.

c) La progresión constituye la conversión maligna e involucra la modificación de lesiones premalignas hacia lesiones malignas; se acumulan cambios genéticos que incrementan la velocidad de crecimiento, la capacidad de invasión y de metástasis celular. La fase final e irreversible de la progresión se caracteriza por

inestabilidad cariotípica y crecimiento maligno. (Vogelstein y Kinzler, 1993; Loeb, 1994)

1.3.2 La invasión y la metástasis

La invasión y la metástasis son la culminación de un proceso de carcinogénesis. El criterio de malignidad consiste en la capacidad de una neoplasia de invadir y generar tumores en sitios distantes del origen primario.

Las rutas para la diseminación de las células cancerosas incluyen:

- Los vasos linfáticos, los cuales no tienen membrana basal.
- Los vasos sanguíneos, a nivel capilar donde la barrera es limitada a una capa de células endoteliales y la membrana basal subyacente.
- Transcelómica: Está se lleva a cabo en las cavidades del cuerpo a través de diseminación por continuidad a lo largo de la superficies.

Los patrones de colonización revelan que los sitios de metástasis están influenciados por la irrigación sanguínea y las propiedades específicas de los tejidos. Para formar una metástasis las células cancerosas deben de ser capaces de pasar por una serie de eventos que se denomina “la cascada metastática” que incluye:

- La formación de un nódulo neoplásico primario con angiogénesis que permita el aporte sanguíneo.
- La invasión de las membranas basales epiteliales y/o endoteliales mediante la alteración y degradación de los contactos entre célula-célula y célula-matriz extracelular.
- La diseminación y supervivencia dentro de la circulación sanguínea.
- La invasión y proliferación en nuevos microambientes con neovascularización.
- Evasión de las respuestas inmunes antitumorales que puedan encontrarse en cualquiera de los pasos anteriores. (Cotran *et al.*, 1999; Aznavoorians *et al.*, 1993).

1.3.3 La resistencia de las células cancerosas

Uno de los mayores problemas clínicos en los pacientes con cáncer, es la falta de respuesta de los tumores a uno o varios agentes oncológicos que pueden diferir en su estructura química, blancos farmacológicos o inclusive rutas metabólicas, denominado sistema de resistencia múltiple a los fármacos (MDR). Esta resistencia puede aparecer durante el curso de la evolución de la enfermedad (resistencia intrínseca) o en respuesta a la quimioterapia (resistencia adquirida) (Illmer *et al.*, 2000; Bredel, 2001), como resultado de alteraciones genéticas que les permite a las células transformadas evadir la acción de uno o varios fármacos (multifármacos). La utilización de algunos fármacos para sensibilizar a las células para la quimioterapia o para bloquear algún mecanismo de resistencia (varapamil o ciclosporina A), puede resultar en la adquisición de nuevas vías de salvamento celular, lo que indica que este sistema no sólo es complejo sino también multifactorial (Harker *et al.*, 1986). Los mecanismos de resistencia identificados *in vitro* caen en tres categorías principales.

Reducción intracelular de los fármacos asociada a la sobreexpresión de proteínas transportadoras como: (a) proteínas transportadores pertenecientes a la familia que une e hidroliza ATP (ATP-binding cassettes o transportadores-ABC), entre las que se han descrito la P-glicoproteína de membrana (P-gp), la proteína asociada a la resistencia múltiple (MRP) y la proteína de resistencia del cáncer mamario (BCRP). Estas proteínas funcionan como bombas dependientes de ATP, reduciendo la acumulación intracelular de los fármacos. (Lage, 2003; Juranka *et al.*, 1989). (b) La sobre-expresión de la proteína mayor de cúpulas (LRP) asociada a las partículas de 13 MDa de ribonucleoproteínas, involucradas en el transporte bi-direccional de substratos entre el núcleo y el citoplasma y que han sido relacionadas con la redistribución y secuestro de los fármacos (Sunnaram *et al.*, 2003).

Alteración de los blancos de actividad de los fármacos. Muchos fármacos tienen como blanco de acción al ADN, y un mecanismo de resistencia es el incremento en su nivel de reparación. Por ejemplo, la sobre-expresión de la enzima reparadora MGMT permite la remoción de grupos metil unidos en el O⁶ de guaninas,

resultantes de de la quimioterapia con nitroureas. Otro mecanismo es la alteración en la expresión de la ADN topoisomerasa II (dependiente de ATP) (Bredel, 2001).

Alteración en la apoptosis. La mayoría de los fármacos oncológicos actúan directa o indirectamente sobre puntos específicos de las rutas apoptóticas, por lo que el cambio en alguna de las enzimas o en su expresión, puede elevar la resistencia a la muerte celular. La sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y mutaciones en la ciclina p53 son algunas de las más documentadas. (Robert, 2001; Lebedeva *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 1999).

1.3.4 Mecanismos de acción de los fármacos antineoplásicos

La cirugía y/o radioterapia son los procedimientos recomendables para tumores localizados y cuando la invasión a otros órganos no se ha diagnosticado; los tumores metastáticos o diseminados son generalmente tratados con quimioterapia. La actividad de los fármacos es heterogénea y puede o no, ser dependiente de alguna fase del ciclo celular. A continuación, se describe de manera sucinta la acción de los fármacos mas utilizados, así como los mecanismos celulares de resistencia a ellos.

Inhibidores de microtúbulos como la vincristina, vinblastina y el taxol (paclitaxel). Los microtúbulos son polímeros de proteínas responsables de la formación del huso mitótico y el movimiento de los cromosomas durante la división celular; su componente principal es la tubulina, una proteína con dos subunidades (alfa y beta). Los alcaloides de *Vinca* (vincristina y vinblastina) así como el triterpeno de *Taxus brevifolia* (taxol), bloquean las células en fase M (mitosis) especialmente durante la metafase. Estos compuestos se unen al C terminal de la β tubulina impidiendo la formación de dímeros y reduciendo su disponibilidad para el ensamblaje de microtúbulos. Lo anterior provoca el desensamblaje y la formación de microtúbulos pequeños, que da como resultado la interrupción de la división celular (Gupta *et al.*, 2003). La resistencia a su acción esta relacionada con la sobreexpresión de la glicoproteína transportadora de membrana Pgp, la cual puede compartirse con otros fármacos (Kiue *et al.*, 1990; Depeille *et al.*, 2004) o por una

alteración en la estructura de la tubulina, lo que resulta en un cambio de afinidad del compuesto por la proteína (Bredel, 2001).

Fármacos que se unen covalentemente al ADN a) Agentes alquilantes como la ciclofosfamida y el clorambucil. Todos los agentes alquilantes tienen grupos electrofílicos que reaccionan con grupos donantes de electrones. Los efectos citotóxicos de estos compuestos se relacionan con la alquilación del ADN especialmente en el N⁷ de la guanina y O⁶ de la citocina (Cai *et al.*, 1999; Hemminki, 1985). Los fármacos pueden ser mono o bifuncionales, siendo los últimos más potentes ya que producen cruzamiento intra e intercadena del ADN. Los agentes alquilantes son generalmente considerados independientes del ciclo celular, aunque son más citotóxicos en las células de alta proliferación y las consecuencias biológicas son más severas cuando su interacción es durante la síntesis del ADN (fase S). Varios mecanismos se han implicado como causa de su resistencia: el decremento de su concentración en las células, el aumento de glutatión (donador de electrones) y el incremento en los mecanismos de reparación del ADN (Gaidano *et al.*, 2002; Richardson y Sieman 1995). b) Coordinados de platino como el Cis platino (cis-diclorodiaminoplatino). Los coordinados de platino trabajan diferente a los agentes alquilantes. Intercambian iones cloruro por grupos nucleofílicos. Si bien existen en forma *cis* y *trans*, sólo los primeros tienen actividad antitumoral, posiblemente por tener los grupos reactivos en esa orientación. Su sitio principal de unión es N⁷ de la guanina y de la adenina, formando entre-cruzamientos entre el fármaco y el ADN (Silverman *et al.*, 2002); su actividad no parece ser dependiente del ciclo celular. La resistencia cruzada con los agentes alquilantes no es frecuente, pero al igual que en ellos, se presenta mediante un aumento en los mecanismos de reparación del ADN y un incremento de glutatión o de proteínas que unen metales (Yamada *et al.*, 1997).

Fármacos que se unen no covalentemente al ADN como los antibióticos antraciclínicos doxorubicina (adriamicina) y dactinomicina (actinomicina D). Estos fármacos interactúan con el ADN en diferentes formas incluyendo su intercalación, rompimiento de las cadenas del ADN e inhibición de la transcripción. A bajas

concentraciones forman un complejo con el ADN bloqueando el movimiento de la ARN polimerasa, lo que interfiere con la síntesis del ARN dependiente del ADN. A altas concentraciones la replicación del ADN también puede inhibirse. Se afecta la transcripción de todos los tipos de ARN pero los de ARN ribosomales son más sensibles. Su acción citotóxica puede ser en cualquier fase del ciclo celular, tanto en células en división como en G₀. Su resistencia se observa por la amplificación del gen *mdr-1* que codifica para la glicoproteína transportadora de membrana Pgp y es cruzada con otros antibióticos antraciclínicos y alcaloides de *Vinca* (Slapak *et al.*, 1994; Bredel, 2001).

Antimetabolitos como el Metotrexato. En este grupo se encuentran análogos estructurales de compuestos que intervienen en la biosíntesis de los ácidos nucleicos (Fase S) y que actúan competitivamente por los sitios de unión de diversas enzimas. Existen tres categorías de ellos: antifolatos, análogos de purinas y antimetabolitos de pirimidinas. El metotrexato se une a la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) e impide que ésta reduzca al ácido fólico del cual se derivan una serie de cofactores que proveen grupos carbonos para la síntesis de los precursores de ADN/ARN como purinas y el timidilato y por lo tanto se reprime la división celular (Damaraju *et al.*, 2005). Los mecanismos de resistencia a este fármaco están relacionados con la sobre-expresión de proteínas de membrana que disminuyen su concentración intracelular, así como por amplificaciones y mutaciones del gen que codifica para la dihidrofolato reductasa (Volk *et al.*, 2001; Bredel, M. 2001).

Otros Inhibidores: a) glucocorticoides antiestrogénicos como tamoxifen. La terapia con estos fármacos es una de la más utilizadas y efectivas en el manejo de cáncer de mama dependiente de estrógeno. El tamoxifen actúa como un inhibidor competitivo de la unión del estradiol al receptor celular de estrógeno. Su unión produce cambios en la forma tridimensional de los receptores, impidiendo su unión posterior a la secuencia de respuesta estrogénica en el ADN (Clark *et al.*, 2001). b) Inhibidores de la angiogénesis como endostatina. Estos fármacos actúan inhibiendo al factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y por lo tanto la proliferación de

las células endoteliales, que son necesarias para la formación de nuevos vasos sanguíneos en el crecimiento de los tumores y en la metástasis (Hajitou *et al.*, 2002).

La tendencia actual es encontrar o diseñar fármacos con una adecuada selectividad o con baja acción sobre las células normales. Existen varias aproximaciones como la utilización de anticuerpos monoclonales unidos a fármacos, toxinas o radio-nucleótidos, que reconocen determinantes antigénicos asociados a los tumores (Lin *et al.*, 2005); modificadores de las respuestas biológicas como interferones e interleucinas para reforzar la respuesta inmunológica de los pacientes y el desarrollo de terapias enfocadas a la inducción de la muerte celular o apoptosis (Ghobrial *et al.*, 2005).

1.3.5 Los ratones atímicos como modelo para estudiar el efecto de los fármacos oncológicos

El ratón desnudo consigue su nombre porque no tiene pelo, aunque la ausencia de timo es el rasgo más interesante. Estas características se presentan cuando el ratón es homocigoto para el gene recesivo *nu*.

La ausencia del pelo es debida a una deteriorada queratinización que da por resultado la fractura de los pelos dentro de los folículos. Se considera que la condición sin pelo y la falta del desarrollo del timo ocurren por un defecto en el ectodermo embrionario cuyas primeras señales se observan a partir del día 11 de gestación. El sistema inmune de este ratón se caracteriza por tener: una población pequeña de células T que no llegan a madurar; una respuesta inmune humoral confinada a la clase de IgM; un nivel bajo de respuesta a los antígenos T-dependientes; y un aumento compensatorio en el nivel de las células asesinas naturales (*natural killers*, NK) en comparación con los ratones normales (Sundberg, 1994).

Debido también a la ausencia de timo, no pueden desarrollar la mayoría de las inmunorespuestas, incluyendo:

- La formación de anticuerpos que requieren de células T cooperadoras (T_H ó CD+4)
- Inmunorespuestas que requieren células CD+4 y/o CD+8
- Respuestas de hipersensibilidad tardía
- Desarrollo de células citotóxicas CD+8 (T_c)
- Rechazo a injertos (requieren CD+4 y CD+8)

La ausencia de las células T evita que los ratones desnudos rechacen los injertos de la misma especie (alloinjertos) e incluso injertos de otras especies (xenoinjertos). Debido a su pobre respuesta inmune, su crianza y reproducción debe ser en condiciones libre de gérmenes ya que los animales son muy susceptibles a microorganismos y pueden morir fácilmente (Fogh y Giovanella, 1982).

Los ratones desnudos han contestado no sólo muchas preguntas en inmunología, sino que su capacidad de mantener el tejido humano les ha hecho ser modelos indispensables para investigar, entre otras, las características de diferentes tipos de cáncer humanos y el efecto que diversas fármacos tienen sobre los organismos debido a que las interacciones multisistémicas permanecen intactas (Figura 1.12).



Figura 1.12 Ratón atímico de seis semana de edad.

Capítulo II. Justificación y objetivos

4.1 Justificación

Los metabolitos secundarios de las plantas son una de las fuentes más importantes en la búsqueda de moléculas activas para desarrollo de nuevos medicamentos (Cowan, 1999). En el área oncológica, algunos de los fármacos más prescritos provienen o fueron desarrollados a partir de estructuras de productos naturales con actividad antitumoral, entre los que se encuentran los alcaloides de *Vinca*, vincristina y la vinblastina (*Catharantus roseus*), el taxol de *Taxus brevifolia* (Huan *et al.*, 2004), así como los antibióticos antraciclínicos adriamicina de *Streptomyces peucetius* y la bleomicina de *Streptomyces verticillus* (Bredel *et al.*, 2001).

Las acetogeninas de anonáceas (ACG) constituyen un grupo bioactivo de metabolitos secundarios aislados de la familia Annonaceae y presentan una gran actividad inhibitoria sobre la proliferación de líneas cancerosas; su mecanismo de acción los señalan como uno de los grupos de inhibidores más potentes del complejo I mitocondrial (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) (Zafra–Polo *et al.*, 1996; Tormo *et al.*, 1999; Alali *et al.*, 1999).

En los últimos años, se han intensificado las investigaciones sobre la estructura de la molécula que permita la mayor actividad inhibitoria sobre el complejo I mitocondrial o en las células tumorales en cultivo; sin embargo, la relación entre su actividad sobre el complejo I mitocondrial y su efecto citotóxico en las células neoplásicas aún no se ha encontrado (Royo *et al.*, 2003; Tormo *et al.*, 2003; Tormo *et al.*, 2005). Este hecho pudiera deberse a que los ensayos sobre el complejo I se han realizado en partículas submitocondriales abiertas, en donde las ACG no tienen barreras fisiológicas que prevengan su unión a la enzima.

La resistencia a las ACG aún no ha sido reportada, lo que pudiera ser el reflejo de que cambios o mutaciones en el complejo I mitocondrial disminuyen sensiblemente el transporte de electrones en la cadena respiratoria con consecuencias severas para la síntesis de ATP y comprometiendo la vida celular

(Degli, 1998). Un ejemplo de ello es la muerte de pacientes con mutaciones en este complejo enzimático en edad infantil (Procaccio *et al.*, 1999).

Las acetogeninas reducen los niveles energéticos celulares e inducen la apoptosis (Zhu *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2003) y aunque aún no está claro el mecanismo de activación, posiblemente acontece por la vía mitocondrial con pérdida del potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) y liberación del citocromo c. Lo anterior junto a su actividad sobre las células neoplásicas con mecanismos de resistencia a las drogas, las señala como moléculas importantes en el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos.

Sin embargo, una molécula para ser considerada como fármaco potencial, debe tener una adecuada selectividad sobre las células blanco y el menor efecto tóxico para el organismo receptor. Así, se ha investigado la actividad antitumoral *in vivo* de algunas ACG (Ahammadsahi *et al.*, 1993; Wang, *et al.*, 2002) y aunque los resultados son prometedores, los estudios son poco comparables.

Annona diversifolia es una especie americana cuyo cultivo en Chiapas es apreciado en los lugares donde los frutos se consumen y comercializan. De ella se han obtenido extractos de hojas y tallos con actividad insecticida y se han identificado diversas acetogeninas que pudieran ser parte del mecanismo defensivo de la planta contra el ataque de sus predadores (González-Esquinca *et al.*, 2007).

Entre las acetogeninas aisladas de *A diversifolia* se encuentran laherradurina y la cherimolina-2, las cuales se utilizaron para analizar interrogantes aún no resueltas en el estudio de éstos compuestos, como la relación entre su actividad citotóxica en los cultivos celulares y su efecto inhibitorio en el desarrollo de tumores en animales experimentales; asimismo, se consideró importante incursionar sobre su mecanismo de acción en células neoplásicas que pudiera explicar su actividad.

4.2 Hipótesis de trabajo

Si las acetogeninas de la familia Annonaceae inhiben la proliferación de las células cancerosas en cultivo o implantadas en modelos murinos, entonces las acetogeninas laherradurina y cherimolina-2 de *Annona diversifolia* Saff, deberán de exhibir una actividad correspondiente en ambos tipos de ensayos.

4.3 Hipótesis alternativa

La actividad inhibitoria de las acetogeninas laherradurina y cherimolina-2 de *Annona diversifolia* Saff sobre la proliferación de células cancerosas en cultivo, no presenta correspondencia con el mostrado sobre el desarrollo de los tumores inducidos en modelos murinos.

4.4 Objetivo general

Evaluar la actividad inhibitoria de las acetogeninas laherradurina y cherimolina-2 de *Annona diversifolia* Saff. sobre la proliferación de células cancerosas.

4.4.1 Objetivos particulares

1. Determinar en ensayos de proliferación celular, la susceptibilidad de cinco líneas tumorales humanas a las acetogeninas.
2. Analizar el efecto de la dosis efectiva media (DE_{50}) de las acetogeninas sobre el desarrollo de los tumores sólidos inducidos en ratones atímicos en dos líneas neoplásicas.
3. Evaluar el consumo de oxígeno vinculado a la síntesis de ATP en células neoplásicas expuestas a las acetogeninas.

CAPÍTULO III. DESARROLLO DE LOS OBJETIVOS

3.1 Susceptibilidad de cinco líneas tumorales humanas en cultivo a las acetogeninas laherradurina y cherimolina-2

3.1.1. Descripción general

La concentración efectiva media (CE_{50}) reportada para las ACG sobre las líneas cancerosas humanas es muy variada. La trilobacina y la asiminocina presentan valores de CE_{50} menores a 1×10^{-12} $\mu\text{g/mL}$ en algunas líneas celulares (Alali *et al.*, 1999); la bullatacina tuvo un efecto citotóxico dependiente de la concentración entre 1.0 a 1×10^{-4} $\mu\text{g/mL}$ en células MCF-7 resistentes a los fármacos (Oberlies, 1997b); y la esquamocina de 1×10^{-2} $\mu\text{g/mL}$ sobre la línea de leucemia HL-60 (Zhu *et al.*, 2002).

Por esta razón, en los ensayos de proliferación con las líneas tumorales humanas de cérvix Ca Ski, HeLa y Si Ha, de colon SW-480 y de mama MCF-7, se utilizó un amplio margen de concentración molar de laherradurina y cherimolina-2. La concentración efectiva media (CE_{50}) de las acetogeninas se obtuvo a las 48 h de exposición de las células a los compuestos.

También se observó en las líneas celulares, el efecto de una concentración de las ACG y se obtuvo el porcentaje de reducción de la proliferación celular a diferentes tiempos de exposición durante 96 h. Como fármaco antineoplásico de referencia se utilizó en todos los ensayos la doxorubicina (adriamicina, doxolem®).

3.1.2. Material vegetal

Los frutos de *Annona diversifolia* se recolectados en Copoya, Municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México durante septiembre de 2003. Esta localidad se encuentra a 850 msnm y presenta un clima calido subhúmedo con lluvias en verano, A (w0). Su temperatura media anual es de 25.6° C y la precipitación promedio de lluvia es de 882.6 mm anuales (INEGI, 2003) (Figura 3.1.1). La muestra de referencia con número 352 se encuentra en el herbario HEM de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Chiapas, México.

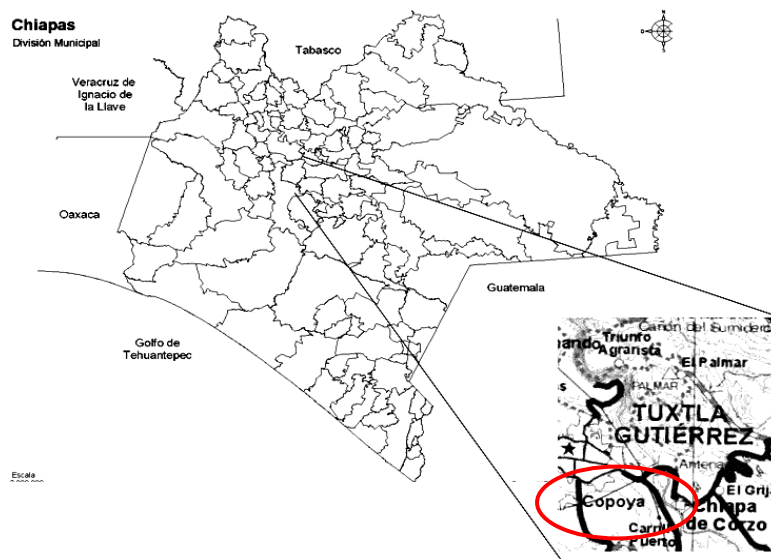


Figura 3.1.1. Ubicación geográfica de Copoaya en el Municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

3.1.3. Las acetogeninas laherradurina y la cherimolina-2

La obtención de las acetogeninas a partir de extractos hexánicos de las semillas se realizó en el laboratorio de Fisiología y Química Vegetal de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, de acuerdo con el procedimiento reportado por González-Esquinca (2001). Las acetogeninas purificadas fueron identificadas como laherradurina y cherimolina-2 por el Dr. Diego Cortes del Departamento de Farmacología, Laboratorio de Farmacognosia de la Universidad de Valencia, España.

Laherradurina ($C_{37}H_{68}O_7$; PM 624)

Inicialmente aislada de las semillas de *A. cherimola* (Cortes, 1983), pertenece al grupo 20 de la clasificación de Bermejo (Bermejo *et al.*, 2005); posee en su cadena alifática dos anillos THF adyacentes (*treo/trans/treo/trans/eritro*) flanqueados por dos grupos hidroxilo en los carbonos 15 y 24. El largo de la cadena del espaciador es de 13 carbonos y presenta una γ -lactona β -hidroxil γ -metil-saturada terminal, la cual es poco usual en estos compuestos, (Warmerdam *et al.*, 1998; Bermejo *et al.*, 2005) (Figura. 3.1.2).

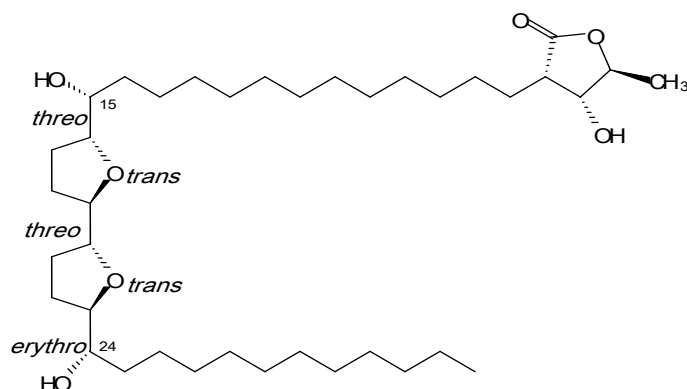


Figura 3.1.2. Estructura de laherradurina.

Los trabajos realizados con este compuesto reportan que la ACG es citotóxica en los cultivos de *Artemia salina* (DL_{50} de $5 \mu\text{g/mL}$) desde las 6 h de su incorporación (De la Cruz, 2001) siendo uno de los inhibidores más potentes del complejo I mitocondrial (DI_{50} de 0.18 nM) superior a la itrabina (0.21 nM), rolliniastatina-1 (0.60 nM) y cherimolina-1 (1.84 nM) (Tormo *et al.*, 2001). Existen reportes de su actividad en las líneas humanas de carcinoma colorectal resistente a las drogas SW-480_{Pgp+} ($CE_{50} 0.64^{-6}$), cérvico uterino HeLa ($CE_{50} 0.74^{-2}$) y de melanoma SkMel 28 ($CE_{50} 0.14$) (González-Coloma *et al.*, 2002).

Cherimolina-2 ($C_{37}H_{66}O_8$; PM 638)

También conocida como bullatanocina, esta ACG ha sido aislada de las semillas de *A. cherimola*, *A. crassiflora*, *A. glabra*, *A. squamosa* y de las hojas de *A. purpurea*; pertenece al grupo 16 de la clasificación de Bermejo (Bermejo *et al.*, 2005) con un sistema de anillos tetrahidrofurano no adyacentes. En su cadena alifática se localizan grupos OH en los carbonos 4, 16, 19 y 24; presenta un espaciador de 9 carbonos y una γ metil γ lactona terminal no saturada (Cavé *et al.*, 1977) (Figura 3.1.3).

Los reportes indican que este compuesto es citotóxico en células de carcinoma humano de pulmón (A549), de colon (HT-29) (CE_{50} menor de 1×10^{-8} en ambos casos) y de mama (MCF-7) (CE_{50} menor de 6.07×10^{-1}) (Cortes *et al.*, 1993) y que reduce el consumo de oxígeno en las mitocondrias del hígado de rata en el

mismo rango de concentración de la bullatacina (DI_{50} de 69 nM) (Landolt *et al.*, 1995).

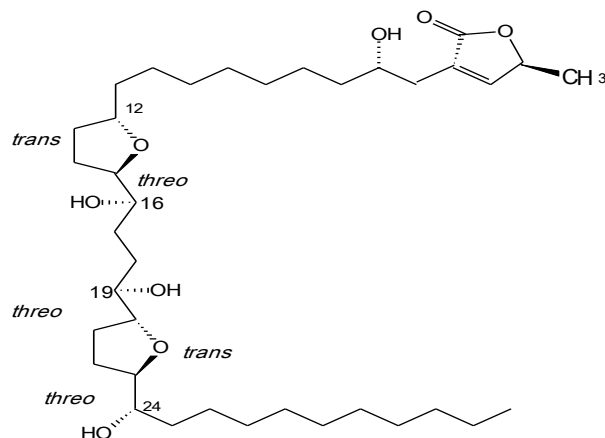


Figura 3.1.3. Estructura de cherimolina-2.

3.1.4 Origen y características de las líneas celulares neoplásicas

Las líneas de células neoplásicas humanas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Virus y Cáncer del Instituto Nacional de Cardiología, México, D.F. y algunas de sus características de acuerdo con la Colección de Células Tipo Americano (ATCC) se presentan en los cuadros siguientes.

Cuadro 3.1.1 Características generales de la línea celular Ca Ski.

Número en la colección ATCC: RL-1550	Nombre: Ca Ski
Morfología: epitelial	Propiedades de crecimiento: adherente
Órgano de procedencia: cérvix	Enfermedad descrita: carcinoma epidermoide
Productos celulares: Subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana (hCG)	
Comentarios: las células tienen integradas alrededor de 600 copias del genoma del virus del papiloma tipo 16 (HPV-16).	

Cuadro 3.1.2 Características generales de la línea celular MCF-7.

Número en la colección ATCC: HTB-22	Nombre: MCF7 [MCF-7]
Morfología: epitelial	Propiedades de crecimiento: adherente
Órgano de procedencia: glándula mamaria	Enfermedad descrita: adenocarcinoma mamario
Productos celulares: Proteínas de unión a los factores de crecimiento (IGFBP) BP-2, BP-4 y BP-5	
Comentarios: la línea MCF7 conserva algunas características del epitelio mamario diferenciado como el procesamiento de estradiol.	

Cuadro 3.1.3 Características generales de la línea celular SW-480.

Número en la colección ATCC: CCL-228	Nombre: SW480 [SW-480]
Morfología: epitelial	Propiedades de crecimiento: adherente
Órgano de procedencia: colon	Enfermedad descrita: Adenocarcinoma colorectal
Productos celulares: antígeno embrionario-carcinogénico (CEA), queratina, factor de transformación beta	
Comentarios: las células producen tumores sólidos en ratones atímicos y expresan niveles elevados de p53 así como los oncogenes <i>c-myc</i> , <i>K-ras</i> , <i>H-ras</i> , <i>N-ras</i> , <i>myb</i> , <i>sis</i> y <i>fos</i> .	

Cuadro 3.1.4 Características generales de la línea celular HeLa.

Número en la colección ATCC: CCL-2	Nombre: HeLa
Morfología: epitelial	Propiedades de crecimiento: adherentes
Órgano de procedencia: cérvix	Enfermedad descrita: adenocarcinoma
Productos celulares: antígeno embrionario-carcinogénico (CEA), queratina y factor de transformación beta	
Comentarios: las células teñidas con inmunoperoxidasa son positivas a queratina; contienen secuencias del virus del papiloma 18 (HPV-18)	

Cuadro 3.1.5 Características generales de la línea celular SiHa.

Número en la colección ATCC: HTB-35	Nombre: SiHa
Morfología: epitelial	Propiedades de crecimiento: adherentes
Órgano de procedencia: cérvix	Enfermedad descrita: carcinoma de células escamosas
Comentarios: las células producen carcinomas epidermoides poco diferenciados en ratones atímicos; expresan niveles altos de p53; tienen integrados 1 ó 2 copias del genoma del virus del papiloma 16 (HPV-16)	

3.1.5. Método

3.1.5.1 Mantenimiento de las líneas neoplásicas

Para mantenimiento de las líneas celulares se utilizó medio de cultivo D- MEM/F12 (Medio de Eagle modificado por Dulbecco) adicionado con 10 % de suero fetal bovino y antibióticos (100 µg/mL de penicilina y 100 pg/mL de estreptomycin) denominado medio completo; los cultivos celulares fueron mantenidos a 37⁰ C con ambiente húmedo y 5% de CO₂. Todo el manejo de las líneas celulares se llevó a cabo en condiciones de esterilidad.

Cuando en las cajas de cultivo las células se encontraban confluentes se realizaron nuevas siembras con el siguiente procedimiento:

1. Se aspiró y desechó el medio de cultivo; la monocapa celular se lavó con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.15 mM pH 7.2, removiendo todo el suero que contenía inhibidores de tripsina.
2. Se agregó de 2.0 a 3.0 mL de una solución de 0.25 % (v/v) de Tripsina-0.53 mM de EDTA y se observó con el microscopio invertido hasta que las células perdieran su adherencia al substrato (usualmente dentro de 5 a 15

minutos). Las células difíciles de separar, se colocaron a 37° C por unos minutos para facilitar su dispersión.

3. Se agregó de 6.0 a 8.0 mL de medio completo para inhibir la acción de la tripsina
4. Las células se lavaron por centrifugación a 1000 rpm por 3 min.
5. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en medio de cultivo completo; se colocó una alícuota de la suspensión celular en nuevas cajas de cultivo con medio fresco.

La preservación de las células se llevó a cabo con medio de cultivo completo suplementado con 5 % (v/v) de dimetil sulfóxido (DMSO); las alícuotas se almacenaron a -80° C o en nitrógeno líquido.

3.1.5.2. Conteo de células viables con azul de tripán:

El procedimiento se basa en la capacidad que tiene la membrana plasmática íntegra de no permitir la entrada de este colorante por lo que bajo el microscopio las células vivas se observan refringentes; las células muertas aparecen teñidas de azul.

En general, a 900 µl de una suspensión celular se le agregó 100 µL de 0.25 % (p/v) de azul de tripán en PBS 0.15M pH 7.2 (dilución 1/10). Las células se contaron en los cuadrantes incluidos en las reglillas de una cámara de Neubauer y su número (No. de células x 10³/mL) se obtuvo mediante la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{No. de células contadas}}{\text{No. de cuadrantes contados}} \times 10,000 \text{ (factor de conversión)} \times \text{(dilución)}$$

Para determinar el porcentaje de viabilidad, se contó el número de células en 4 cuadrantes y se comparó con el obtenido de las células refringentes al azul de tripán obteniendo su porcentaje. Para los ensayos de proliferación, la viabilidad celular fue siempre mayor al 90 %.

3.1.5.3. Cuantificación de la viabilidad celular en los ensayos de proliferación celular utilizando el reactivo de MTT

El colorante 3(4,5-dimetil-tiazol-2-yl) 2,5 bromuro de difeniltetrazolium (MTT) se reduce por las deshidrogenasas mitocondriales activas a formazán de color púrpura. El uso de MTT para medir la proliferación celular es uno de los métodos reportados con más frecuencia ya que detecta las células vivas en una mezcla de vivas y muertas, es cuantitativo y permite procesar una gran cantidad de muestras en poco tiempo. (Mosmann, 1983; Yuan *et al.*, 2003). El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

1. El MTT se disolvió a una concentración de 5 mg/mL en PBS 0.15 M; pH 7.2 y se guardó protegido de la luz, por no mas de 15 días a 4° C.
2. En los tiempos establecidos, una alícuota de 10 µL de la solución de MTT se agregó a cada microcultivo de una placa de 96 pozas y se incubó por 3 horas adicionales.
3. El medio de cultivo con el colorante se retiró y a cada poza se añadió 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) a fin de lisar las células y solubilizar el formazán de MTT. La placa se introdujo en un lector de microplacas (Biorad 680) y se obtuvieron las densidades ópticas de cada microcultivo (D.O.) a 570 nm.

3.1.5.4 Ensayos de proliferación celular

Las acetogeninas laherradurina y la cherimolina-2 así como el fármaco anticanceroso doxorubicina (adriamicina, doxolem®) fueron disueltos a una concentración de 1 mg/mL en DMSO y guardados a 4° C (soluciones madre). En los ensayos de proliferación celular, el DMSO en ningún caso sobrepasó el 3 % del volumen final del medio de cultivo. El flujograma de los ensayos *in vitro* se presenta en la figura 3.1.4.

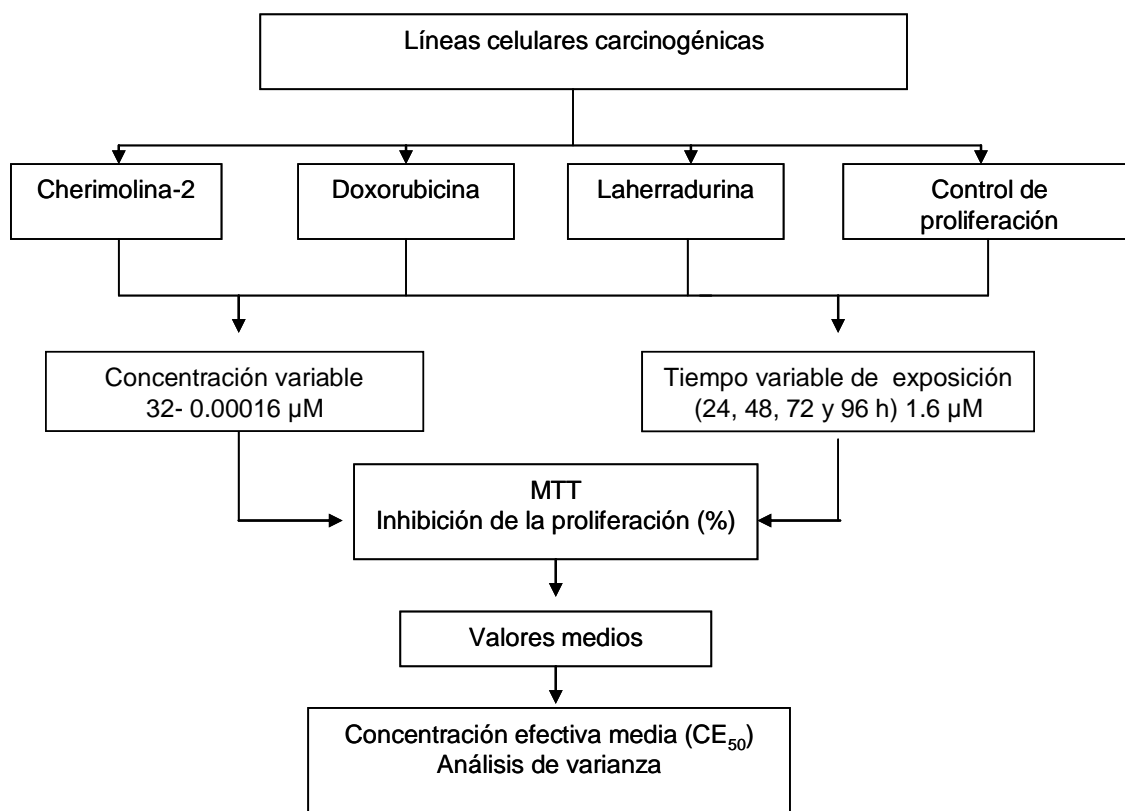


Figura 3.1.4 Flujograma de los ensayos de proliferación celular.

Concentración variable de los compuestos

Se colocaron 10,000 células en un volumen de 100 μL de medio de cultivo completo en cada poza de una placa de microcultivos de 96 y se dejaron incubando durante toda la noche para permitir su adherencia.

Al día siguiente se agregaron los compuestos en 100 μL de medio de cultivo de acuerdo a las concentraciones molares finales que se presentan en el cuadro 5.6. Los cultivos celulares que fungieron como control de la proliferación celular solo recibieron 100 μL del medio completo (sin tratamiento).

Las placas se incubaron por 48 h a 37°C con ambiente húmedo y 5 % de CO_2 hasta su cuantificación con el reactivo de MTT y se obtuvo los valores de D.O. a 570 nm en un lector para microplacas. Todas las condiciones se realizaron por triplicado.

Cuadro 3.1.6. Molaridad de los compuestos en los cultivos celulares.

($\mu\text{g/mL}$)	Laherradurina (PM 624)	(PM Cherimolina-2 (PM 638)	Doxorubicina (adriamicina) (PM 543)
	μM		
20	32.0	31.4	36.8
10	16.0	15.7	18.4
1	1.60	1.56	1.84
0.1	0.160	0.157	0.184
0.01	0.016	0.016	0.018
0.001	0.0016	0.0016	0.0018
0.0001	0.00016	0.00016	0.00018

Tiempo variable de exposición a los compuestos

Se colocaron 5,000 células en un volumen 100 μL de medio completo en cada poza de una placa de microcultivos de 96 pozas en las condiciones descritas anteriormente.

Al día siguiente se agregó a las pozas 3.2 μM de laherradurina ó 3.12 μM de cherimolina-2 ó 3.68 μM de doxorubicina en 100 μl de medio de cultivo, por lo que la molaridad en los cultivos se redujo a la mitad. Las placas se incubaron a 37⁰ C con ambiente húmedo y 5% de CO₂.

A las 24, 48, 72, y 96 h de exposición, muestras por triplicado y sus controles de proliferación celular (sin tratamiento) se analizaron con el reactivo de MTT obteniendo su lectura espectrométrica a 570 nm en un lector de microplacas.

3.1.5.5. Análisis estadístico de los datos

El porcentaje de inhibición de la proliferación por los compuestos se obtuvo de acuerdo a la siguiente fórmula:

Inhibición de la proliferación (%) = $100 - [(valor\ de\ la\ proliferación\ de\ cada\ cultivo\ experimental) / valor\ medio\ del\ grupo\ control] \cdot 100$.

1. La Concentración Efectiva Media (CE₅₀) se obtuvo gráficamente para cada compuesto.
2. Se realizó la prueba estadística de Análisis de Varianza (ANDEVA) entre los grupos experimentales y el control de proliferación celular considerando un resultado significativo si $P \leq 0.05$

3.1.6 Resultados

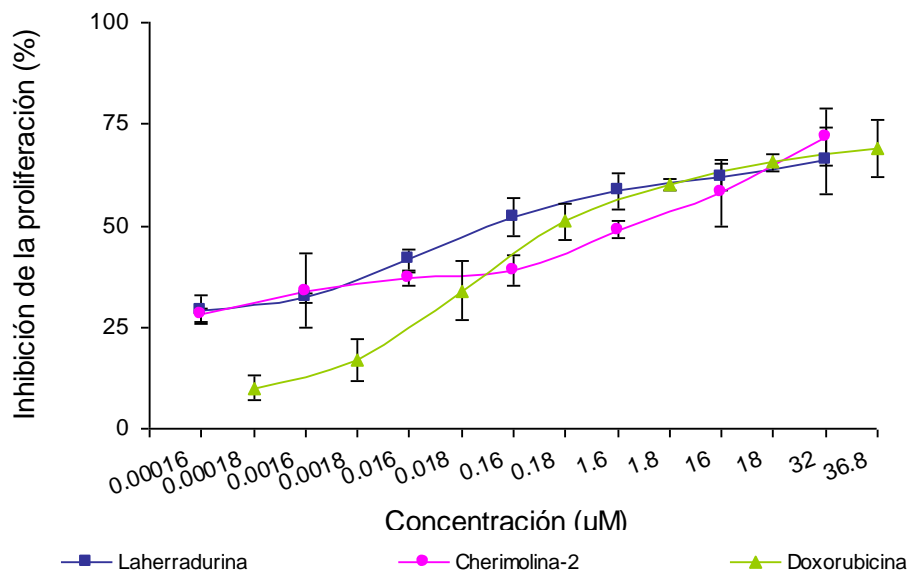
3.1.6.1 Susceptibilidad de las líneas celulares neoplásicas a las concentraciones variables de laherradurina, cherimolina-2 y doxorubicina.

Con el fin de comparar la actividad de los compuestos, los resultados se presentan en concentraciones molares (μM).

Actividad en las células del carcinoma de cérvix Ca Ski

En general se observó una mayor inhibición de la proliferación celular a medida que las concentraciones de los compuestos se incrementaron. La concentración molar más baja de ambas acetogeninas que tuvo un efecto significativo en las células CaSki ($P \leq 0.05$), fue de $0.0016\ \mu\text{M}$ en tanto que para la doxorubicina correspondió a $0.018\ \mu\text{M}$.

Si bien la molaridad más alta utilizada de los compuestos, inhibe la proliferación celular de manera semejante (aproximadamente un 70 %), cuando el número de moles se reduce, las acetogeninas son prácticamente tres veces más activas que la doxorubicina. Así, $0.00016\ \mu\text{M}$ de laherradurina y cherimolina-2 inhibieron la proliferación celular en 29 y 28.5 % en contraste con el 10% de $0.00018\ \mu\text{M}$ de doxorubicina (adriamicina). El orden de mayor a menor actividad de acuerdo a la concentración efectiva de inhibición 50 (CE₅₀) fue laherradurina ($0.16\ \mu\text{M}$), la doxorubicina ($0.18\ \mu\text{M}$) y la cherimolina-2 $1.6\ \mu\text{M}$) (Figura 3.1.5).



	Concentración de los compuestos (µM)						
	0.00016	0.0016	0.016	0.16	1.6	16	32
Laherradurina	29.03	32.24	41.6	52.2	58.5	62	66.3
Cherimolina-2	28.5	33.6	37.1	39	48.9	57.8	72.2
Doxorubicina	0.00018	0.0018	0.018	0.18	1.8	18	36.8
	10	17.4	34.4	51.1	60.1	65.5	69.4

Figura 3.1.5 Actividad de los compuestos en las células Ca Ski.

Actividad en las células del carcinoma de cervix SiHa

La mayor actividad sobre la línea neoplásica SiHa, la presentó laherradurina con una CE_{50} de 0.16 µM y cuyo valor es 50 veces menor al mostrado por la cherimolina-2 (aproximado a 7.5 µM) y la doxorubicina (aproximado a 9 µM).

Todas las concentraciones molares de laherradurina tuvieron efectos inhibitorios significativos ($P \leq 0.05$) y aún la más baja fue capaz de mantener un 34.5 % de inhibición en la proliferación celular. La cherimolina-2 y la doxorubicina mostraron efectos similares en el rango analizado, observándose que su actividad disminuyó notablemente a molaridad baja; así, estos compuestos tuvieron un 16 y 15 % de efecto inhibitorio a 0.00016 y 0.00018 µM respectivamente; la menor

concentración molar con efectos inhibitorios significativos fue 0.016 de cherimolina-2 y de 0.018 de doxorubicina.

A molaridad alta, los tres compuestos presentaron una actividad semejante sobre las células SiHa (Figura 3.1.6).

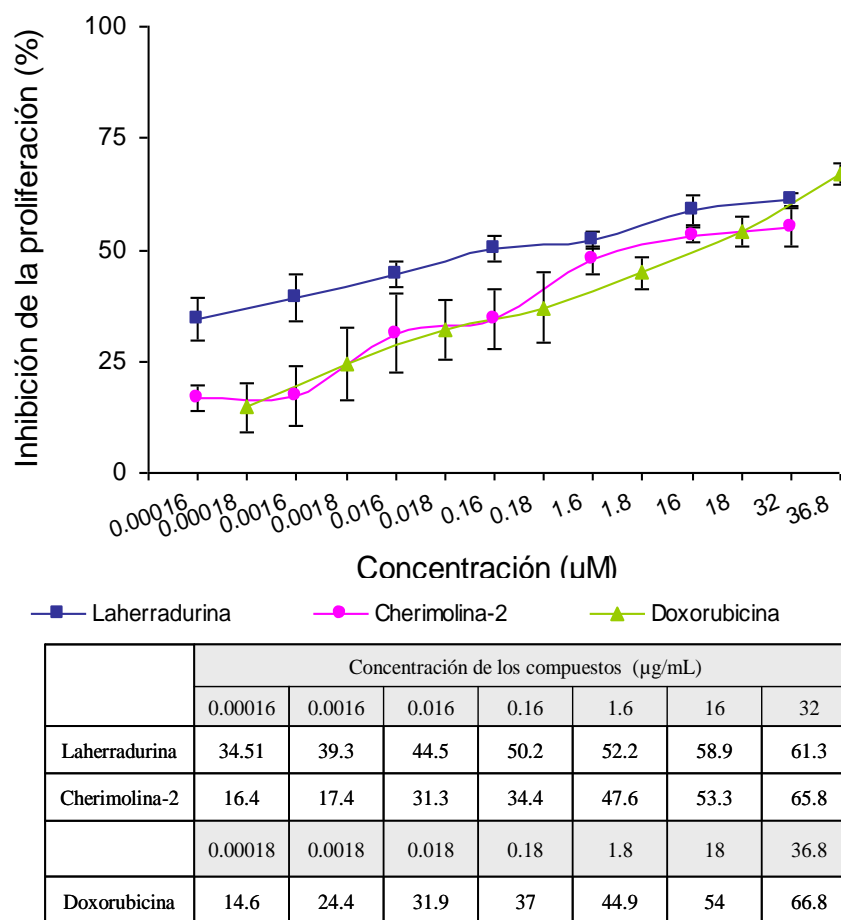


Figura 3.1.6. Actividad de los compuestos en las células SiHa.

Actividad en las células del carcinoma mamario MCF-7

Laherradurina fue el compuesto con la mayor actividad inhibitoria sobre la proliferación de las células MCF-7 y en donde todas las concentraciones molares analizadas tuvieron efectos significativos ($P \leq 0.05$)

La cherimolina-2 a concentración de 0.00016 μM indujo una reducción de 13 % en la proliferación celular y la molaridad más baja con actividad significativa fue de 0.0016 μM ; cuando este compuesto se añadió a los microcultivos celulares a 31.4 μM , su actividad fue cercana a la exhibida por laherradurina. Por su parte 0.00018 μM de doxorubicina provocó el 16 % de inhibición de la proliferación de las células MCF-7 en tanto que 0.0018 μM fue la concentración menor con actividad significativa ($P \geq 0.05$);

El orden de mayor a menor actividad de los compuestos de acuerdo a la CE_{50} encontrada fue de 0.016 μM de laherradurina, mayor de 0.16 μM de cherimolina-2 y menor de 9 μM de doxorubicina (Figura 3.1.7).

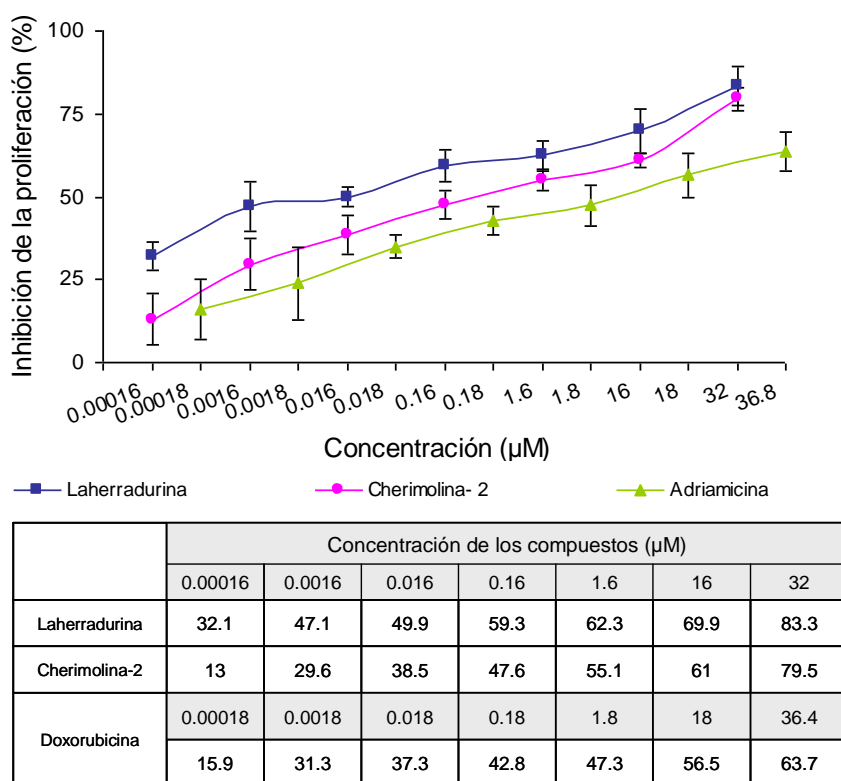
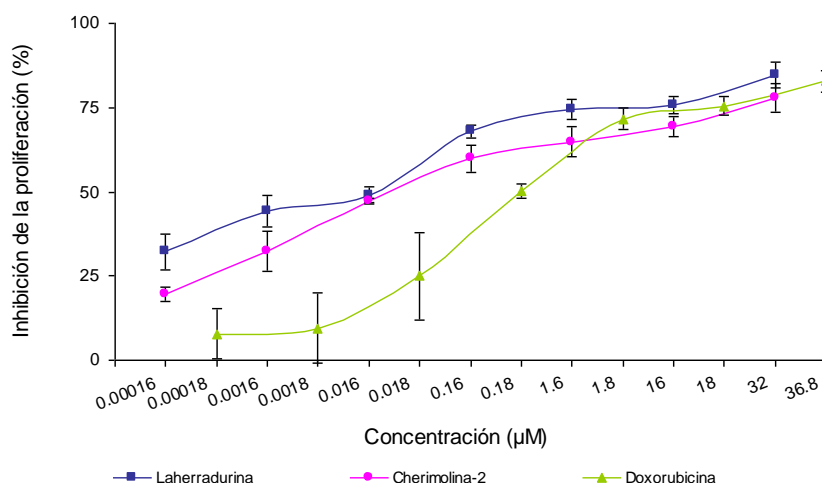


Figura 3.1.7. Actividad de los compuestos en las células MCF-7.

Actividad en las células de adenocarcinoma de cervix HeLa

En la línea celular cérvico-uterina HeLa, laherradurina fue más activa con valores de inhibición en la proliferación celular significativos en todas las concentraciones molar utilizada ($P \leq 0.05$). Así, 0.00016 μM de laherradurina tuvo un efecto inhibitorio de 32 %, en tanto que 32 μM originó el 85 %. Su CE_{50} fue cercana a 0.024 μM . Con valores inferiores se encontró la acción de la cherimolina-2 con reducciones significativas ($P \geq 0.05$) en la concentración de 0.0016 μM ; inhibió 20 % la proliferación a 0.00016 μM y del 80 % a 31.4 μM ; su CE_{50} puede situarse próxima a 0.078 μM (Figura 3.1.8).



	Concentración de los compuestos ($\mu\text{g/mL}$)						
	0.00016	0.0016	0.016	0.16	1.6	16	32
Laherradurina	32.3	44.2	49.1	67.9	74.4	75.7	84.7
Cherimolina-2	19.5	32.2	43.6	59.8	64.8	69.3	77.9
Doxorubicina	0.00018	0.0018	0.018	0.18	1.8	18	36.8
	7.8	9.5	24.9	50.2	71.6	75.5	82.2

Figura 3.1.8. Actividad de los compuestos en las células HeLa.

La doxorubicina con una CE_{50} de 0.18 μM , indujo una buena inhibición de la proliferación celular y semejante a las ACG cuando se añadió a los microcultivos celulares en concentraciones molares altas (36.8 μM / 82.2 % de reducción de la proliferación), pero su actividad decayó notablemente en molaridades bajas; así,

0.00018 μM del fármaco solo tuvieron un 7.8 % de efecto inhibitorio; la molaridad con efectos significativos de inhibición ($P \geq 0.05$) fue de 0.18 μM o mayores.

Actividad en las células del adenocarcinoma colorectal SW-480

En la línea celular SW-480, la actividad inhibitoria de las ACG fue superior al exhibido por la doxorubicina. Laherradurina fue el compuesto más activo con una CE_{50} cercana a 0.024 μM ; redujo 27.1% la proliferación celular con 0.00016 μM y de 80.5% a 32.0 μM ; la menor concentración de esta ACG que tuvo un efecto significativo fue de 0.0016 μM ($P \geq 0.05$).

Por su parte la cherimolina-2 presentó una actividad menor y una CE_{50} cercana a 0.78 μM ; mantuvo una inhibición de la proliferación de 10 % a la concentración de 0.00016 y del 76 % de a 32 μM ; la menor concentración que tuvo un efecto significativo ($P \geq 0.05$) fue de 0.016 μM (Figura 3.1.9).

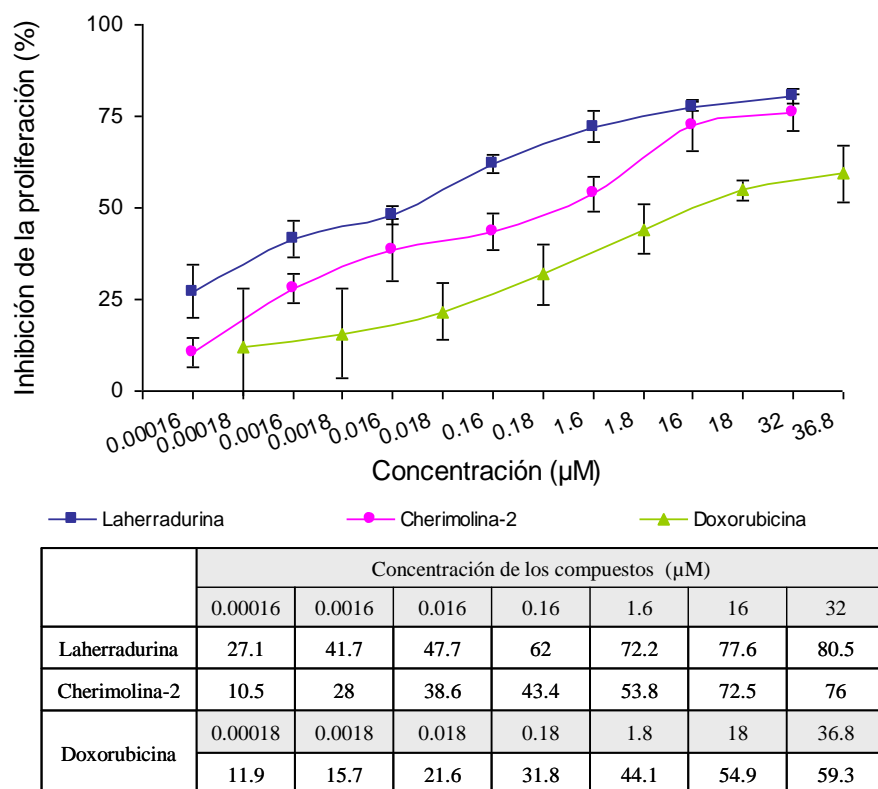


Figura 3.1.9 Actividad de los compuestos en las células SW-480.

La CE₅₀ de la doxorubicina fue aproximado de 9 μM y solo inhibió el 59.3 % a 36.8 μM ; la concentración molar más baja con efecto significativo fue 0.18 μM ($P \geq 0.05$).

Un resumen de las dosis efectiva media de los compuestos en las líneas cancerosas humanas en concentraciones molares (μM) y de peso ($\mu\text{g/mL}$), se presentan a continuación (Cuadro 3.1.7).

Cuadro 3.1.7 Dosis efectiva media (CE50) de las ACG y doxorubicina sobre las líneas celulares neoplásicas humanas.

Línea celular	Concentración del compuesto					
	Laherradurina		Cherimolina-2		Doxorubicina	
	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$
Ca Ski	0.16	0.1	1.6	1	0.18	< 0.1
SiHa	0.16	0.1	7.5	5	9	5
MCF-7	0.016	0.01	0.16	0.1	< 9	5
HeLa	0.024	0.015	0.078	0.05	0.18	0.1
SW-480	0.024	0.015	0.78	0.5	9	5

3.1.6.2 Susceptibilidad de las líneas celulares neoplásicas en función del tiempo de exposición a laherradurina, cherimolina-2 y doxorubicina

En general, las células presentaron una inhibición de la proliferación celular que se profundizó a medida que el tiempo de exposición a las ACG se incrementó.

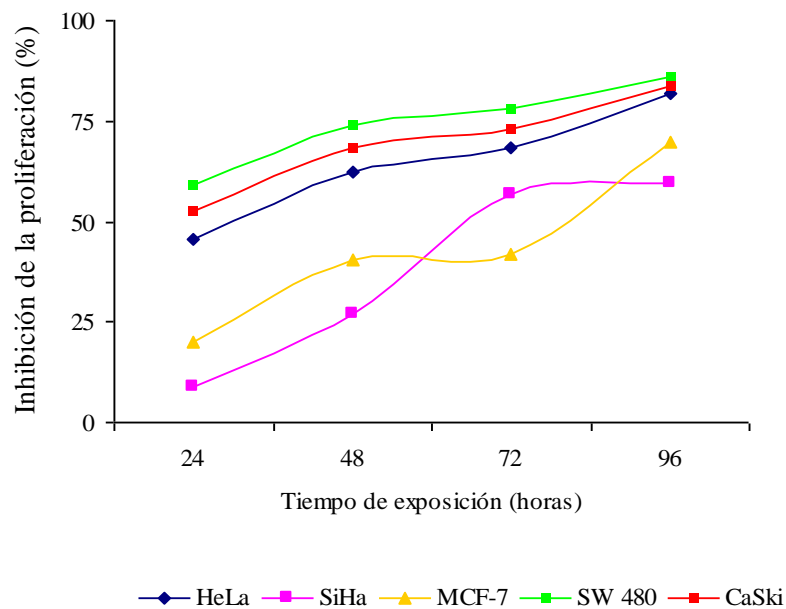
Efecto de 1.6 μM de laherradurina.

A las 24 h de exposición, las línea celulares presentaron una susceptibilidad heterogénea en donde la inhibición de la proliferación varió desde el 9 (SiHa) hasta el

59 % (SW-480), y aunque la diferencia entre los valores fue menor al finalizar el tratamiento, también se observó variaciones importantes en la respuesta celular.

La inhibición de la proliferación de las líneas celulares HeLa, CasKi y SW-480 muestran un comportamiento casi paralelo durante todo el periodo de exposición y en donde en las primeras 24 h la inhibición fue alrededor del 50 % para terminar cercano al 85 %.

La línea MCF-7 presentó un periodo estable en su proliferación entre las 48 a 72 h de tratamiento durante el cual, la acción inhibitoria de la acetogenina no se incrementó (aprox.40% de inhibición); sin embargo al aumentar el tiempo de exposición a 96 h la reproducción celular fue nuevamente inhibida hasta ser cercana al 70%.



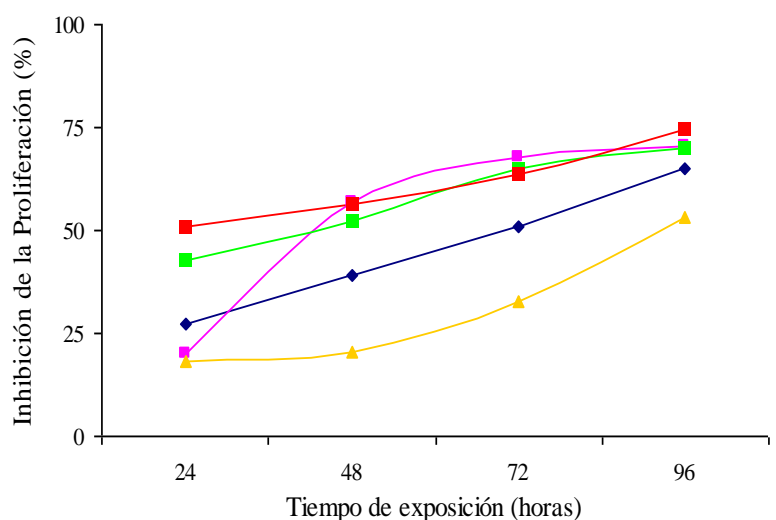
	Tiempo de exposición a laherradurina (horas)			
	24	48	72	96
HeLa	45.7	62.4	68.1	81.7
SiHa	8.8	26.8	56.9	59.6
MCF-7	20	40.5	42	69.6
SW-480	59	74	78.3	86.2
CaSki	52.8	68.2	73.3	83.8

Figura 3.1.10 Efecto del tiempo de exposición a 1.6 μ M de laherradurina.

La línea SiHa es posiblemente la menos susceptible lo que se refleja en el poco efecto que tiene la herradura hasta las 48 h y la proliferación estable que muestra entre las 72 a 96 h; así, al final el tiempo de exposición, únicamente presentó un 60% de inhibición con relación a sus controles (Figura 3.1.10).

Efecto 1.56 μ M de la cherimolina-2.

La susceptibilidad de las líneas celulares a la exposición de 1.56 μ M de cherimolina-2 por diferentes periodos de tiempos muestra también diferencias importantes (figura 3.1.11). La línea con la menor susceptibilidad fue MCF/7, la cual solo disminuyó su proliferación en un 18 % a las 24 h y cerca de 53 % a las 96 h. En contraste, las otras líneas celulares tuvieron inhibiciones finales entre 65 y 75 %.



	Tiempo de exposición a la cherimolina-2 (horas)			
	24	48	72	96
HeLa	27.1	39	51	65.1
SiHa	20	57	67.7	70.6
MCF-7	18.3	20.4	32.6	53.2
SW-480	42.5	52.5	65	70
CaSki	50.8	56.5	63.5	74.5

Figura 3.1.11 Efecto del tiempo de exposición a 1.56 μ M de cherimolina-2.

Las células SW-480 y CasKi tuvieron un comportamiento semejante durante el periodo de exposición iniciando con una inhibición de la proliferación de 42 y 51 % a las 24 h y finalizando con 70 y 74 % a las 96 h respectivamente.

Las células HeLa presentaron una reducción de la proliferación de forma intermedia y cuyos valores fueron del 27 % a las 24 h de exposición y se incrementó de manera casi lineal hasta 65 % al final del tratamiento.

El efecto inhibitorio de la cherimolina-2 en las células SiHa se inició con un 20 % de reducción de la proliferación durante las primeras 24 h y aumentó casi tres veces (57 %) a las 48 h; después de este tiempo y hasta finalizar el tratamiento, la acción de la acetogenina solo se incrementó un 13 % adicional terminando en 70 %.

Efecto de 1.8 μ M de doxorubicina.

El porcentaje de reducción en la proliferación de las líneas celulares por efecto de 1.8 μ M de doxorubicina fue muy variable dentro de las primeras 24 h y se presentó con una amplitud desde el 7.4 % en las células SW-480 hasta 50 % en las células HeLa. A pesar de ello, al final del tratamiento todas convergen en valores cercanos entre el 75 % y 82 % de inhibición de la proliferación.

La línea celular MCF-7 mostró entre las 48 h a las 72 h, un periodo de proliferación estable en donde la acción del fármaco no se intensificó; sin embargo al prolongarse el tiempo de exposición, la sensibilidad al fármaco se recuperó llegando a disminuir hasta el 78 % al finalizar el tratamiento.

Un efecto semejante fue observado en las células SiHa aunque a tiempos más tempranos. Así, durante 24 y las 48 h de exposición, el efecto de la doxorubicina se incrementó en solo 4% y es a partir de ese tiempo que la actividad inhibitoria del compuesto fue realmente observada hasta llegar al 81.2 % de reducción de la proliferación (Figura 3.1.12).

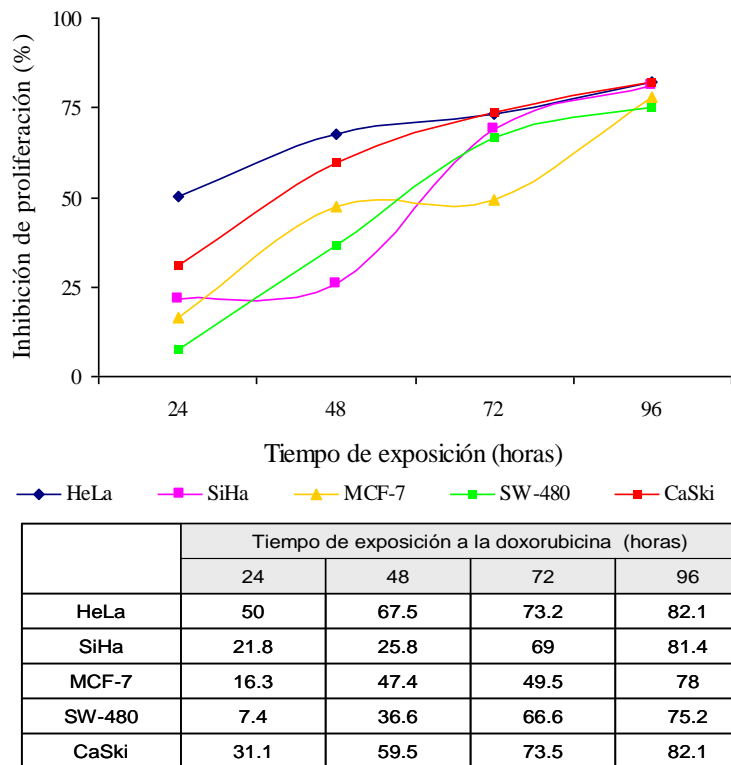


Figura 3.1.12 Efecto del tiempo de exposición a 1.8 μM de doxorubicina.

3.1.7 Análisis de los resultados

La característica esencial de las células cancerosas es su crecimiento incontrolado; las causas que conducen a ello son mutaciones acumulativas que impiden la verificación necesaria en los sitios de control de la división celular; los tumores se derivan de un precursor único (crecimiento clonal), sin embargo la inestabilidad genética que caracteriza a las células, propicia la generación de mutaciones adicionales que lleva a la formación de poblaciones con características genotípicas heterogéneas dentro del mismo tumor. Esto hace que en un sentido estricto, cada “cáncer” sea diferente (Cotran *et al.*, 1999).

Las líneas celulares neoplásicas utilizadas en los ensayos de proliferación, provienen de diferentes eventos de carcinogénesis por lo que diversos genes pueden

estar siendo expresados y/o suprimidos, aún en las líneas que provienen de un mismo órgano como el caso de HeLa, CaSki y SiHa que son carcinomas del cuello uterino. Ante esta situación, no es sorprendente que su sensibilidad a los diferentes fármacos sea heterogénea.

Numerosos autores han reportado que la actividad de las acetogeninas sobre las líneas neoplásicas es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición, y que muchos de los cambios morfológicos y bioquímicos observados, incluyendo la inducción de la muerte celular programada o apoptosis, se presentan a una adecuada concentración y después de un periodo de incubación (Oberlies, 1995; Zhu *et al.*, 2002; Chiu *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2006).

En nuestros ensayos, se observó que todas las líneas celulares neoplásicas fueron sensibles en diferente grado a los compuestos y la reducción de la proliferación fue dependiente de la concentración y del tiempo de exposición.

La proliferación de las células CaSki fue inhibida prácticamente por igual cuando los compuestos se añadieron a altas molaridades; sin embargo a concentraciones menores, las acetogeninas tuvieron un efecto inhibitorio casi tres veces superior al de la doxorubicina. Además esta línea celular fue afectada seriamente en las primeras 24 h cuando se expuso a 1.6 μM de laherradurina y 1.56 de cherimolina-2 (cerca de 50 % de reducción) en relación al control.

El compuesto mas activo en las células SiHa fue laherradurina la cual aún a 0.00016 μM , mostró la capacidad de inhibir cerca del 35% de la proliferación de esta línea celular. En los ensayos con tiempos de exposición variable a las ACG y doxorubicina, las células presentaron en algún momento poca sensibilidad a los inhibidores y su reproducción fue poco afectada.

Las células MCF-7 redujeron su proliferación de manera casi paralela en presencia de las diferentes concentraciones de las moléculas probadas, siendo laherradurina el compuesto de mayor actividad. Estas células fueron poco sensibles a la acción de 1.6 μM de las acetogeninas durante las primeras horas de tratamiento

y no presentaron reducción de su proliferación durante el periodo de 48 a 72 h de tratamiento.

Una de las líneas de células cancerosas más conocida es HeLa, en donde a las 48 h de exposición, 1.8 μM de doxorubicina tiene poco efecto sobre ellas; por el contrario, las ACG presentaron una actividad adecuada aún en la menor concentración molar utilizada (laherradurina 32 % y cherimolina de 20 % de inhibición de proliferación celular). En los ensayos con diferentes tiempos de exposición, durante las primeras 24 h la capacidad proliferativa de las células se redujo en cerca de 50 % con 1.6 μM de laherradurina y 1.8 μM de doxorubicina, y solo el 24 % por 1.56 μM de cherimolina-2.

En la línea celular SW-480, las dos ACG en el rango de concentración molar utilizado, mostraron efectos inhibitorios paralelos en su proliferación, siendo laherradurina la más activa. En los ensayos a diferentes tiempos, su sensibilidad a 1.6 μM de laherradurina fue la más alta, iniciando con 59 % de reducción en la proliferación a las 24 h y terminando con 86% a las 96 h; fue la línea celular más sensible a la cherimolina-2 después de las células Ca Ski, aunque por el contrario el efecto de 1.8 μM de doxorubicina en función del tiempo de exposición fue de los menores.

La doxorubicina (adriamicina) ha sido ampliamente utilizada para comparar la actividad anticancerígena de otros compuestos, debido a que su mecanismo de acción ha sido bien estudiado y especialmente porque es uno de los medicamentos más prescritos en el control del cáncer. El efecto inhibitorio de las acetogeninas en las líneas cancerosas expresado como concentración efectiva media (CE_{50}), es reportado frecuentemente como superior a la de algunos fármacos antitumorales incluyendo el mencionado y los coordinados de *cis* platino (Ahammadsahibb *et al.*, 1993; Cavè *et al.*, 1997).

En concordancia con lo anterior, las acetogeninas aquí analizadas, fueron más activas que la doxorubicina; en especial laherradurina que indujo buenos efectos inhibitorios a molaridades bajas (Cuadro 5.6); esta molécula también tuvo los

porcentajes de reducción de la proliferación mas altos en los diferentes tiempos de exposición y particularmente en las células HeLa, Ca Ski y SW-480 (Figura 5.10).

En general se considera que las acetogeninas bis-THF adyacentes son mas activas que las no adyacentes (Oberlies *et al.*, 1995) y aunque aun no se conocen con precisión los factores estructurales de la molécula que están involucrados en su potencia, se presume que el largo de 13C de la cadena alifática espaciadora que une el sistema THF y la lactona terminal es uno de ellos (Miyoshi *et al.*, 1998; Takada *et al.*, 2000; Motoyama *et al.*, 2002; Abe *et al.*, 2005). Nuestros resultados concuerdan con estos lineamientos ya que la laherradurina con esta longitud en la cadena espaciadora, fue más potente que la cherimolina-2 y cuya cadena espaciadora es de 11C.

En los ensayos con diferentes tiempos de exposición, las células SiHa y MCF-7 presentaron en algún momento una proliferación estable en donde la acción inhibitoria de los compuestos no parece incrementarse con el tiempo; gráficamente se observa como una “meseta” en la curva de proliferación. Esta estabilidad ha sido señalada en líneas cancerosas expuestas a diferentes concentraciones de acetogeninas y cuya concentración “critica” fue variable para cada compuesto (Nakanishi *et al.*, 2003); sin embargo este fenómeno no se observa en las células con mecanismos de resistencia a los fármacos en las que la inhibición de la proliferación es cada vez mayor a medida que se aumenta la concentración de la ACG. Los autores fundamentan esta diferencia en la expresión de los mecanismos de resistencia, los cuales al ser dependientes de ATP, incrementarían los requerimientos energéticos celulares, siendo por ello inconvenientes en las células expuestas a las ACG (Oberlies *et al.*, 1997; Raynaud *et al.*, 1999).

La resistencia a las acetogeninas aún no ha sido documentada pero es posible que la estabilidad de la proliferación pudiera reflejar un mecanismo de salvamento temporal de las células, entre ellos, un aumento en la glicólisis anaerobia característico de algunas células tumorales (Lu *et al.*, 2002) y que al aumentar los tiempos de exposición éste sea finalmente rebasado.

3.1.8 Conclusiones

- Las acetogeninas laherradurina y cherimolina-2 así como el fármaco antitumoral doxorubicina, tienen actividad inhibitoria sobre la proliferación celular de las 5 líneas neoplásicas y este efecto fue mayor al aumentar la concentración de los compuestos o el tiempo de exposición.
- La concentración efectiva 50 (CE_{50}) de las acetogeninas fue variable en las líneas neoplásicas analizadas.
- La laherradurina fue el compuesto mas activo en las células neoplásicas analizadas presentando una CE_{50} en el rango de 0.1 a 0.01 μ M.
- Con excepción de la línea celular Ca Ski, la cherimolina-2 presentó valores de CE_{50} menores o iguales a la doxorubicina.

3.2 Efecto de la laherradurina y cherimolina-2 en el desarrollo de los tumores inducidos en ratones atómicos de dos líneas neoplásicas.

3.2.1 Descripción

Se analizó uno de los aspectos esenciales que define si una molécula puede ser considerada en el desarrollo de nuevos fármacos. Su actividad sobre las células blanco vs los efectos negativos que puede desarrollar en los organismos receptores. En el caso de la administración de las acetogeninas, esto es un aspecto crucial debido a que su mecanismo inhibitorio sobre el complejo I pudiera suscitar niveles reducidos de ATP en las células normales, impidiendo su buen funcionamiento. Así, es importante que las dosis terapéuticas se encuentren lejos de las nocivas.

Ratones atómicos implantados con células HeLa y SW-480 recibieron durante 20 días diferentes dosis de acetogeninas o doxorubicina (adriamicina, doxolem®), siendo la dosis inicial, la correspondiente al número de micromoles de acetogenina contenidos en la CE_{50} de los ensayos de proliferación multiplicados por gramo de peso del animal ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$). Los resultados se sometieron a un análisis estadístico de varianza (ANDEVA) de una cola y la prueba *a posteriori* de Bonferroni.

3.2.2 Origen y manejo de los ratones atómicos

Los ratones atómicos con tres semanas de edad y peso aproximado de 15 g se obtuvieron del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubiran” de la Cd. de México, D.F. Los ratones se mantuvieron en microaisladores a temperatura de 22 ± 2 °C, y ciclos de luz de 12 horas. Debido a su susceptibilidad a las infecciones se les proporcionó alimento, agua y cama de aserrín estériles. Todo el manejo fue realizado en las mayores condiciones de asepsia o de esterilidad posibles.

3.2.3 Selección de las líneas tumorales

Como ya se mencionó todas las líneas tumorales presentaron inhibiciones en su proliferación importantes al ser expuestas a las acetogeninas, sin embargo se

seleccionaron las líneas de carcinoma de cervix HeLa y colorectal SW-480 para ser implantadas en los ratones atímicos por las siguientes razones:

1. El efecto de las concentraciones molares bajas de la acetogenina con mayor actividad (laherradurina) fue alto y la concentración efectiva media (CE₅₀) en ambos tipos celulares es de igual magnitud.
2. La concentración efectiva media (CE₅₀) de la acetogenina de menor actividad (cherimolina-2) fue baja.
3. Los porcentajes de reducción de la proliferación a los diferentes tiempos fueron semejantes y no presentaron periodos de estabilidad a la exposición de las acetogeninas.
4. Producen tumores sólidos y de tamaño adecuado que pueden ser medidos durante el transcurso del ensayo.

Un resumen del efecto de las acetogeninas en las células de cervix HeLa y colorectal SW-480 se presenta en el siguiente cuadro 6.1

Cuadro 3.2.1. Efecto de las acetogeninas en las células tumorales de cervix HeLa y colorectal SW-480.

			Porcentaje de inhibición de la proliferación a la concentración de:	
Acetogenina	Línea tumoral	DE ₅₀ (μM)	0.00016 μM	32 μM
Laherradurina	HeLa	0.024	32.3	84.7
	SW-480	0.024	27.1	80.5
Cherimolina-2	HeLa	0.078	19.5	78
	SW-480	0.8	11	76

En ambas líneas, la reducción de la proliferación con 1.6 μ M de laherradurina fue cercana al 50 % en las primeras 24 h y del 85 % a las 96 h; con la cherimolina-2, aunque en diferente magnitud, la reducción se presentó gráficamente de manera paralela.

En ensayos previos se corroboró que estas líneas cuando son implantadas en ratones atímicos, desarrollan tumores sólidos y de tamaños adecuados en un periodo de dos semanas, lo cual fue un factor esencial para su utilización.

3.2.4 Método

El flujo de actividades se presenta en la Figura 3.2.1.

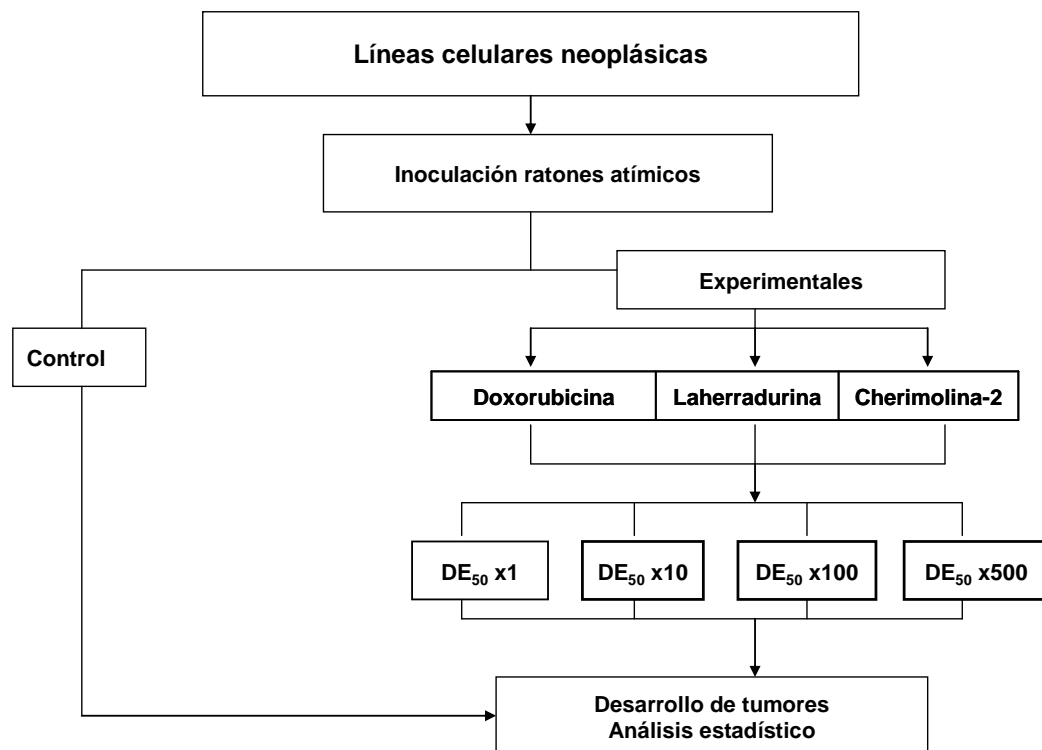


Figura 3.2.1 flujograma para la evaluación de los tumores inducidos en ratones atímicos.

3.2.4.1 Inoculación de células neoplásicas a ratones atímicos

Las células fueron implantadas a los ratones atímicos 24 horas antes del inicio del tratamiento mediante el siguiente procedimiento:

1. Las células fueron cosechadas de un cultivo durante su fase exponencial de crecimiento con 0.25 % (v/v) tripsina- 0.53 mM EDTA en solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) de acuerdo a lo descrito previamente.
2. Las células se lavaron por centrifugación y se resuspendieron en medio de cultivo completo.
3. Se contaron bajo el microscopio con una cámara de Neubauer y se estableció su porcentaje de viabilidad con el azul de tripán. Solo se utilizaron cultivos con una viabilidad mayor al 95 %.
4. Se ajustó el número deseado de células en un volumen de 200 μ l.
 - Línea de carcinoma de cervix HeLa. Inoculación 1×10^6 por ratón.
 - Línea de carcinoma de colon SW 480. Inoculación 5×10^6 células por ratón
5. La inoculación se realizó con la ayuda de jeringas de 1 mL, levantado la piel del lomo del ratón e inyectando las células subcutáneamente.

Después de 2 días fué posible observar una pequeña protuberancia subcutánea en el lugar de la inoculación, indicativo que las células cancerosas se implantaron correctamente.

3.2.4.2 Dosis de las acetogeninas administradas a los ratones atímicos

La dosis inicial se obtuvo a partir de la concentración efectiva media de cada acetogenina en los cultivos celulares, multiplicada por los gramos de peso del animal (μ moles g^{-1}) (1x). Las siguientes dosis se incrementaron 10, 100, y 500 veces a partir de la concentración inicial (10x, 100x y 500x). Con fines comparativos se utilizó la doxorubicina cuyas dosis se prepararon con igual cantidad en gramos a las utilizadas

en las dosis de las acetogeninas; sin embargo considerando la variación en el número de moléculas, sus concentraciones en moles se especifican. El número de micromoles de cada compuesto que se administró a los animales se describe en la sección correspondiente para cada línea celular.

Los compuestos se diluyeron antes de su administración en solución salina estéril a la concentración requerida y se inyectaron subcutáneamente en la base del tumor en un volumen de 100 μ L diariamente, por un periodo de 19 días.

3.2.4.3 Cálculo del tamaño (volumen) de los tumores

El tamaño de los tumores se midió cada 48 h desde el cuarto día de tratamiento con la ayuda de una regla milimétrica (Vernier) y se obtuvo su diámetro mayor y menor.

El cálculo de la masa tumoral (mm^3) se realizó aplicando la siguiente fórmula (Wang *et al.*, 2002):

$$\text{Volumen del tumor (mm}^3\text{)} = (a \times b^2) / 2$$

En donde a es el diámetro mayor y b es el diámetro menor de los tumores.

Los valores de los grupos tratados y del control fueron contrastados con el análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba *a posteriori* de Bonferroni, considerando una diferencia significativa si $P \leq 0.05$.

3.2.5 Resultados

A fin de tener mayor claridad del efecto de las ACG sobre el desarrollo de los tumores en los ratones atímicos, los resultados se muestran primero con la laherradurina y posteriormente con la cherimolina-2. Los resultados se presentan gráficamente para su mejor comprensión.

3.2.5.1 Efecto de laherradurina

Laherradurina fue la acetogenina con mayor actividad en los ensayos de proliferación *in vitro* y cuya CE_{50} fue igual en las líneas neoplásicas seleccionadas, por lo que las concentraciones administradas a los ratones atímicos implantados con estas líneas tumorales fueron las mismas

3.2.5.1.1 Efecto de laherradurina en el desarrollo de los tumores de células HeLa inducidos en los ratones atímicos

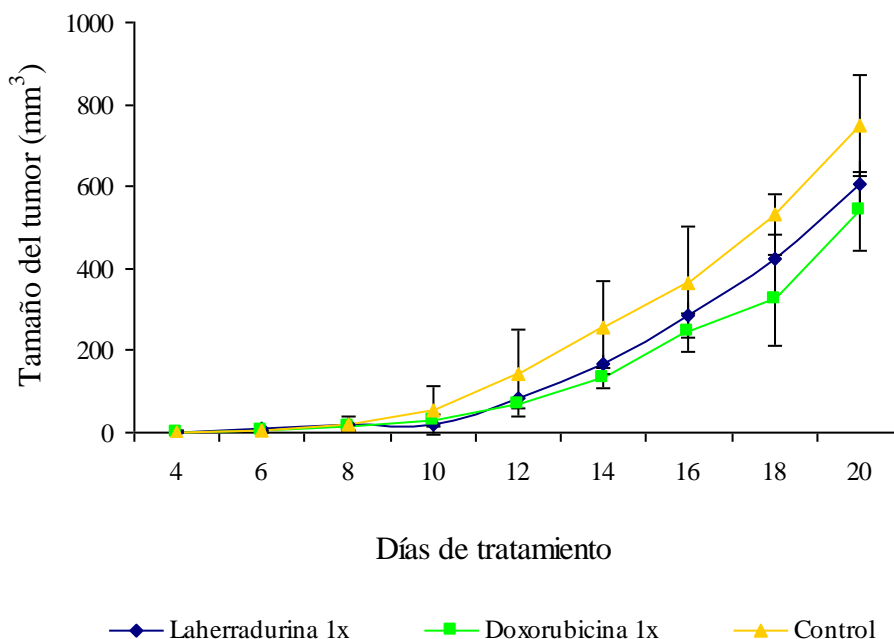
Los micromoles de laherradurina en las dosis empleadas así como los grupos de ratones atímicos implantados con células HeLa que las recibieron, se presentan a continuación (cuadro 3.2.2)

Cuadro 3.2.2. Dosis administradas de laherradurina y doxorubicina en los ratones implantados con células HeLa.

1 x 10 ⁶ células HeLa implantadas a ratones atímicos en el día 0. Las dosis se administraron por gramo de peso de los animales en un volumen final de 100 µL.			
	Concentración de los compuestos	No. de ratones atímicos	
		Laherradurina	Doxorubicina
DE50x1=	0.024 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de laherradurina 0.028 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de doxorubicina	5	4
DE50x10=	0.24 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de laherradurina 0.28 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de doxorubicina	5	4
DE50x100=	2.4 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de laherradurina 2.8 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de doxorubicina	5	4
DE50x500=	12 µmol día ⁻¹ de laherradurina 13.8 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de doxorubicina	5	4
DE50x1000=	24 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de laherradurina 28 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de doxorubicina	3	3
Solución salina (control de proliferación)		5	

Efecto de $0.024 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina. Dosis 1x.

La administración de la dosis inicial de laherradurina en los animales implantados con células HeLa, no tuvo efectos inhibitorios significantes sobre el crecimiento de los tumores. Al término del tratamiento, laherradurina redujo en promedio el 19 % del tamaño de ellos, en tanto que doxorubicina lo hizo en 28 % (tratados/controles). (Figura 3.2.2).

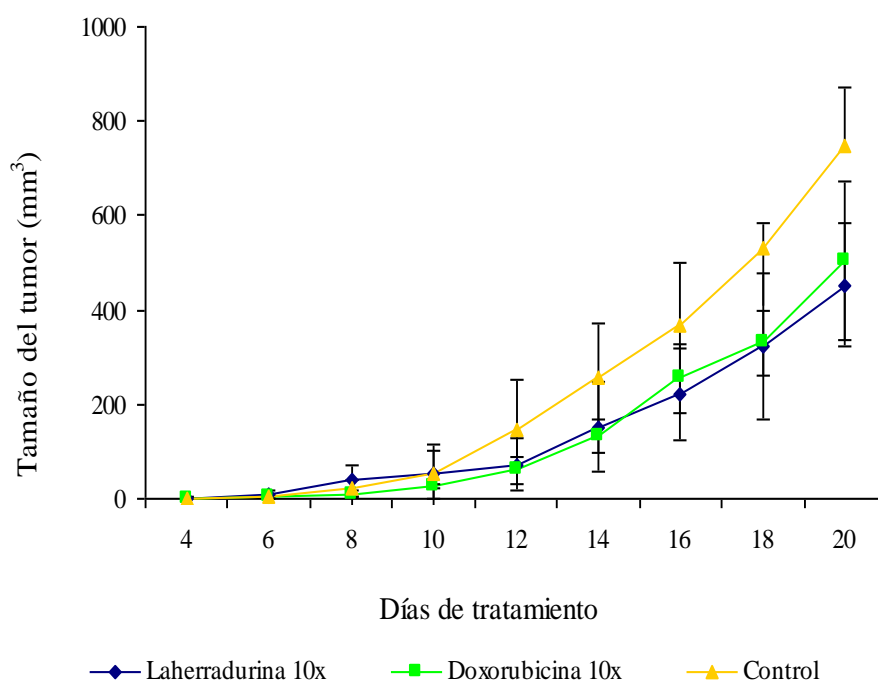


	Tamaño promedio de los tumores (mm^3) en los días de tratamiento								
	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Laherradurina 1x	1.3	9.3	21	21	83.3	167	284	422	605
Doxorubicina 1x	1.5	5.2	14	30	71	133	246	324	540
Control	1.6	5	21	54	144	257	366	533	750

Figura 3.2.2 Efecto de $0.024 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina y de $0.028 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células HeLa.

Efecto de $0.24 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina. Dosis 10x.

Los tumores de los animales tratados con $0.24 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina y de $0.28 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina se desarrollaron hasta el día 12 de manera semejante; a partir de ese momento, su crecimiento fue menor a los del grupo control. La reducción final fue de 39.6 % en el grupo tratado con laherradurina y de 33 % con la doxorubicina, siendo estadísticamente significativa para ambos compuestos en los días 18 y 20 ($P \leq 0.05$) (Figura 3.2.3).

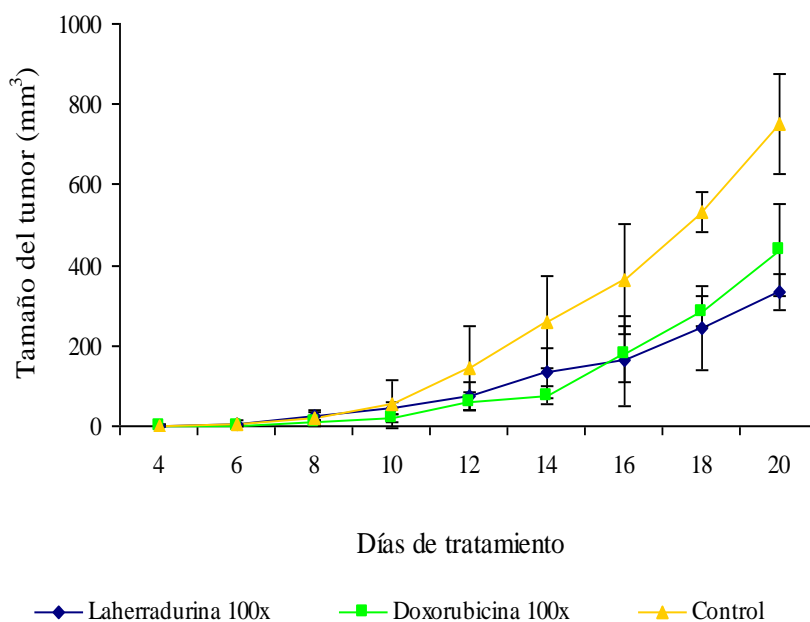


	Tamaño promedio de los tumores (mm^3) en los días de tratamiento								
	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Laherradurina 10x	-	11	39	51	73	152	222	322	452
Doxorubicina 10x	0.6	4	10	26	60	133	256	330	503
Control	1.6	5	21	54	144	257	366	533	750

Figura 3.2.3 Efecto de $0.024 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina y de $0.028 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células HeLa.

Efecto de $2.4 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina. Dosis 100x.

Los animales que recibieron $2.4 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina desarrollaron tumores de tamaño menor a partir del día 12 de tratamiento y cuya diferencia estadística con el grupo control se encontró a partir del día 16 ($P \leq 0.05$). Al final del estudio, el tamaño medio de los tumores del grupo tratado con esta acetogenina fue 24 % menor al del grupo tratado con doxorubicina y más de 53 % en relación al grupo control (Figura 3.2.4). Esta dosis corresponde a una concentración de laherradurina de 1.5 mg kg^{-1} de peso de los animales.

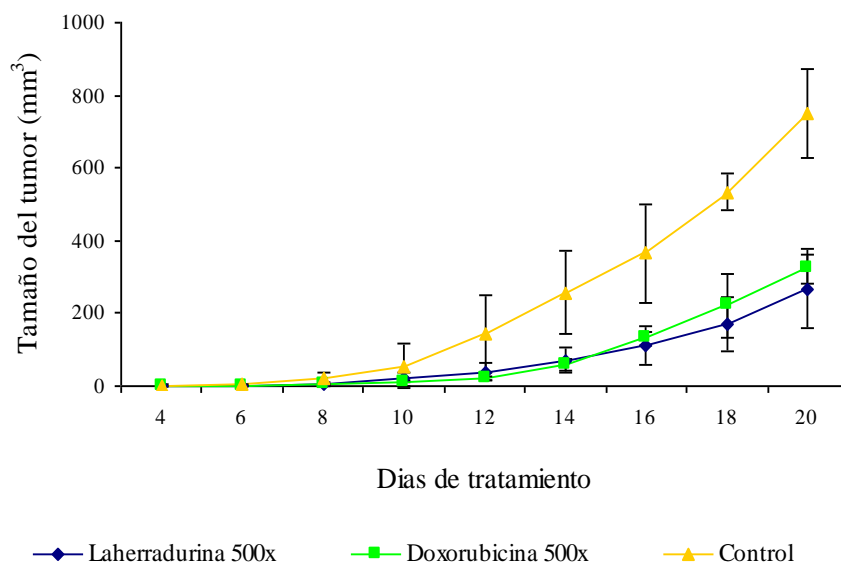


	Tamaño promedio de los tumores (mm^3) en los días de tratamiento								
	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Laherradurina 100x	-	7	26	46	74	132	163	244	332
Doxorubicina 100x	-	2	9	19	61	77	180	284	438
Control	1.6	5	21	54	144	257	366	533	750

Figura 3.2.4 Efecto de $2.4 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina y de $2.8 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células HeLa.

Efecto de $12 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina. Dosis 500x.

La administración de $12 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina en los ratones implantados con células HeLa tuvo efectos inhibitorios importantes sobre el desarrollo de los tumores con valores estadísticamente significativos a partir del 12^{avo} día de tratamiento y manteniendo esta diferencia hasta el término del tratamiento ($P \leq 0.05$). En el día 20, el tamaño medio de los tumores del grupo tratado con laherradurina fue 65 % menor en relación al grupo control y cerca de 20 % menor al del grupo tratado con doxorubicina (Figura 3.2.5).



	Tamaño promedio de los tumores (mm^3) en los días de tratamiento								
	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Laherradurina 500x	-	1.6	8	22	38	71	109	168	266
Doxorubicina 500x	1	1	4	8	22	57	130	225	323
Control	1.6	5	21	54	144	257	366	533	750

Figura 3.2.5 Efecto de $12 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina y de $13.8 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células HeLa.

La dosis de $24 \mu\text{moles g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina produce efectos indeseables en los animales. Dosis 1000x

Si bien el desarrollo de los tumores en los ratones fue mínimo con la administración de $24 \mu\text{moles g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina, los animales manifestaron a partir del cuarto día de tratamiento una pérdida importante de peso, inestabilidad en sus movimientos de y finalmente murieron (Figura 3.2.6). Por estas razones se decidió no continuar con concentraciones mayores.

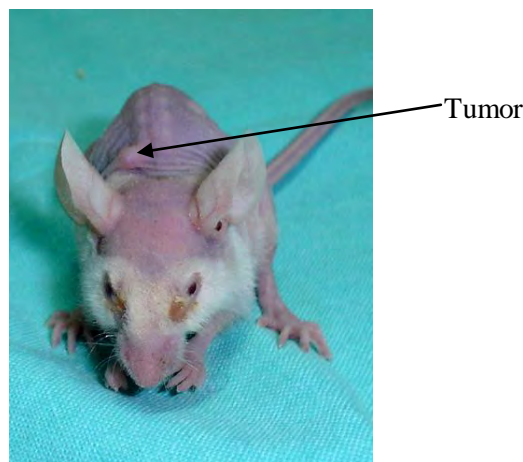
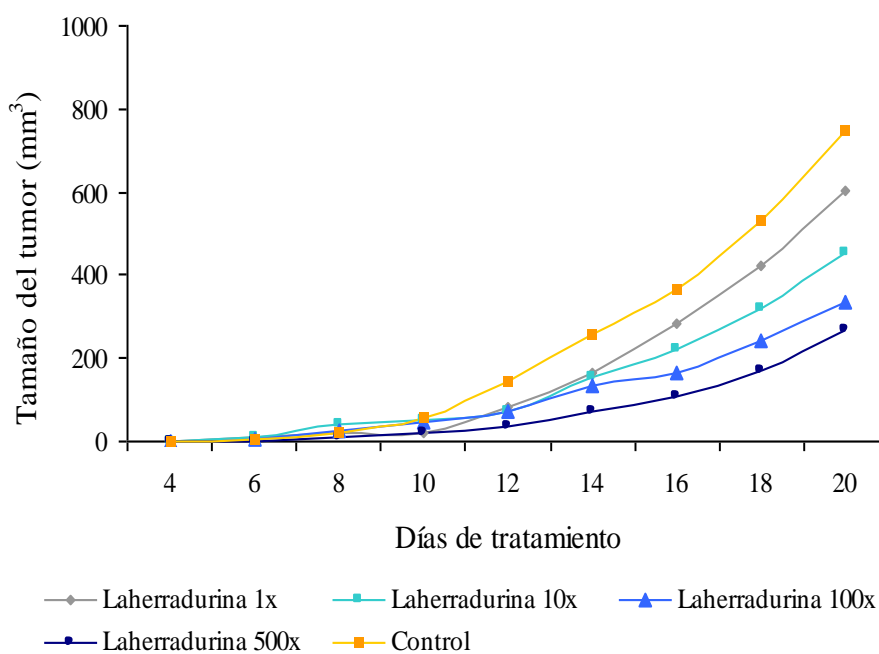


Figura 3.2.6 Efecto de $24 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina en los ratones atímicos.

Comparación de las dosis de laherradurina en el desarrollo de los tumores de células HeLa inducidos en ratones atímicos

El desarrollo de los tumores de células HeLa, fue dependiente de la dosis de laherradurina utilizada. Así, al aumentar el número de micromoles de acetogenina en las dosis administradas a los ratones atímicos implantados con las células Hela, el desarrollo de los tumores fue menor y las diferencias estadísticas son no solo al finalizar el tratamiento sino en tiempos cada vez más tempranos (Figura 6.7).



Dosis de laherradurina	Tamaño promedio de los tumores (mm ³) en los días de tratamiento								
	4	6	8	10	12	14	16	18	20
1x	1.3	9.3	21	21	83.3	167	284	422	605
10x	-	11	39	51	73	152	222	322	452
100x	-	7	26	46	74	132	163	244	332
500x	-	1.6	8	22	38	71	109	169	266
Control	1.6	5	21	54	144	257	366	533	750

Figura 3.2.7 Efecto comparativo de las dosis de laherradurina en el desarrollo de los tumores de células HeLa.

3.2.5.1.2 Efecto de laherradurina en el desarrollo de los tumores de células SW-480 inducidos en los ratones atímicos

Como se mencionó, los lotes de ratones implantados con células SW-480 recibieron dosis similares de laherradurina a las administradas en los animales con células HeLa. Cabe mencionar que el número de células implantadas fue mayor, aunque el tamaño de los tumores que se desarrolla es menor.

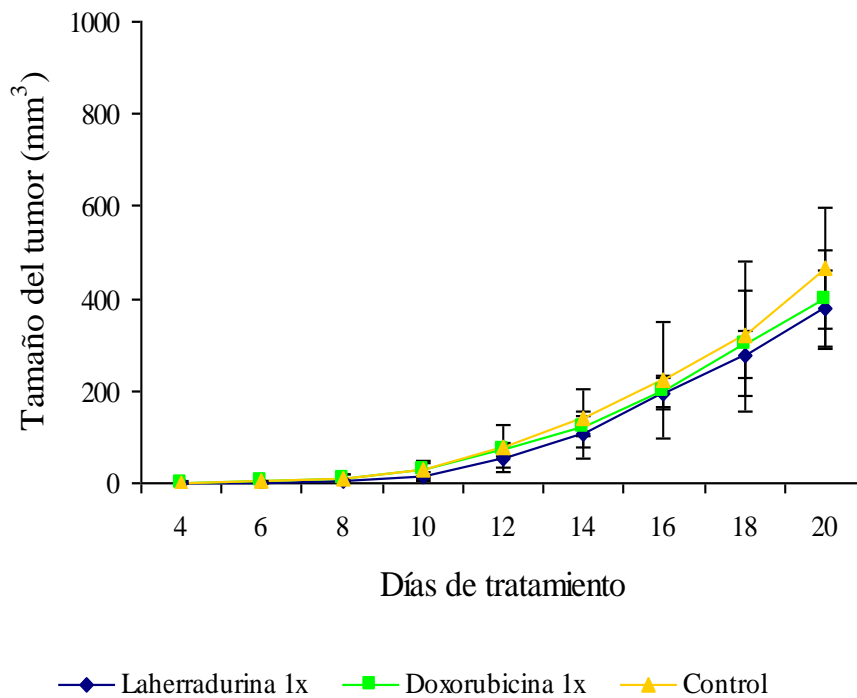
Las dosis y los grupos de ratones implantados con células SW-480 que las recibieron, se presentan a continuación (Cuadro 3.2.3).

Cuadro 3.2.3 Dosis administradas de laherradurina y doxorubicina en los ratones implantados con células SW-480.

5x 10 ⁶ células SW-480 implantadas a ratones atímicos en el día 0. Las dosis se administraron por gramo de peso de los animales en un volumen fina de 100 µL			
	Concentración de los compuestos	No. de ratones atímicos	
		Laherradurina	Doxorubicina
DE50x1=	0.024 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de laherradurina 0.028 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de doxorubicina	5	4
DE50x10=	0.24 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de laherradurina 0.28 µmol día ⁻¹ de doxorubicina	5	4
DE50x100=	2.4 µmoles g ⁻¹ día ⁻¹ de laherradurina 2.8 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de doxorubicina	5	4
DE50x500=	12 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de laherradurina 13.8 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de doxorubicina	5	4
Solución salina (control de proliferación)		5	

Efecto de $0.024 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina. Dosis 1x.

Al finalizar el tratamiento con la dosis inicial de $0.024 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina y de $0.028 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina, los animales mostraron una reducción promedio de los tumores de 19 % y 14 % respectivamente en comparación con el grupo control; estas diferencias no son estadísticamente significativas. (Figura 3.2.8).

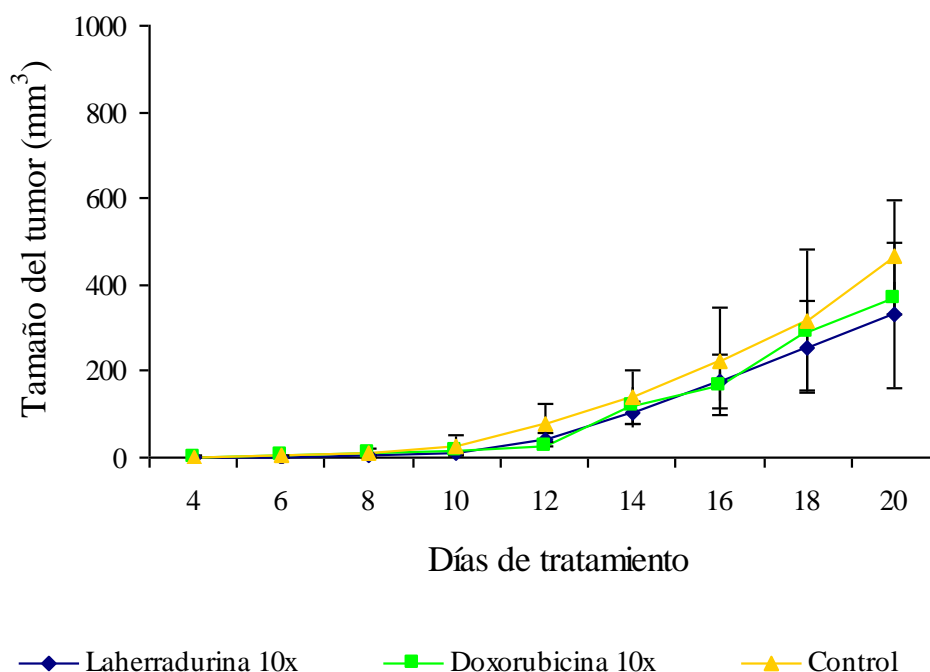


	Tamaño promedio de los tumores (mm^3) en los días de tratamiento								
	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Laherradurina 1x	1	2	6	16	52	105	192	279	377
Doxorubicina 1x	1	2	11	29	73	123	201	302	400
Control	1	4	11	28	80	140	223	319	466

Figura 3.2.8 Efecto de $0.024 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina y de $0.028 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células SW-480.

Efecto de $0.24 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina. Dosis 10x.

La administración de $0.24 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina o $0.28 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina produjeron efectos semejantes y ambos compuestos tienen un efecto inhibitorio en el desarrollo de los tumores especialmente al final del tratamiento. Si bien al término del ensayo, el valor medio de los tumores del grupo tratado con laherradurina fue 29 % menor al exhibido por el grupo control, las diferencias no fueron suficientemente grandes para ser significativas (Figura 3.2.9).

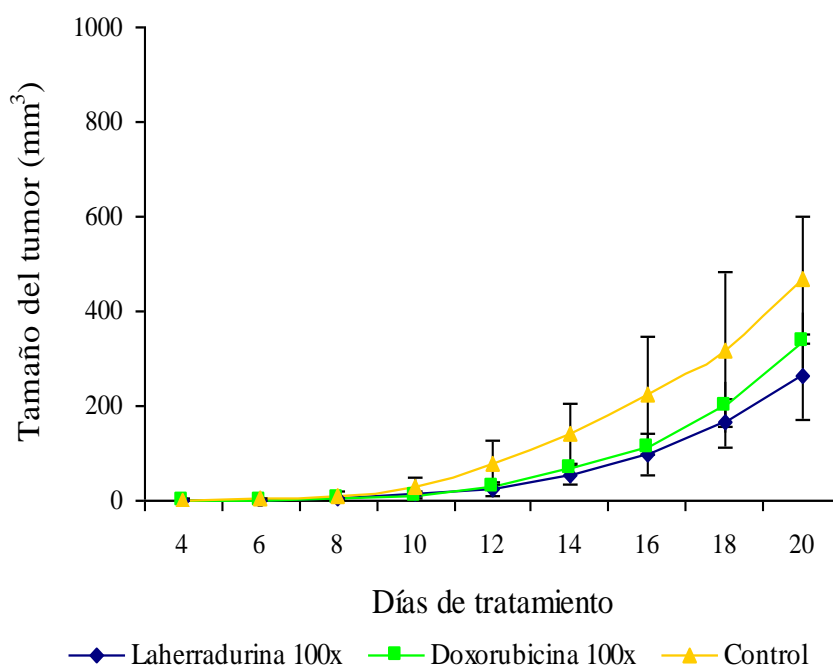


	Tamaño promedio de los tumores (mm^3) en los días de tratamiento								
	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Laherradurina 10x	1	1	3	8	42	103	177	254	331
Doxorubicina 10x	1	5	8	16	27	117	164	292	370
Control	1	4	11	28	80	140	223	319	466

Figura 3.2.9 Efecto de $0.024 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina y de $0.028 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células SW-480.

Efecto de $2.4 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina. Dosis 100x.

La administración en los animales de $2.4 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina, indujo un menor desarrollo de los tumores a partir del día 12, lo que se acentuó al continuar el tratamiento; las diferencias estadísticas significativa se encontraron en los días 18 y 20 ($P \leq 0.05$) (Figura 3.2.10). Al finalizar el tratamiento, los tumores del grupo tratado con laherradurina tuvieron un tamaño 44 % menor al del grupo control, en constaste con el 25 % menor en el grupo tratado con doxorubicina.

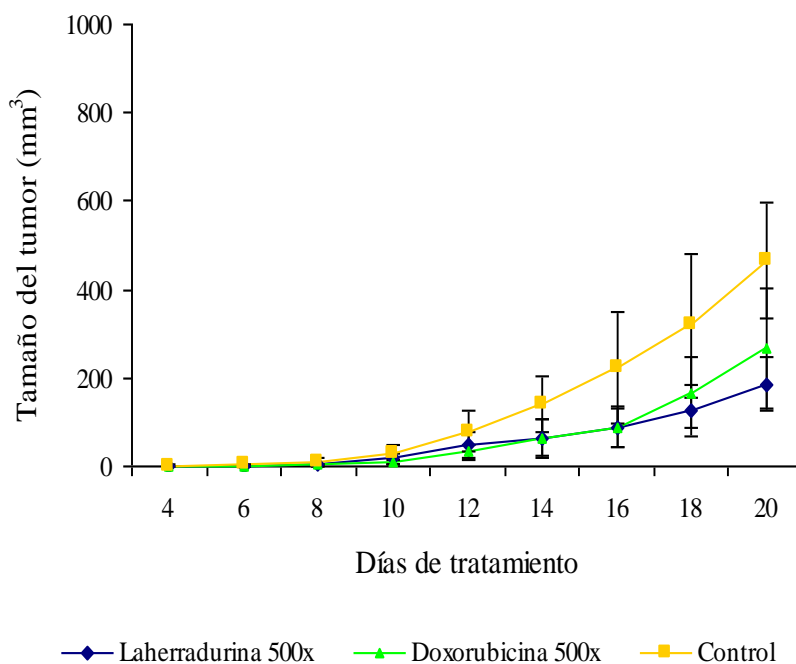


	Tamaño promedio de los tumores (mm^3) en los días de tratamiento								
	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Laherradurina 100x	-	1	3	14	24	53	97	164	261
Doxorubicina 100x	-	-	3.5	12	27	66	113	199	338
Control	1	4	11	28	80	140	223	319	466

Figura 3.2.10 Efecto de $2.4 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina y de $2.8 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células SW-480.

Efecto significativo $12 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina. Dosis 500x.

La reducción en el tamaño de los tumores fue evidente a lo largo del periodo de tratamiento con $12 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina. Las diferencias estadísticas en el tamaño de los tumores de los animales se encontraron a partir del día 14 y se mantuvieron hasta finalizar el tratamiento ($P \leq 0.05$). La reducción del valor medio de los tumores desarrollados por el grupo tratado con laherradurina fue cerca del 60% menor en relación al grupo control y de 30 % menor en relación al grupo tratado con doxorubicina (Figura 3.2.11).

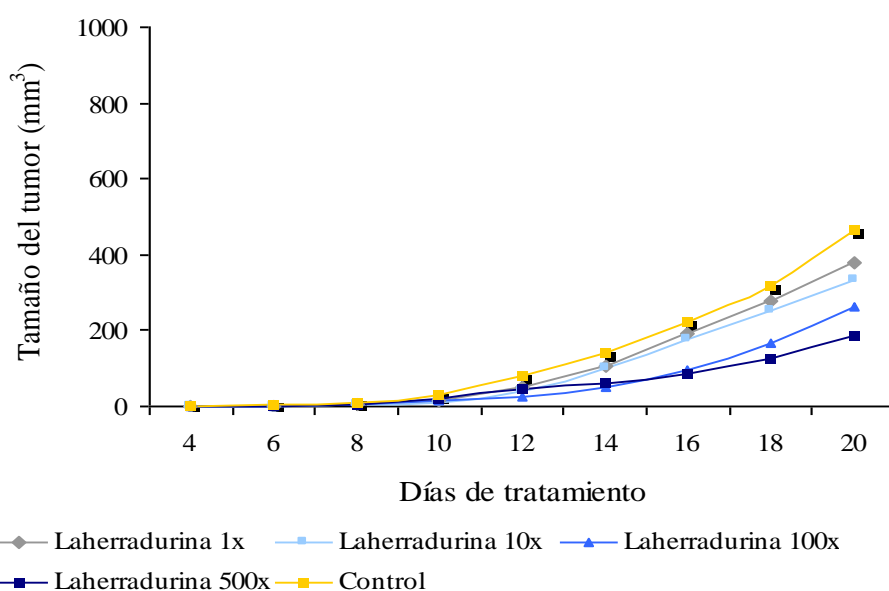


	Tamaño promedio de los tumores (mm^3) en los días de tratamiento								
	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Laherradurina 500x	-	1	4	18	47	62	87	128	185
Doxorubicina 500x	-	1	4	11	34	65	89	166	267
Control	1	4	11	28	80	140	223	319	466

Figura 3.2.11 Efecto de $12 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de laherradurina y de $13.8 \mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células SW-480.

Comparación de las dosis de laherradurina en el desarrollo de los tumores de células SW-480 inducidos en ratones atímicos.

El efecto de laherradurina sobre el desarrollo de los tumores de células SW-480 fue dependiente de la dosis utilizada. Si bien todas ellas redujeron en alguna medida el volumen medio tumoral de los grupos de animales tratados, únicamente se encontró diferencias significativas en las dos dosis más altas (100x y 500x). (Figura 3.2.12).



Dosis de laherradurina	Tamaño promedio de los tumores (mm ³) en los días de tratamiento								
	4	6	8	10	12	14	16	18	20
1x	1	2	6	16	52	105	192	279	377
10x	1	1	3	8	42	103	177	254	331
100x	-	1	3	14	24	53	97	164	261
500x	-	1	4	18	47	62	87	128	185
Control	1	4	11	28	80	140	223	319	466

Figura 3.2.12 Efecto comparativo de las dosis de laherradurina en el desarrollo de los tumores de células SW-480.

3.2.5.2. Efecto de la Cherimolina-2

En los ensayos de proliferación *in vitro*, la cherimolina-2 presentó diferentes CE₅₀ en los cultivos de células HeLa y SW-480, por lo que el número de moles administrados a los ratones implantados con estas líneas celulares, fueron diferentes (cuadro 6.1)

3.2.5.2.1. Efecto de la cherimolina-2 en el desarrollo de los tumores de células HeLa inducidos en los ratones atímicos

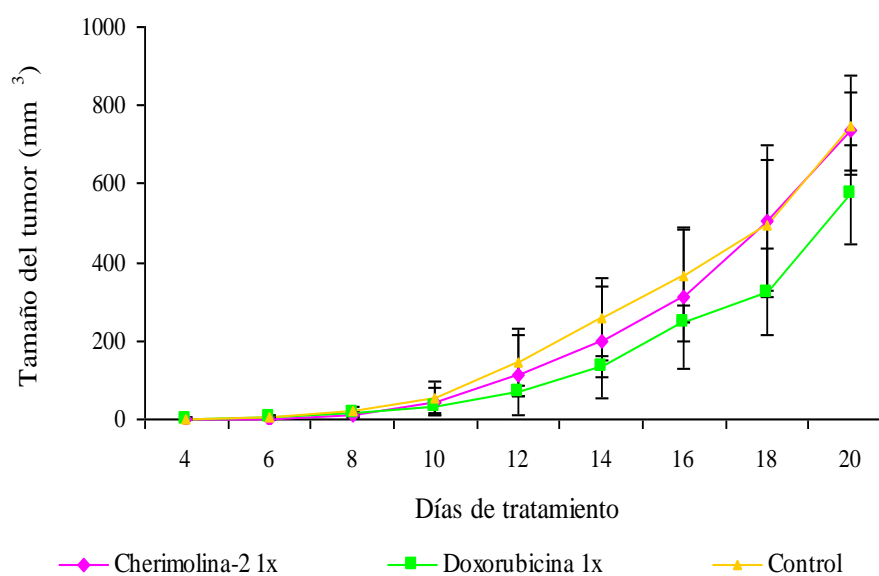
Las dosis de los compuestos así como el número de ratones implantados con células HeLa que las recibieron, se presentan a continuación (cuadro 3.2.4).

Cuadro 3.2.4. Dosis administradas de cherimolina-2 y doxorubicina a los ratones implantados con células HeLa.

1x 10 ⁶ células HeLa implantadas a ratones atímicos en el día 0 Las dosis se administraron por gramo de peso de los animales en un volumen final de 100 µL.			
	Concentración de los compuestos	No. de ratones atímicos	
		Laherradurina	Doxorubicina
DE50x1=	0.078 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de cherimolina-2 0.092 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de doxorubicina	5	4
DE50x10=	0.78 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de cherimolina-2 0.92 µmol día ⁻¹ de doxorubicina	5	4
DE50x100=	7.8 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de cherimolina-2 9.2 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de doxorubicina	5	4
DE50x500=	39 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de cherimolina-2 46 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de doxorubicina	5	4
Solución salina (control de proliferación)		5	

Efecto de $0.078 \mu\text{mol día}^{-1}$ de cherimolina -2. Dosis 1x.

Al finalizar el tratamiento, los animales tratados con $0.024 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de laherradurina presentaron una reducción promedio en el tamaño de los tumores de células HeLa de 19 % respecto al grupo control, esta reducción no es estadísticamente significativa. Comparativamente, $0.028 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de doxorubicina indujo una reducción de 28 % (tratados/controles), la cual aún de ser mayor, tampoco demostró ser significativa (Figura 3.2.13).

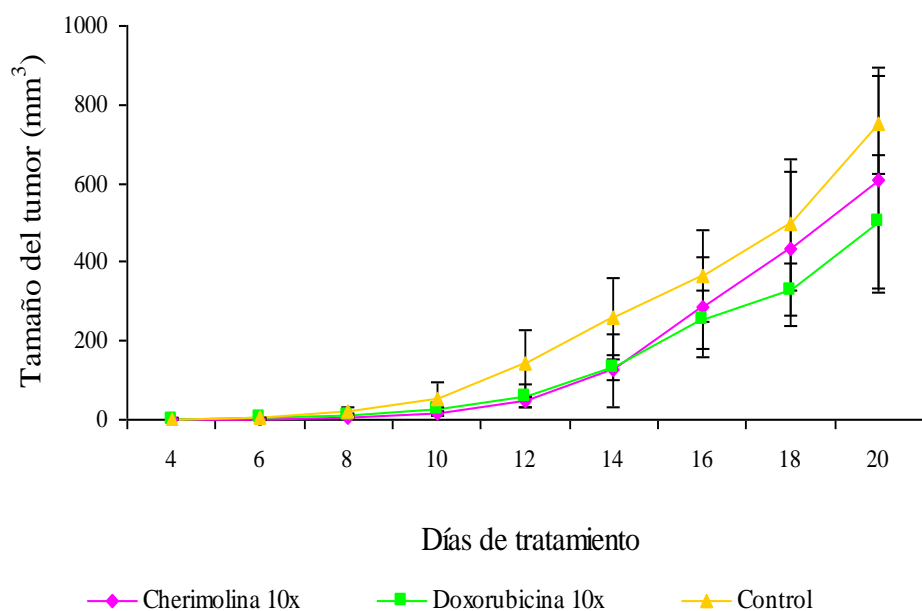


	Tamaño promedio de los tumores (mm^3) en los días de tratamiento								
	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Cherimolina-2 1x	1	2	7	45	112	196	310	508	735
Doxorubicina 1x	1.5	5	14	30	71	133	245	324	573
Control	2	5	21	54	144	257	366	495	749

Figura 3.2.13 Efecto de $0.078 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de cherimolina-2 y $0.092 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células HeLa.

Efecto de $0.78 \mu\text{mol día}^{-1}$ de cherimolina -2. Dosis 10x.

El grupo de animales tratados con $0.78 \mu\text{mol día}^{-1}$ de cherimolina-2, presentaron al finalizar el tratamiento una reducción de 19 % en el tamaño de los tumores de células HeLa respecto del grupo control, sin embargo esta reducción no es estadísticamente significativa e incluso es menor a la encontrada en el grupo tratado con $0.028 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de doxorubicina y cuya reducción final fue del 33 % (tratados/ control (Figura 3.2.14)

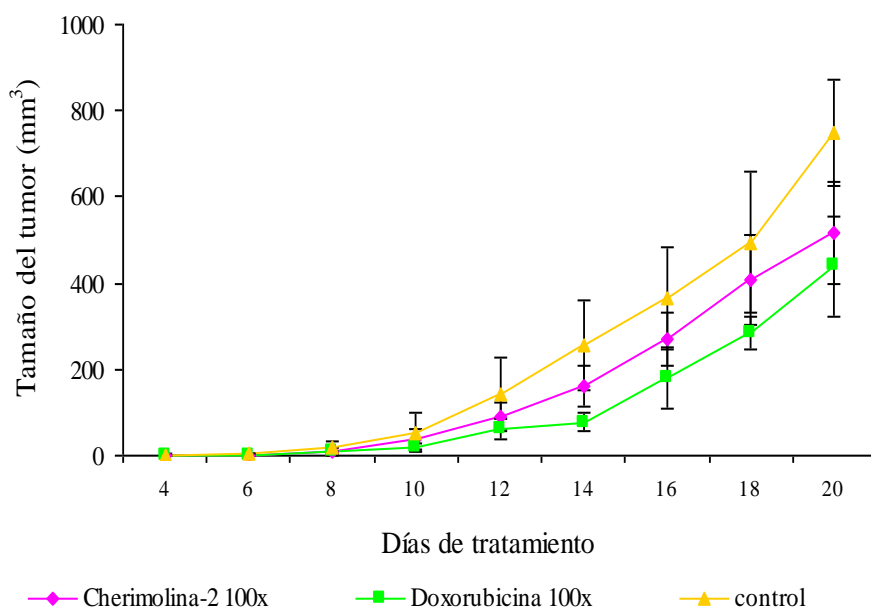


	Tamaño promedio de los tumores (mm^3) en los días de tratamiento								
	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Cherimolina-2 10x	1	1	6	14	46	124	286	432	609
Doxorubicina 10x	1	4	10	26	61	133	255	330	503
Control	2	5	21	54	144	257	366	495	749

Figura 3.2.14 Efecto de $0.078 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de cherimolina-2 y $0.092 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células HeLa.

Efecto de $7.8 \mu\text{mol día}^{-1}$ de cherimolina -2 Dosis 100x.

La administración de $7.8 \mu\text{mol día}^{-1}$ de cherimolina-2 en la base de los tumores de células HeLa, inhibió su desarrollo en mayor magnitud que las dosis con menor concentración; al final del tratamiento, la reducción en el tamaño promedio de los tumores fue de 30 % respecto del grupo control y es estadísticamente significativa (día 20 $P \geq$ de 0.05). (Figura 6.15).

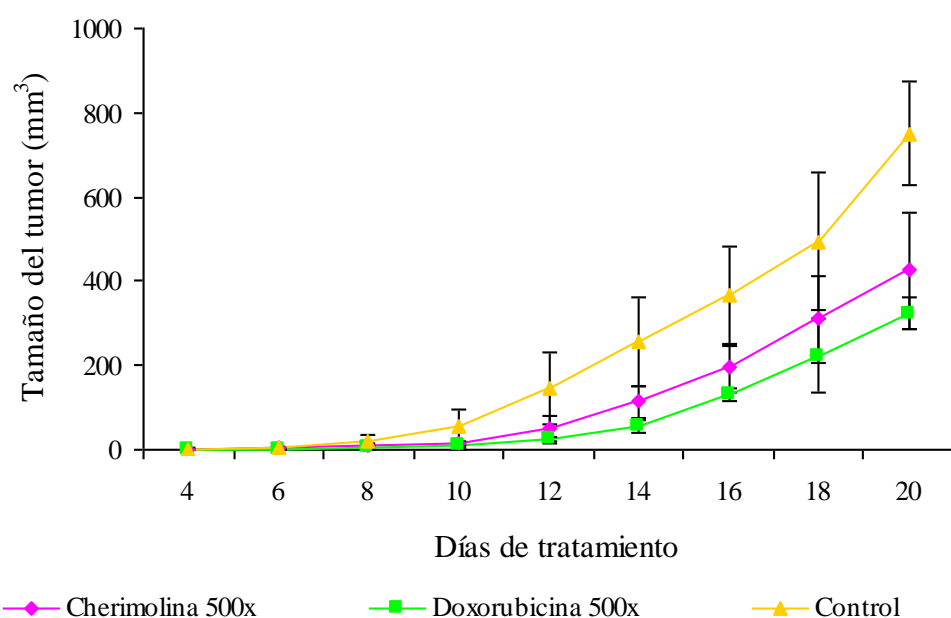


	Tamaño promedio de los tumores (mm^3) en los días de tratamiento								
	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Cherimolina-2 100x	-	2	11	39	92	161	272	407	538
Doxorubicina 10x	-	2	9	20	61	77	180	284	439
Control	2	5	21	54	144	257	366	495	749

Figura 3.2.15 Efecto de $0.78 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de cherimolina-2 y $0.92 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células HeLa.

Efecto inhibitorio de $39 \mu\text{mol g}^{-1} \text{día}^{-1}$ de cherimolina-2 Dosis 500x.

A pesar de que su efecto es menor al mostrado por $46 \mu\text{mol día}^{-1}$ del fármaco antitumoral control, la cherimolina-2 a $39 \mu\text{mol g}^{-1} \text{día}^{-1}$ inhibió de manera significativa el crecimiento de los tumores a partir del 16^{avo} día de tratamiento ($P \geq 0.05$). El tamaño promedio de los tumores del grupo tratado con esta ACG fue 40 % menor respecto del grupo control, en tanto que el grupo tratado con doxorubicina presentó al finalizar el tratamiento, un valor promedio 57 % menor (Figura 3.2.16).

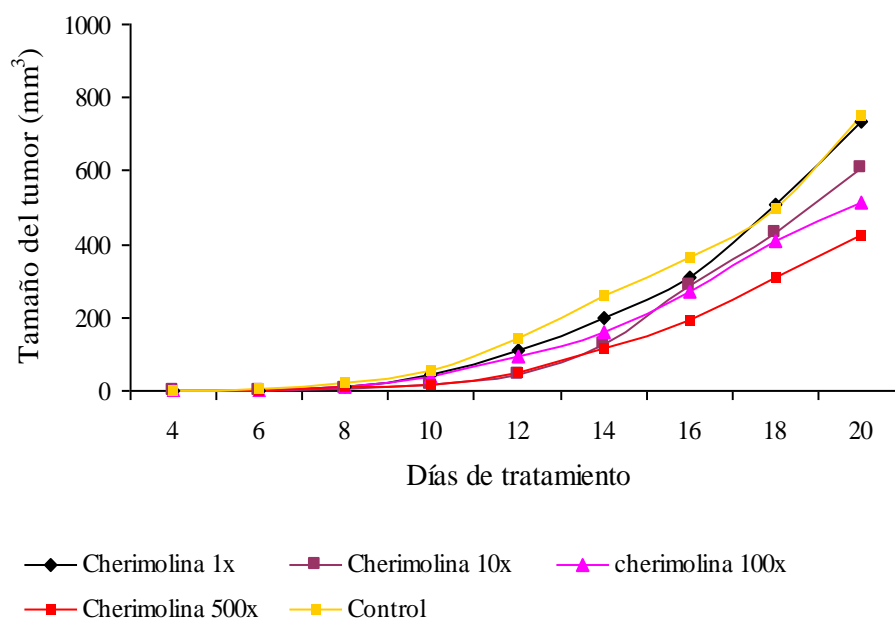


	tamaño promedio de los tumores (mm^3) en los días de tratamiento								
	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Cherimolina-2 500x	-	2	10	14	50	114	194	309	452
Doxorubicina 500x	-	-	4	8	22	56	131	223	323
Control	2	5	21	54	144	257	366	495	749

Figura 3.2.16. Efecto $39 \mu\text{mol g}^{-1} \text{día}^{-1}$ de cherimolina-2 y $46 \mu\text{mol g}^{-1} \text{día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células HeLa.

Comparación de las dosis de cherimolina-2 en el desarrollo de los tumores de células HeLa inducidos en ratones atímicos

Los efectos inhibitorios de la cherimolina-2 en el desarrollo de los tumores de células HeLa fueron mayores a medida que el número de micromoles en las dosis administradas se incrementó, por lo que podemos señalarla como dosis-dependiente. Las reducciones significativas se encontraron en las dos dosis más concentradas de ACG, siendo la mayor, la que logró el porcentaje de reducción más alta y a tiempos más tempranos (Figura 3.2.17).



Dosis de cherimolina-2	Tamaño promedio de los tumores (mm ³) en los días de tratamiento								
	4	6	8	10	12	14	16	18	20
1x	1	2	7	45	112	196	310	508	735
10x	1	1	6	14	46	124	286	432	609
100x	-	2	11	39	92	161	272	407	538
500x	-	2	10	14	50	114	194	309	452
Control	2	5	21	54	144	257	366	495	749

Figura 3.2.17 Efecto comparativo de las dosis de cherimolina-2 en el desarrollo de los tumores de células HeLa.

3.2.5.2.2. Efecto de la cherimolina-2 en el desarrollo de los tumores de células SW-480 inducidos en los ratones atímicos

En la línea celular de adenocarcinoma colorectal SW-480 la cherimolina-2 mostró *in vitro* una DE₅₀ de 0.78 µM e indujo el 11 % de inhibición de la proliferación celular a 0.00016 µM.

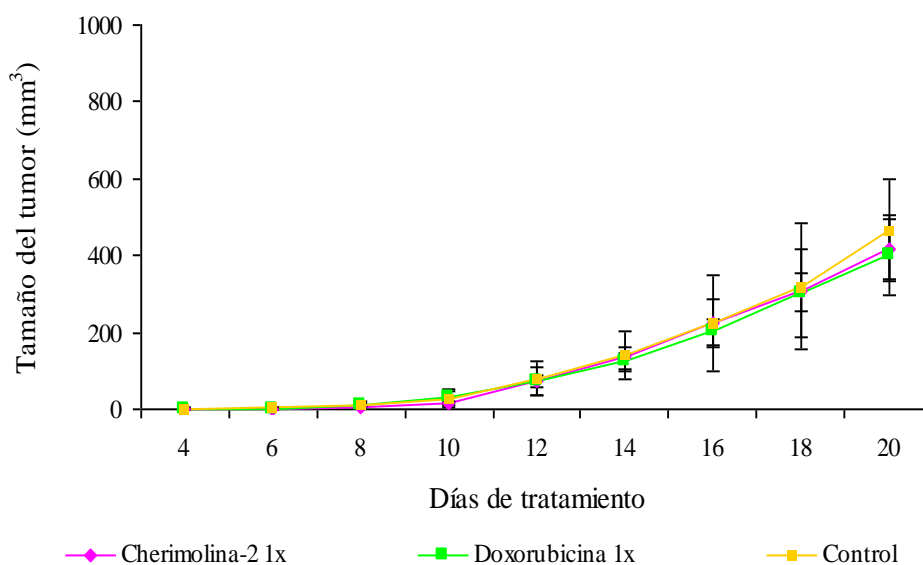
Los micromoles de cherimolina-2 contenidos en las dosis administradas así como los grupos de ratones atímicos implantados con células HeLa que las recibieron, se presentan a continuación (Cuadro 3.2.5).

Cuadro 3.2.5. Dosis administradas de cherimolina-2 y doxorubicina a los ratones implantados con células SW-480.

5x 10 ⁶ células SW-480 implantadas a ratones atímicos en el día 0 Las dosis de cherimolina-2 o doxorubicina se administraron por gramo de peso de los animales en un volumen final de 100 µL.			
	Concentración de los compuestos	No. de ratones atímicos	
		Laherradurina	Doxorubicina
DE ₅₀ x1=	0.78 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de cherimolina-2 0.9 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de doxorubicina	5	4
DE ₅₀ x10=	7.8 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de cherimolina-2 9 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de doxorubicina	5	4
DE ₅₀ x100=	78 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de cherimolina-2 90 µmol g ⁻¹ día ⁻¹ de doxorubicina	5	4
Solución salina (control de proliferación)		5	

Efecto de $0.78 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de cherimolina 2. Dosis 1x

Los lotes de animales implantados con células SW-480 y que recibieron $0.78 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de cherimolina-2 ó $0.9 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de doxorubicina desarrollaron tumores con tamaños muy semejantes a los presentados por el grupo control. Al final del tratamiento, la reducción promedio fue de 10 % en los ratones inyectados con cherimolina-2 y de 16 % en los tratados con doxorubicina (Figura 3.2.18).

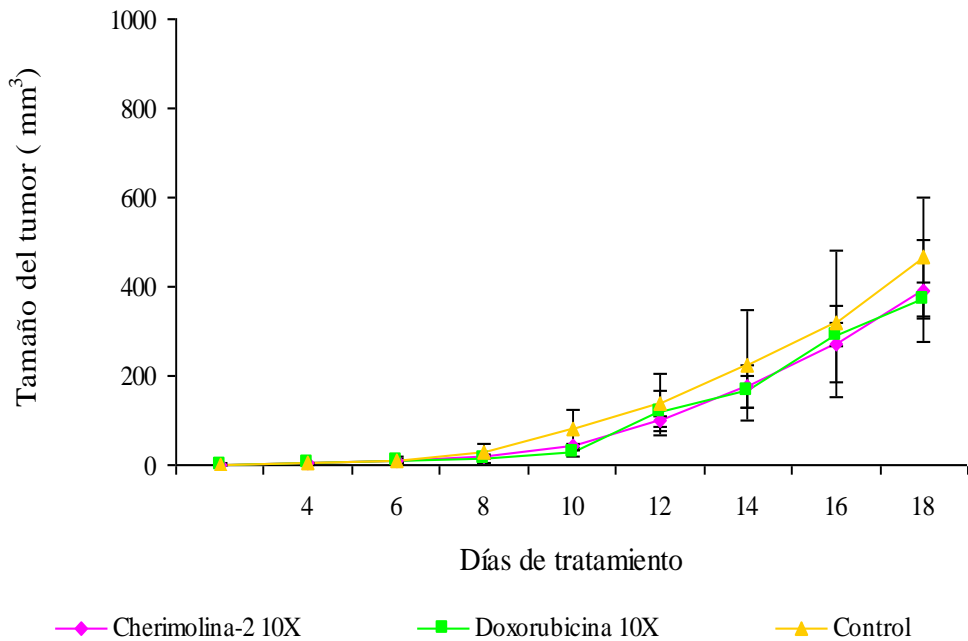


	Tamaño promedio de los tumores (mm^3) en los días de tratamiento								
	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Cherimolina-2 1x	1	2	6	16	73	133	225	316	416
Doxorubicina 1x	1	2	11	29	73	123	201	302	400
Control	1	4	11	28	80	140	223	319	466

Figura 3.2.18. Efecto de $0.78 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de cherimolina-2 y $0.9 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células SW-480.

Efecto de $7.8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de cherimolina 2. Dosis 10x

Los animales tratados con $7.8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de cherimolina-2 ó $9.2 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de doxorubicina desarrollaron tumores un poco más mas pequeños a los del grupo control. Si bien al término del tratamiento el tamaño promedio de los tumores fue 20% menor en el grupo tratado cherimolina-2 y 21% con doxorubicina, las diferencias no son estadísticamente significativas (Figura 3.2.19).

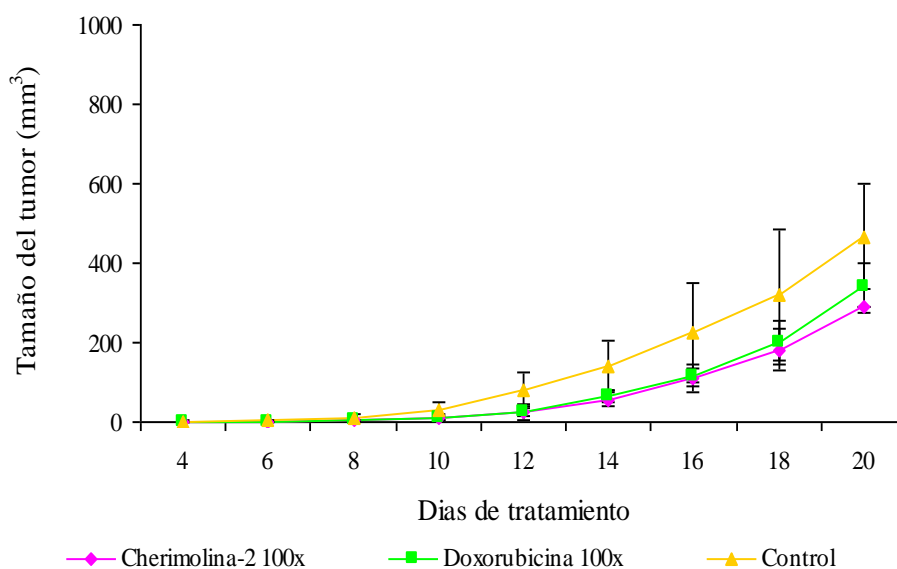


	Tamaño promedio de los tumores (mm^3) en los días de tratamiento								
	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Cherimolina-2 10x	-	5	10	18	45	98	175	270	390
Doxorubicina 10x	1	5	8	16	27	117	164	292	370
Control	1	4	11	28	80	140	223	319	466

Figura 3.2.19. Efecto de $7.8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de cherimolina-2 y $9 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células SW-480.

Efectos indeseables de la administración de $78 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de cherimolina 2.
Dosis 100x

La dosis de $78 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ (100x) de cherimolina contenía el doble de acetogenina que la administrada como 500x en los ratones con HeLa (78 vs $39 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$). Esta concentración posiblemente indujo la muerte de la mayoría de los animales y solo uno continuó vivo al finalizar el tratamiento, por lo que se indica entre paréntesis el número de animales vivos cuyos tumores fueron medidos. Los animales tratados con doxorubicina mostraron al término del tratamiento un 27 % de reducción en el volumen de los tumores, aunque mostraron también fuertes signos de deterioro como la pérdida de peso e inestabilidad en el movimiento (Figura 3.2.20).

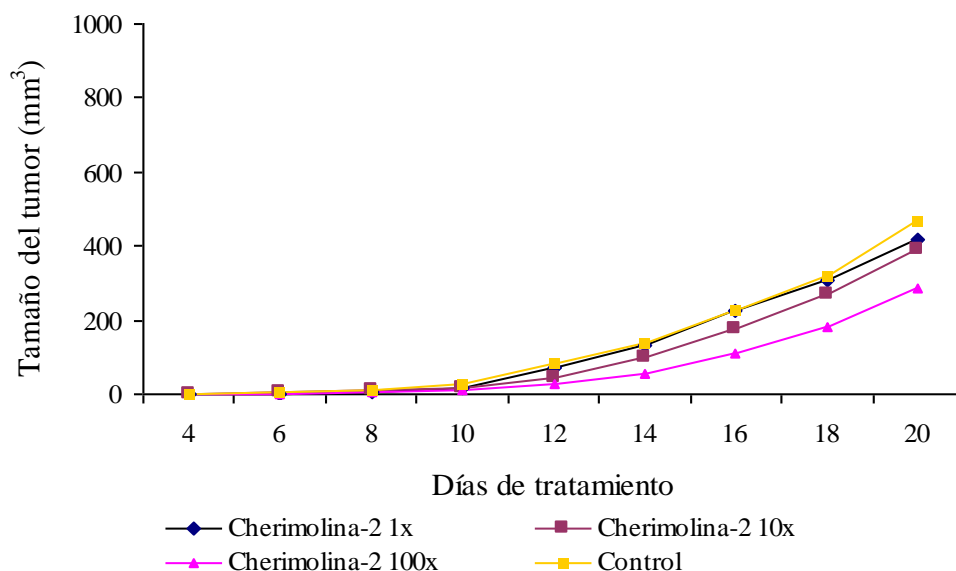


	Tamaño promedio de los tumores (mm ³) en los días de tratamiento									
	4	6	8	10	12	14	16	18	20	
Cherimolina-2 100x (No de animales)	- (5)	1 (5)	4 (5)	9 (5)	26 (4)	57 (3)	109 (3)	182 (2)	288 (1)	
Doxorubicina 100x	-	-	3.5	12	27	66	113	199	338	
Control	1	4	11	28	80	140	223	319	466	

Figura 3.2.20 Efecto de $78 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de cherimolina-2 y $90 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de doxorubicina en el desarrollo de tumores de células SW-480.

Comparación de las dosis de cherimolina-2 sobre el desarrollo de tumores de células SW-480 inducidos en ratones atímicos.

Al finalizar el periodo de tratamiento con cherimolina-2, se observó que el desarrollo de los tumores en los ratones atímicos tuvo una tendencia a disminuir a medida que el número de moles de acetogenina en las dosis administradas a los animales se incrementó. A pesar de ello, las reducciones en las dos primeras no fueron suficientes para ser estadísticamente significativas y en la siguiente (100x) solo uno de los animales permaneció vivo hasta el día 19. (Figura 6.21).



	Tamaño promedio de los tumores (mm ³) en los días de tratamiento								
	3	5	7	9	11	13	15	17	19
Cherimolina-2 1x	1	2	6	16	73	133	225	316	416
Cherimolina-2 10x	-	5	10	18	45	98	175	270	390
Cherimolina-2 100x	-	1	4	9	26	57	109	182	288
Control	1	4	11	28	80	140	223	319	466

Figura 3.2.21 Efecto comparativo de las dosis de cherimolina-2 en el desarrollo de los tumores de células SW-480.

3.2.6 Análisis de los resultados

Los estudios con animales, especialmente con roedores, señalan que la actividad de las ACG con relación a algunos fármacos anti-neoplásicos puede ser comparable o inclusive superior. Por ejemplo, la bullatacina ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$) y la bullatacinona ($400 \mu\text{g kg}^{-1}$), administradas intraperitonealmente en los días 1 y 9, incrementaron en 38 % y 44 % respectivamente el tiempo de vida de los ratones con leucemia murina (L1210) en tanto que la bullatacina ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$) y la bullatalicina (1 mg kg^{-1}) redujeron en 67 % y 75 % el crecimiento de los tumores de células de carcinoma ovárico humano A2780 y semejante al tratamiento único de 5 mg kg^{-1} del fármaco antitumoral cisplatina (Ahmadsahib *et al.*, 1993); por otro lado, la annonacina administrada diariamente a razón de 10 mg kg^{-1} durante dos semanas en ratones BDF-1 con carcinoma murino de pulmón (LLC), logró una inhibición del crecimiento de los tumores de 57.9 % (tratados/controles) y equivalente a la dosis de doxorubicina de $2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ (54.6 % tratados/controles) (Wang *et al.*, 2002). A pesar de estos resultados prometedores, es difícil establecer relación alguna entre las dosis empleadas en los diferentes trabajos.

Por ello, se decidió utilizar el número de micromoles de acetogeninas presentes en la CE_{50} de los cultivos celulares y multiplicarlo por los gramos de peso del animal experimental. Esta dosis puede ser incrementada hasta encontrar el mayor efecto inhibitorio en el desarrollo de los tumores y el menor efecto tóxico en los animales tratados, además puede ser convertida en mg kg^{-1}

En general el efecto de las acetogeninas sobre el desarrollo de los tumores inducidos de células HeLa y SW-480 correspondió a lo observado en nuestros ensayos de la proliferación celular: Laherradurina tuvo un efecto mayor que la cherimolina-2 y el fármaco doxorubicina; el efecto de las ACG es mayor cuando el número de moléculas se incrementa.

Se ha reportado que la bullatacina a dosis de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ presenta una alta toxicidad en los animales tratados, en tanto que a $100 \mu\text{g/kg}^{-1}$ inhibe el desarrollo de los tumores de carcinoma ovárico humano A2780 en 68 %, aunque la mortalidad de

los animales es aún del 25 % (Ahammadsahi *et al.*, 1993). En nuestros resultados, la dosis de $0.24 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ (10x) correspondiente a $150 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de laherradurina mostró una reducción final de 40 % sobre los tumores de células HeLa (452 vs. 750 mm^3 tratados/controles ($P \leq 0.05$) y de 29 % en SW-480 (331 vs. 466 tratados/controles).

Más aún, el incremento de 10 y 50 veces más de laherradurina (2.4 y $12 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ equivalentes a 1.5 y $7.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$) inhibió el desarrollo de los tumores de células HeLa en 53 y 65 %, en tanto que en los de células SW-480 ésta inhibición correspondió a 44 y 60 %; las reducciones significativas se encontraron en las dosis con mayor contenido de ACG a tiempos cada vez más tempranos.

Los resultados anteriores indican que laherradurina fue efectiva en inhibir el desarrollo de los tumores de células HeLa entre 0.15 y $7.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ y de SW-480 entre 1.5 a $7.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$, con porcentajes semejantes a lo descrito con 10 mg/kg de la mono-THF annonacina y 1 mg kg^{-1} de bullatalicina y en donde ningún animal murió al igual que en nuestros ensayos.

La administración de $24 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ equivalentes a $15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de laherradurina (1000x) tuvo efectos indeseables en los animales implantados con células HeLa, lo que sugiere que si bien la actividad de la ACG sobre las células tumorales es potente, también pueden actuar sobre las células normales afectando severamente al organismo (Ahammadsahi *et al.*, 1993). Estos resultados pudieran señalar que los límites entre las dosis terapéuticas vs las tóxicas de laherradurina en estos animales se encuentra entre 7.5 a $15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$. Por lo anterior esta última concentración no fue utilizada con ratones con células SW-480.

Por otro lado, el número de micromoles de cherimolina-2 en la dosis inicial administrada en los animales implantados con células HeLa fue 3.2 veces mayor a la administrada como laherradurina (0.078 vs. $0.025 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ día}^{-1}$) y aunque el efecto significativo se encontró en las dosis 100x y 500x (30% y 40% de reducción de los tumores al fin del tratamiento) al igual que laherradurina, el número de micromoles

administrados fueron diferentes (2.5 y 12 de laherradurina vs 7.8 y 39 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{día}^{-1}$ de cherimolina-2).

El desarrollo de los tumores de SW-480 no fue afectado por las dosis de 0.78 y 7.8 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ (1x y 10x) de cherimolina-2, en tanto que en el grupo de animales que recibieron 78 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$ (dosis 100x) solo uno sobrevivió al tratamiento. La muerte de los animales pudiera ser debido a que recibieron una concentración de cherimolina-2 que correspondió al doble de la administrada como 500x en los animales con HeLa. (78 vs. 39 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$), y pudiera indicar las dosis máximas para ser empleadas en los ratones atímicos.

Así, tanto laherradurina como la cherimolina-2 presentaron concentraciones tóxicas en los animales, aunque la primera de ellas lo hizo a concentraciones menores (24 vs 78 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$), lo que pudiera ser explicado por la mayor actividad mostrada por ese compuesto. Estos resultados evidencian los efectos nocivos de altas dosis de ACG que pueden llegar a ser letales y que pudieran ser el resultado de su actividad inhibitoria sobre el complejo I mitocondrial.

Si bien la mayoría de las ACG inhiben el complejo I durante los ensayos con partículas abiertas de la mitocondria, factores como su solubilidad, transporte celular y accesibilidad a los sitios de inhibición deben de ser importantes en los organismos. Por ello, la CE_{50} de los ensayos de proliferación pudiera ser buen indicativo del potencial de estas moléculas en su administración. Nuestros resultados muestran un enfoque razonable para analizar *in vivo* las dosis activas de las acetogeninas a partir de las CE_{50} obtenidas de los ensayos de proliferación celular *in vitro*; sin embargo, el grado de toxicidad pudiera depender de la ACG utilizada.

3.2.7 Conclusiones

- Laherradurina tiene un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de tumores de células HeLa y SW-480 implantadas en ratones atímicos
- La actividad inhibitoria de laherradurina se observa de manera más temprana cuando la concentración de la ACG se incrementa.
- Laherradurina administrada de 2.4 a 12 μ moles g^{-1} día $^{-1}$ por un periodo de 20 días, inhibe el crecimiento de las células HeLa y SW-480 sin efectos colaterales en los ratones atímicos.
- En ratones atímicos implantados con células HeLa, la cherimolina es efectiva a dosis de 7.8 y 39 μ moles g^{-1} día $^{-1}$ aunque presenta una menor actividad al fármaco antitumoral doxorubicina.
- Ambas acetogeninas presentan dosis tóxicas en los ratones atímicos tratados y cuya concentración puede ser dependiente de su potencia como inhibidores del complejo I mitocondrial.

3.3. Potencial inhibitorio de las acetogeninas sobre el consumo de oxígeno celular

3.3.1 Descripción

La relación entre la potencia inhibitoria de las acetogeninas sobre el complejo I mitocondrial y su efecto sobre las células neoplásicas en cultivo es una de las incógnitas que aún deben ser resueltas. Esta relación se ha buscado utilizando partículas submitocondriales abiertas provenientes del corazón de bovinos y en donde las ACG no tienen barreras fisiológicas que impidan su accesibilidad al sitio de unión del complejo I (Royo *et al.*, 1993; Tormo *et al.*, 2003b, 2005)

Para evaluar la actividad de las ACG sobre el complejo I garantizando la integridad de las mitocondrias en ese trabajo se utilizó la polarografía de oxígeno para: A) medir los cambios en el consumo de oxígeno en las células expuestas a concentraciones diferentes de ACG, considerando que la actividad inhibitoria de estos compuestos es sobre el complejo I mitocondrial y B) calcular el consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas en presencia de substratos que permiten la actividad del complejo I.

3.3.2. El hepatoma de rata AS-30D

Se utilizó la línea celular de hepatoma de rata AS-30D debido a que su reproducción en el líquido ascítico de los animales inoculados es alta, lo que facilitó obtener las cantidades de células necesarias para medir polarográficamente la respiración en ambos sistemas.

Las células se propagaron por trasplante intraperitoneal en ratas Sprague-Dawley de 200-250 g. Para el trabajo experimental, se sacrificaron por decapitación animales con 5-7 días de inoculación y el líquido ascítico se obtuvo por punción intraperitoneal.

3.3.3 Método

El diagrama general de actividades se presenta en la Figura 3.3.1.

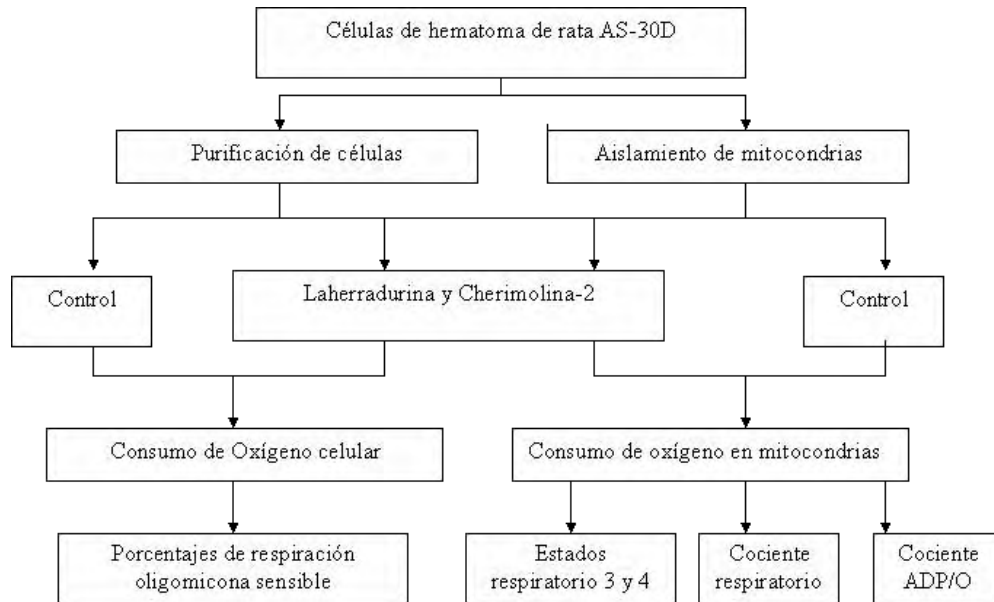


Figura 3.3.1 Flujograma para medir el consumo de oxígeno en célula AS-30 D y en mitocondrias aisladas.

3.3.3.1. Evaluación del consumo de oxígeno por las células AS-30D

Purificación de las células AS-30D

Las células se lavaron por centrifugación en tres ocasiones a 1000 rpm, a 4 °C en solución Krebs-Ringer (en mM) 125 NaCl, 5 KCl, 25 HEPES, 1 MgCl₂, 1 KH₂PO₄, 1.4 CaCl₂, pH 7.4.

Para eliminar los eritrocitos contaminantes, las células se resuspendieron con albúmina al 2% en solución Krebs-Ringer y se separaron por centrifugación a 800 rpm; 4 °C, por 2 minutos. Finalmente las células se resuspendieron en esta solución sin albúmina.

Se determinó el número de células por mililitro así como su porcentaje de viabilidad con azul de tripán al 0.05 %; las muestras utilizadas tuvieron una viabilidad celular mayor al 90 %. Todos los ensayos se realizaron en tres ocasiones.

Determinación del consumo de oxígeno celular

El consumo del oxígeno celular fue medido a 37 °C en una cámara acoplada a un electrodo de oxígeno tipo Clark y los valores registrados en un oxímetro con graficador (Yellow Springs Instrument Co.). En la cámara fueron resuspendidas 1×10^7 células en un volumen final de 2 mL con medio Krebs-Ringer saturado de oxígeno a 37 °C. Los registros se realizaron con la siguiente secuencia:

Ensayo control

1. Se colocó en la cámara del oxímetro 1.8 mL de la solución Krebs-Ringer a 37°C y se ajustaron los valores máximos y mínimos de oxígeno en el graficador.
2. Se agregaron 1×10^7 células en 100 μ L y se registró su consumo de oxígeno durante 200 segundos.
3. Se adicionaron 10 μ l de oligomicina (4mM) para bloquear la ATP sintetasa.
4. Se registró la respiración residual durante 100 s.
5. Se agregó una punta de espátula de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (ditionita) para registrar el nivel mínimo de oxígeno.

Ensayo con las concentraciones de acetogeninas

1. Se colocaron 1.8 mL de solución Krebs-Ringer a 37 °C en la cámara del oxímetro y se ajustó en el graficador los valores máximos y mínimos de oxígeno.
2. Se agregaron 1×10^7 células en 100 μ L registrándose durante 200 s el consumo de oxígeno.
3. Se adicionaron las concentraciones deseadas de acetogeninas, iniciando con la menor de ellas.

4. Se registró el consumo celular de oxígeno durante 200 s.
5. Se agregó 10 µl de oligomicina (4mM) para bloquear la ATP sintetasa.
6. Se registró la respiración residual durante 100 seg.
7. Se agregó una punta de espátula de Na₂S₂O₄ (ditionita) para registrar el nivel mínimo de oxígeno.

La cámara del oxímetro se lavó exhaustivamente entre cada ensayo para evitar residuos de ACG de la concentración anterior.

Los parámetros calculados fueron: el consumo de oxígeno (ng AO min⁻¹) de 1x10⁷ células sin o con las diferentes concentraciones de acetogeninas (laherradura y cherimolina-2) considerando:

- La respiración que fue sensible a la oligomicina.
- La respiración que fue resistente a la oligomicina.

3.3.3.2. Evaluación del consumo de oxígeno en mitocondrias de las células AS-30D.

Aislamiento de las mitocondrias.

En general las mitocondrias se aislaron mediante lisis celular y posterior centrifugación diferencial con el siguiente método.

Las células AS-30D fueron lavadas con solución fría NKT (NaCl 150 mM, KCl 5 mM, Tris 10 mM) pH 7.5 por 3 ocasiones a 1800, 1100 y 800 rpm sucesivamente para eliminar los eritrocitos contaminantes y finalmente resuspendidas a una concentración de 30 mg/mL en solución SHE (sacarosa 220 mM, Hepes 10mM EGTA 1 mM) pH 7.3 y 0.4 % de albúmina sérica bovina.

Las células se rompieron con digitonina a una concentración final de 15 µg/mL por 3 min en agitación constante. A fin de diluir el reactivo se agregó 100 mL de SHE transcurrido ese tiempo.

Se centrifugó por 5 min a 2500 rpm y el botón se resuspendió a una concentración de 30 mg/mL.

El botón se homogeneizó en vidrio (Potter-Elvehjem) y se centrifugó a 2500 rpm por 5 min. El sobrenadante se recuperó y centrifugó a 9 000 rpm por 10 min; el botón final (paquete mitocondrial) se resuspendió en el menor volumen posible de sol. SHE (2 ó 3 mL).

El paquete mitocondrial se incubó por 10 min con 10 μ L de ADP 100 mM y 10 μ L de albúmina sérica bovina sin lípidos al 10 % durante 10 min. La albúmina ayudó a sellar las mitocondrias que pudieran haber sido dañadas durante el procedimiento de purificación.

El paquete mitocondrial se centrifugó a 9500 rpm y el precipitado se resuspendió en el menor volumen de sol. SHE.

Se cuantificó la concentración de proteínas del paquete mitocondrial mediante el método de Biuret en presencia de 0.1 % de desoxicolato de sodio.

Determinación de consumo de oxígeno en mitocondrias

Se resuspendieron 2 mg de proteína mitocondrial en un volumen final de 1.9 mL de sol. KME (KCl 120 mM, Mops 20mM, EGTA 0.5 mM, fosfato de potasio 5mM), pH 7.2 saturada de aire y a 37 °C. El consumo de oxígeno de las mitocondrias se midió con una cámara acoplada a un electrodo de oxígeno tipo Clark y registrado en un oxímetro con graficador (Yellow Springs Instrument Co.).

Los ensayos se realizaron en tres ocasiones con la siguiente secuencia:

Ensayo control

1. Se colocaron en la cámara del oxímetro 1.8 mL de sol. KME a 37 °C y saturada de aire.
2. Se agregaron 24.5 μ L de α cetoglutámico (788 mM) y 9 μ L de Pi (1M).

3. Se adicionó 2 mg de proteína mitocondrial en un volumen no mayor a 100 μL .
4. Se registró el estado respiratorio 4 (inicial) de las mitocondrias durante 200 s.
5. Se adicionó 4 μL de ADP (100 mM).
6. Se registró el estado 3 respiratorio (activo) de las mitocondrias hasta el consumo total del ADP y el retorno al estado respiratorio 4.
7. Se agregó una punta de espátula de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (ditionita) para registrar el nivel mínimo de oxígeno.

Ensayo con las concentraciones de acetogeninas

1. Se colocaron en la cámara del oxímetro 1.8 mL de KME a 37 °C.
2. Se agregaron 24.5 μL de α cetoglúamico (788mM) y 9 μL de Pi (1M).
3. Se adicionaron 2 mg de proteína mitocondrial en un volumen de 100 μL .
4. Se adicionó las ACG iniciando con la menor concentración y se incubó durante 150 s.
5. Se registró el estado respiratorio 4 (inicial) de las mitocondrias durante 200 s.
6. Se adicionaron 4 μl de ADP (100 mM).
7. Se registró el estado respiratorio 3 (activo) hasta el consumo total del ADP y el retorno al estado respiratorio 4.
8. Para registrar el nivel mínimo de oxígeno, se agregó una punta de espátula de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (ditionita).

Entre cada ensayo la cámara del oxímetro fue lavada exhaustivamente para evitar residuos de ACG.

En todas las condiciones los parámetros calculados fueron:

- El consumo de oxígeno en ausencia de ADP (estado 4).
- El consumo de oxígeno en presencia de ADP (estado 3).
- El control respiratorio (estado 3 / estado 4).
- La relación entre el fosfato incorporado al ATP y el oxígeno utilizado (ADP/O_2).

3.3.4 Resultados

3.3.4.1. Consumo de oxígeno en las células AS-30D en presencia de las acetogeninas

La solubilidad del oxígeno a 2240 metros de altitud (Cd. de México) y a 37°C es de 380 ng de átomo de oxígeno/mL (ngAO/mL). Bajo estas condiciones, la respiración de las células control fue de 102.2 y 104.7 ngAO (min x 10⁷ células) y de ella, cerca del 90% fue sensible al inhibidor de la ATP sintetasa (oligomicina) (Cuadro 3.3.1) lo que indica la existencia de un consumo de oxígeno no acoplado a la fosforilación oxidativa. Los valores de la respiración residual (15.73 y 13.66 ngAO/min x 10⁷ células) fueron similares a los reportados anteriormente para las células AS-30D (Rodríguez-Enríquez y Moreno Sánchez, 1998).

Cuadro 3.3.1 Respiración de las células control AS-30D.

Consumo de oxígeno por las células AS-30D*. Control para laherradura.			Consumo de oxígeno por las células AS-30D*. Control para la cherimolina-2.		
Respiración total	Oligomicina sensible	Oligomicina resistente	Respiración total	Oligomicina sensible	Oligomicina resistente
102.23	86.51	15.73	104.74	93.32	13.66

* (ng AO/ min x 10⁷ células)

* ng AO/ min x 10⁷ células

En general la exposición de las células a las concentraciones crecientes de las acetogeninas indujo como respuesta una inhibición progresiva de la respiración. Laherradura a la menor concentración (1 nM) produjo un efecto inhibitorio de 21.8 % en la respiración sensible a la oligomicina, en tanto que en la más alta (100nM) logró un 81%; la dosis inhibitoria media (DI₅₀) de esta acetogenina puede situarse entre 25 y 10 nM (Cuadro 3.3.2; Figura 3.3.2).

Bajo las mismas condiciones la cherimolina-2 presentó una mayor actividad con porcentajes de inhibición de la respiración sensible a la oligomicina de 35.41 y 18.62 % en las concentraciones de 1 y 0.5 nM y del 93% en la de 100nM. Así, La

dosis inhibitoria 50 (DI₅₀) es aproximadamente entre 5 y 10 nM (Cuadro 3.3.2; Figura 3.3.2).

Cuadro 3.3.2 Consumo de oxígeno de las células AS-30D en presencia de las acetogeninas.

Consumo de oxígeno por las células AS-30D tratadas con cherimolina-2.			Consumo de oxígeno por las células AS-30D tratadas con laherradurina.		
Inhibidor (nM)	Respiracion oligomicina sensible*	% Inhibición en relación al control	inhibidor (nM)	Respiracion oligomicina sensible*	% inhibición en relación al control
100	16.5	93	100	16.5	81
75	23.2	85.7	75	23.1	73.2
50	25	84.5	50	25	71.1
25	37.4	70.6	25	37.4	56.8
10	47.2	56	10	47.2	45.4
5	52.6	54.3	5	52.6	39.2
1	67.6	35.4	1	67.6	21.9
0.5	76	18.6			

(ng AO/ min x 10⁷ células)

* ngAO x 10⁷ células

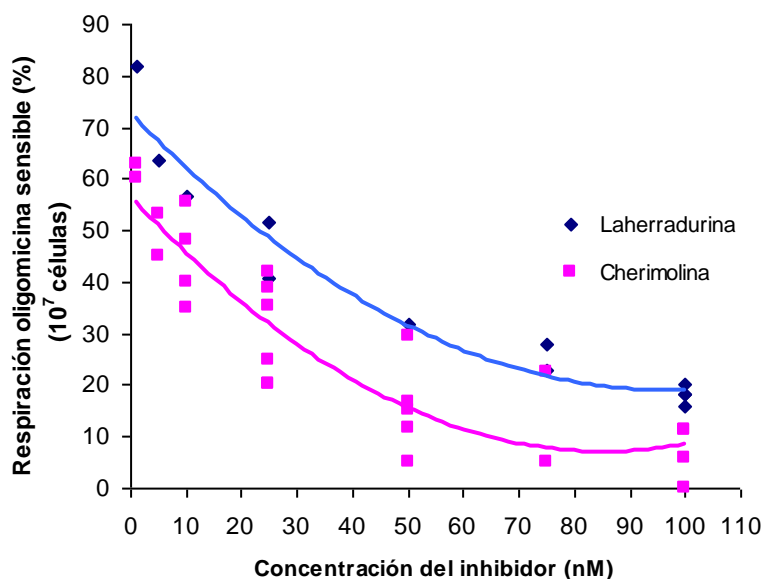


Figura 3.3.2 Consumo de oxígeno celular en presencia de las acetogeninas.

3.3.4.2. Consumo de oxígeno de las mitocondrias en presencia de acetogeninas

El índice P:O (relación entre el fosfato incorporado al ATP y el oxígeno utilizado) con los sustratos asociados al NADH presentan valores más altos (alrededor de 2.5) comparados con el succinato (aprox. 1.5). Esto indica que los electrones de agentes poco reducidos como el succinato, entran a la cadena respiratoria evadiendo el primer sitio de conservación de energía utilizado para la síntesis de ATP, es decir entran por el complejo II.

Debido a que la actividad inhibitoria de las acetogeninas está reportada en el complejo I mitocondrial, se decidió propiciar la actividad del complejo I utilizando el α cetoglutámico como sustrato oxidable.

Como se mencionó, el estado respiratorio 3 mitocondrial señala la conversión del ADP + Pi en ATP. En nuestros ensayos, utilizando una concentración constante de estos reactantes, se encontró que la biosíntesis de ATP pudiera estar reducida, ya que este estado disminuye al aumentar la concentración de ambas acetogeninas. La cherimolina-2 fue consistentemente más activa (DI_{50} entre 10 –15 nM) que laherradurina (DI_{50} = Apx. 20-30 nM) (Cuadro 3.3.3; Figura 3.3.3).

El estado 4 también disminuyó especialmente en las concentraciones altas de cherimolina-2 y en donde el retorno entre el estado 3 y el 4 fue prácticamente nulo. Así, la DI_{50} de la cherimolina puede situarse entre 10-15 nM en tanto que laherradurina entre 20 y 30 nM, indicando que la respiración basal también es afectada. De esta manera, el control respiratorio (estado 3 / estado 4) presenta reducciones únicamente con las concentraciones elevadas (Figura 3.3.4).

Por el contrario el cociente ADP/O con ambos inhibidores, presenta una tendencia al aumento con valores de aproximadamente 3 en los controles a más de 50 en las células expuestas a la mayor concentración de acetogeninas (más de 1200% de aumento) (Figura. 3.3.4).

Cuadro 3.3.3 Consumo de oxígeno por las mitocondrias en presencia de las acetogeninas.

Laherradurina					Cherimolina-2				
[nM]	Estado 3 %	Estado 4 %	CR %	ADP/O %	[nM]	Estado 3 %	Estado 4 %	CR %	ADP/O %
50	23.9	46.0	72.0	1209.1	50	8.3	21.6	37.5	1483.0
40	42.4	47.5	112.0	283.0	25	25.7	21.6	56.3	988.6
30	29.6	34.9	108.8	130.6	15	36.2	34.1	103.1	197.7
20	60.6	60.5	91.4	225.4	10	70.0	80.9	88.1	103.9
10	96.9	112.2	77.3	86.1	5	90.8	87.9	109.1	93.5
5	99.0	82.1	106.7	67.9	4	101.7	94.7	110.0	77.2
3.3	95.0	82.1	102.4	89.7	3	101.5	112.9	89.3	76.8
					2	112.2	150.9	72.3	92.7
					1.5	116.4	150.9	75.0	80.2

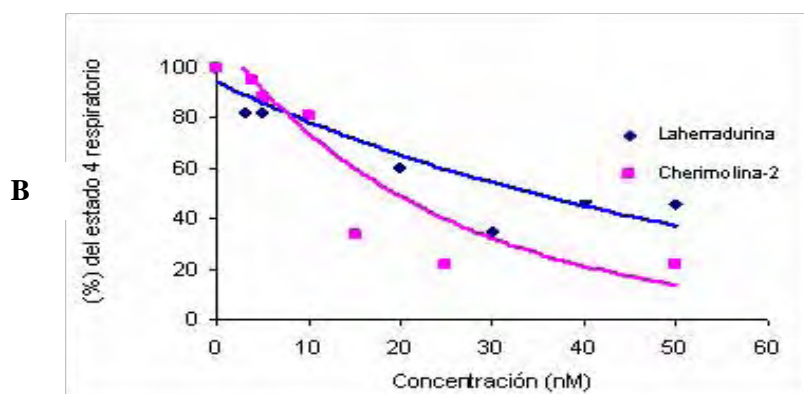
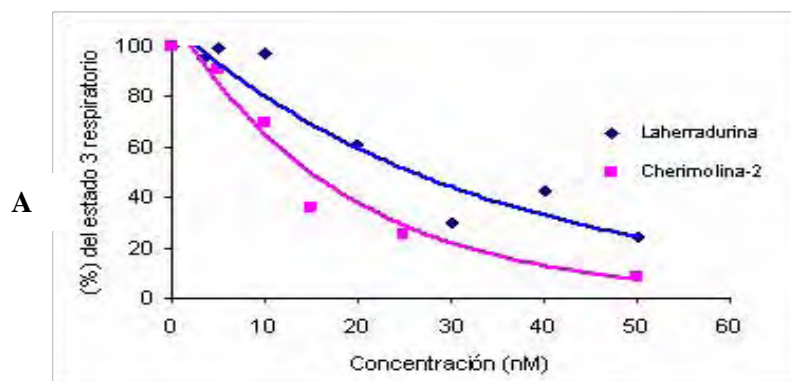


Figura 3.3.3 Consumo de oxígeno de las mitocondrias en presencia de las acetogeninas. Actividad respiratoria del estado 3 (A) y 4 (B).

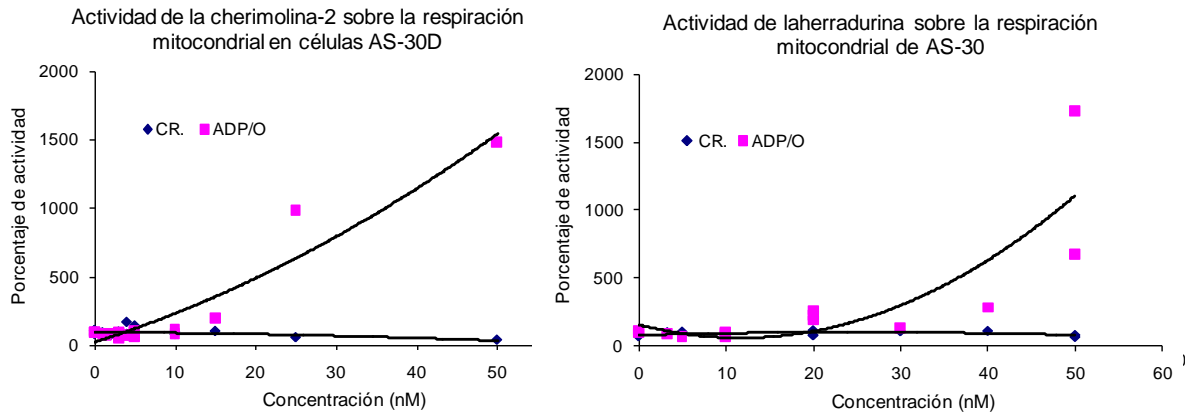


Figura 3.3.4 Porcentajes del control respiratorio (CR) y del cociente ADP/O en mitocondrias expuestas a las acetogeninas.

3.3.5 Análisis de los resultados

Un concepto generalizado es que las células tumorales que pierden las características del tejido original y tiene un crecimiento acelerado, presentan un alto consumo de glucosa. (Lu *et al.*, 2002). Sin embargo, en los últimos años se ha encontrado que algunas líneas tumorales pueden presentar predominantemente un camino oxidativo y no glicolítico. En ellas, el bloqueo específico de la fosforilación oxidativa promueve una reducción significativa del tamaño y de la proliferación celular (Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2006).

Así, en las células neoplásicas HeLa (humanas) y AS-30D (de roedores), los inhibidores que bloquean la glicólisis no afectan la proliferación celular o el metabolismo mitocondrial, sin embargo, la adición de la oligomicina en el medio de cultivo las suprimen (*ibid.*). Además, en el líquido ascítico de los roedores implantados con células AS-30D se ha encontrado una alta concentración de O₂ y de glutamina como sustrato oxidable, pero no de glucosa, las cuales estimulan la fosforilación oxidativa. En esta línea celular se ha estimado que la mayoría del ATP celular proviene de la fosforilación oxidativa y que en su control la NADH-ubiquinol

oxidoreductasa (complejo I) tiene un papel fundamental (Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2000).

En los ensayos de respiración de las células AS-30D, se encontró que aproximadamente el 85% del consumo de oxígeno fue sensible a la oligomicina. Estos resultados son semejantes a los publicados por otros autores (Rodríguez-Enríquez y Moreno Sánchez, 1998). De esta manera, la mayoría del O₂ consumido puede estar asociado a la respiración acoplada a la fosforilación oxidativa o síntesis de ATP y el resto a su utilización por otras oxidasas celulares (respiración no sensible a la oligomicina).

El decremento en la respiración celular fue dosis dependiente con una DI₅₀ entre 25 y 10 nM para laherradurina y entre 10 y 5 nM para la cherimolina-2. Dado el mecanismo inhibitorio de las acetogeninas sobre el complejo I mitocondrial, la reducción de la respiración como consecuencia de la adición de éstas, pudiera señalar una menor transferencia de electrones al O₂ molecular así como una reducción en la síntesis de ATP. En la línea celular MCF-7 se han observado niveles bajos de ATP y un incremento en lactato como respuesta a la exposición de esquamocina (Raynaud *et al.*, 1999), un decremento en la incorporación de [³H]-timidina por la bullatacina (Chih *et al.*, 2001) y el arresto celular en G1 por la annonacina (Yuan *et al.*, 2003). Aunque lo anterior se ha relacionado con la apoptosis, estas manifestaciones pueden ser el producto del bajo nivel energético celular.

En este trabajo, el paso siguiente fue el aislamiento de las mitocondrias y la cuantificación de la respiración propiciando la actividad del complejo I con un sustrato oxidable como el α cetoglutámico y ADP + Pi en presencia de concentraciones crecientes de acetogeninas. Bajo estas condiciones tanto el estado 3 asociado a la síntesis de ATP, como el 4 o respiración basal, se redujeron a medida que se incrementó la concentración de las acetogeninas (cherimolina-2 DI₅₀= entre 10 –25 nM y 10-15 nM y laherradurina DI₅₀ = 20-30 nM y 20 y 30 nM, respectivamente). El control respiratorio (CR) fue modificado especialmente con las

concentraciones altas de los inhibidores en tanto que el cociente ADP/O se elevó a medida que las mitocondrias fueron expuestas a concentraciones elevadas de acetogeninas. El aumento del ADP/O y el CR sugiere en ellas un desacoplamiento entre la respiración y la fosforilación oxidativa (Wallace, 2005). Este desacoplamiento pudiera inducir la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como se ha reportado con inhibidores del complejo I, posiblemente debido a que los electrones se filtran de este complejo, al ser impedidos de continuar su camino por la cadena respiratoria (Lambert y Brand, 2004; Szewczyk y Wojtczak, 2002).

En contraste a los ensayos de proliferación *in vitro* con células HeLa y SW-480, la reducción del consumo de oxígeno en AS-30D fue mayor en las células expuestas a la cherimolina-2 que a laherradurina. Aunque estos resultados no dejan de sorprendernos, un análisis de la reducción del consumo de oxígeno por las mitocondrias de hígado de rata expuestas a 20 acetogeninas, no muestra una relación entre su actividad y la adyacencia o no de los anillos bis THF adyacentes; además la bis THF adyacente bullatacina considerada como una de las acetogeninas más potentes tanto en los ensayos de inhibición sobre el complejo I como en los ensayos *in vitro* de proliferación celular, tuvo una actividad semejante a las bis no adyacentes bullatalicina (denominada actualmente cherimolina-1) y la bullatanocina (mejor conocida como cherimolina-2) (71 vs 75 y 69 nM). Debido a que en este estudio no fueron utilizados compuestos con lactona terminal saturada del tipo laherradurina, no es posible hacer alguna comparación con esta acetogenina (Landolt *et al.* 1995).

Se conoce que muchos compuestos lipofílicos o liposolubles en especial los ácidos grasos pueden llegar a la membrana interna mitocondrial. Las moléculas de acetogeninas debido a su cadena alifática pudieran ser buenas penetrantes de ellas facilitando su unión al complejo I o al sitio en donde ejercen su actividad. Debido a que las características funcionales del complejo I no son conocidas con claridad, la estructura-actividad de sus inhibidores es difícil de predecir; su potencia debe de estar determinada además de las interacciones específicas con la enzima por otros

factores celulares no específicos que afectan su acceso al sitio de unión (Miyoshi, 2001).

3.3.6 Conclusiones

- La respiración sensible a la oligomicina de las células AS-30 es inhibida de manera concentración dependiente por las acetogeninas.
- En presencia de α cetoglúamico, las mitocondrias de las células AS-30D expuestas a concentraciones bajas de acetogeninas, reducen el estado 3 asociado a la síntesis de ATP así como del estado 4 o basal, sin modificación del control respiratorio.
- En presencia de α cetoglúamico, las mitocondrias de células AS-30D expuestas a concentraciones altas de acetogeninas, reducen su estado 3 y 4 con modificación en el control respiratorio.
- Las concentraciones altas de las acetogeninas inducen el incremento del cociente ADP/O en las mitocondrias.

CAPÍTULO IV CONSIDERACIONES FINALES

Uno de los mayores retos en la búsqueda de nuevos medicamentos contra el cáncer es encontrar moléculas seguras, que actúen sobre los tumores resistentes a las drogas y que no produzcan efectos adversos en los pacientes. Las plantas poseen miles de metabolitos secundarios cuya variedad de estructuras aún se desconoce y que han tenido un papel importante en el descubrimiento y desarrollo de diversos fármacos incluyendo los oncológicos (Cragg *et al.*, 2005).

Dentro de los metabolitos característicos de la familia Annonaceae se encuentran las acetogeninas, cuya actividad inhibitoria sobre el complejo I mitocondrial les permite exhibir una amplia actividad biológica como la antitumoral, citotóxica, antiparasitaria, insecticida, y antimicrobiana (Zafra-Polo *et al.*, 1998).

Estas moléculas son candidatas en el desarrollo de fármacos antineoplásicos debido a que aún no se conocen mecanismos de resistencia a ellas por parte de las células tumorales (Oberlies *et al.*, 1997) y son buenas inductoras de la muerte celular programada mediante el incremento de factores pro- apoptóticos en la mitocondria (Yuan *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2005).

Entre las interrogantes necesarias de esclarecer se encuentra el mecanismo funcional de inhibición de las acetogeninas sobre el complejo I (Yagi., 2003), los factores que modulan su actividad en las líneas cancerosas (Pardhasaradhi cols., 2005) y la relación entre su potencia inhibitoria en el complejo I mitocondrial y su capacidad de impedir la proliferación de las células cancerosas (Royo *et al.*, 2003).

Desde el inicio de las investigaciones con las ACG, se reconoce que existe susceptibilidades diferentes a ellas por parte de las células neoplásicas y aunque se considera en general a las bis THF adyacentes como el grupo mas potente y el mono THF como el menos activo, algunas líneas celulares pueden ser mas sensibles a las segundas; mas aún, una acetogenina puede tener diferencias importantes en efectividad sobre diversas líneas celulares. (Zafra-Polo *et al.*, 1998).

Utilizando laherradurina (bis-THF adyacente con una lactona terminal β -hidroxil y metil saturada) y la cherimolina-2 (bis-THF no adyacente γ -lactona) aisladas de semillas de *A. diversifolia*, las líneas neoplásicas humanas de cervix CaSki, SiHa y HeLa, de mama MCF-7 y de colon SW-480 redujeron su proliferación a medida que fueron expuestas a concentraciones crecientes de acetogeninas o se incrementó su tiempo de exposición. Laherradurina tuvo la mayor actividad, especialmente en las células MCF-7, SW-480 y un poco menor en HeLa. Las líneas mas susceptibles a la cherimolina-2 fue HeLa y posteriormente a SW-480 y MCF-7.

Si bien la mayoría de las ACG son citotóxicas en las líneas neoplásicas, aún no es posible explicar la selectividad que presentan; entre los factores que pueden modularla se encuentran los factores estructurales de las moléculas además de las características propias de las células, incluyendo los eventos diferentes que de carcinogénesis que las indujo a transformarse; así, diversos genes pueden estar expresados y/o suprimidos, aún en las líneas que provienen de un mismo órgano como el caso de HeLa, CaSki y SiHa que son carcinomas de cervix.

A 96 h de exposición con $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de las ACG, las líneas celulares mostraron una reducción de la proliferación similar; sin embargo a tiempos menores, los porcentajes de reducción fueron heterogéneos e incluyeron periodos en donde no parece incrementarse el efecto de las acetogeninas, especialmente en las células SiHa y MCF-7. Fenómenos semejantes han sido documentados con otras acetogeninas (Nakanishi *et al.*, 2003) y es posible que sea el reflejo de un mecanismo de salvamento temporal, como el aumento en la glicólisis anaerobia característico de algunas células tumorales (Lu *et al.*, 2002), el cual al aumentar los tiempos de exposición sea finalmente superado.

Algunas acetogeninas han mostrado toxicidad durante su administración en animales de laboratorio y se ha relacionado su alto consumo con formas de parkinsonismo resistente a levodopa en poblaciones humanas (Ahmmadsahib *et al.*, 1993; Caparros-Lefebvre *et al.*, 1999). Dado el mecanismo de acción de las

acetogeninas sobre el complejo I, es fundamental conocer los efectos colaterales que puedan suscitarse durante su administración y evitar daños en las células normales.

Para relacionar la actividad de las ACG en los cultivos celulares (*in vitro*) con su efecto en el crecimiento de tumores sólidos de células homólogas (*in vivo*), dos tipos celulares neoplásicos se implantaron en ratones atímicos, quienes recibieron además, concentraciones crecientes de las ACG por vía subcutánea. La dosis inicial correspondió al número de micromoles de las ACG contenidos en la CE₅₀ de los ensayos de proliferación y multiplicado por el peso del animal (en gramos); Esta dosis fue sucesivamente incrementada 10, 100 y 500 veces.

Las líneas celulares de adenocarcinoma de cervix HeLa y colorectal SW-480 fueron utilizadas debido a su sensibilidad a las ACG, siendo la dosis eficaz media de laherradurina en ambas líneas celulares de 0.024 μM en tanto que la exhibida por la cherimolina -2 fue de 0.078 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en las células HeLa y de 0.78 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en SW-480.

Laherradurina administrada en la dosis 10x, 100x y 500x (0.24, 2.4 y 12 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$) redujo significativamente el tamaño de los tumores de células HeLa y en 100x y 500x (2.4 y 12 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$) los de SW-480. Por su parte la cherimolina-2 redujo el desarrollo de los tumores de células HeLa en las dosis de 100x y 500x (7.8 y 39 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$) aunque no mostró efectos inhibitorios significativos en los de SW-480.

Así, las concentraciones efectivas y los porcentajes de reducción de laherradurina y de la cherimolina-2 fueron cercanas a lo descrito para la annonacina y la bullatalicina (10 y 1 mg kg^{-1}); sin embargo, las ACG también indujeron efectos indeseables en los animales, lo que pudiera ser el resultado de su actividad inhibitoria sobre el complejo I mitocondrial en las células normales; la muerte de animales o la pérdida de peso en ellos, ha sido reportada con bullatacina a concentraciones arriba de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}\text{ día}^{-1}$ o con la bullatalicina (cherimolina-1) con 2 mg kg^{-1} (Ahammadsahi *et al.*, 1993), por lo que el grado de toxicidad debe depender

de la ACG utilizada, así como de su solubilidad, transporte celular y otros factores del organismo receptor.

Cuadro 8.1 Reducción final de los tumores en los animales que recibieron las concentraciones 100 y 500 veces la CE₅₀ de laherradurina y la cherimolina-2.

	Dosis analizada			Porcentaje de reducción en el tamaño de los tumores (tratados vs controles)	
		$\mu\text{mol g}^{-1}\text{día}^{-1}$	$\text{mg kg}^{-1}\text{día}^{-1}$	HeLa	SW-480
Laherradurina*	100x	2.4	1.5	55	45
	500x	12	7.5	65	60
Cherimolina-2	100x	7.8	5.0	30	
	500x	39	25.0	40	
	100x	78	50		38**
	500x		NA		NA

* Se administró concentraciones iguales de la ACG.
 ** Un animal sobreviviente al término del tratamiento
 NA. No analizada

La relación entre la potencia inhibitoria de las acetogeninas sobre el complejo I y su efecto sobre las células neoplásicas en cultivo se ha buscado en partículas submitocondriales abiertas donde las ACG no tienen barreras fisiológicas que impida su accesibilidad al sitio de unión del complejo I. Como ensayo alternativo se evaluó el efecto de las ACG sobre el consumo de oxígeno celular y por las mitocondrias, considerando que la respiración es un proceso acoplado a la fosforilación oxidativa y refleja la síntesis de ATP en este organelo.

Para medir el consumo de oxígeno se utilizó células o mitocondrias del hepatoma de rata AS-30D, en donde la mayoría del ATP proviene de la fosforilación oxidativa (Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2000). En ellas, la adición de las acetogeninas indujo una inhibición de la respiración celular. Por otro lado, las mitocondrias expuestas a las acetogeninas en presencia de ADP y P_i además de α cetoglutámico como sustrato oxidable para el complejo I mitocondrial, mostraron decrementos

significativos en el estado respiratorio 3 asociado con la síntesis de ATP y en el estado 4; las concentraciones altas de los inhibidores también modificaron el cociente respiratorio. Estos resultados indican que las acetogeninas pueden estar inhibiendo el transporte de electrones de la cadena respiratoria y afectando la síntesis de ATP mitocondrial. La mayor actividad de la cherimolina-2 en relación a laherradurina es posiblemente debida a que en tiempos cortos esta ACG pueda unirse fácilmente al complejo I aunque su actividad a tiempos mayores sea menor.

Debido al poco conocimiento que se tiene sobre el (o los) sitio de unión al complejo I (Degli. 1998; Tormo *et al.*, 1999), así como de los procesos de transferencia energética que suceden en este complejo multienzimático, aún no ha sido posible predecir la estructura óptima de sus inhibidores. En las acetogeninas, el largo de 13C en la cadena alifática del espaciador posibilita una mayor potencia inhibitoria (tipo laherradurina), aunque también debemos considerar que existen centros estereogénicos que seguramente influyen en su actividad.

La reducción de la respiración por parte de laherradurina y la cherimolina-2 podría indicar un descenso de la síntesis de ATP y comprometer los procesos dependientes de energía, como la duplicación celular. Así, una proliferación disminuida en los cultivos celulares y un desarrollo menor de los tumores en los ratones atómicos puede tener una explicación. Sin embargo, otros factores además de las ACG, deben estar involucrados entre ellos, la habilidad de encender los mecanismos defensivos a la apoptosis, como la inducción de factores anti-apoptóticos, la síntesis de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa así como el incremento del metabolismo anaeróbico.

La actividad de las ACG puede ser el resultado de la reducción de los niveles de ATP y la inducción de la apoptosis; ambos efectos serían difíciles de superar por las células. Lo anterior permite proponer a estos compuestos como candidatos en el desarrollo de fármacos antineoplásicos, incluyendo los tipos de cáncer que presentan multiresistencia a los farmacos o bien para ser utilizados como sensibilizadores durante la administración de otros quimioterapéuticos.

CAPÍTULO V. REFERENCIAS

- Abe M, Kenmochi A, Ichimaru N, Hamada T, Nishioka T and Miyoshi T. 2004. Essential structural features of acetogenins: role of hydroxy groups adjacent to the bis-THF rings. . *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14(3): 779-782.
- Abe M, Murai M, Ichimaru N, Kenmochi A, Yoshida T, Kubo A, Kimura Y, Moroda A, Makabe H, Nishioka T. and Miyoshi H. 2005. Dynamic function of the alkyl spacer of acetogenins in their inhibitory action with mitochondrial complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase). *Biochemistry.* 44(45): 14898-14906.
- Ahmmadsahib KI, Hollingworth RM, McGovren JP, Hui YH and McLaughlin, JL. 1993. Mode of action of bullatacin: a potent antitumor and pesticidal annonaceous acetogenin. *Life Sci.* 53(14): 1113-1120.
- Alali FQ, Liu XX and Mc Laughlin JL. 1999. Annonaceous acetogenins: recent progress. *J. Nat. Prod.* 62(3): 504 – 540.
- Alali FQ, Rogers L, Zhang Y and McLaughlin JL. 1998. Unusual bioactive annonaceous acetogenins from *Goniothalamus giganteus*. *Tetrahedron* 54(22): 5833-5844.
- Alvarez A, Novoa-Bermudez MJ y Boveris A. 1994. La mitocondria: estructura, función y especies reactivas del oxígeno. *Antioxidantes y Calidad de Vida.* 1-26.
- Anaya AL y Espinosa-García FJ. 2006. La química que entretiene a los seres vivos. *Ciencias.* 83, 4-13.
- Asakawa Y. 2001. Recent advances in phytochemistry of bryophytes-acetogenins, terpenoids and bis(bibenzyl)s from selected japanese, taiwanese, new zealand, argentinean and european liverworts. *Phytochemistry.* 56, 297-312.
- Aznavoorians S, Murphy AN, Steler–Stevenson WG. 1993. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* 71:1368.
- Bai Y, Hu P, Park JS, Deng JH, Song X, Chomyn A, Yagi, T and Attardi, G. 2004. Genetic and functional analysis of mitochondrial DNA-encoded Complex I Genes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1011, 272 – 283.
- Baylon Ch, Prestat G, Heck MP, Mioskowski Ch. 2000. Synthesis of (-)-(4R,5R)-muricatacin using a regio- and stereospecific ring-opening of a vinyl epoxide, *Tetrahedron Lett.* 41, 3833-3835.

- Bermejo A, Figadère B, Zafra-Polo MC, Barrachina I, Estornell E. and Cortes D. 2005. Acetogenins from annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat. Prod. Rep.* 22(3): 269– 303
- Bobadilla M, Zavala F, Sisniegas M, Zavaleta G, Mostacero J, Taramona L. 2005. Evaluación larvívica de suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus «guanábana» sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae). *Rev. Peru. Biol.* 12(1):145-152.
- Bobadilla M, Zavaleta G, Gil F, Pollack L, Sisniegas M. 2002. Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* miller "chirimoya" y *A. muricata* linnaeus "guanabana" sobre larvas del IV estadio de *Anophles sp.* *Rev. peru. biol.* 2002; 9 (2): 64 -73
- Bode HB and Müller R. 2003. Possibility of bacterial recruitment of plant genes associated with the biosynthesis of secondary metabolites. *Plant Physiol.* 132, 1153–1161.
- Boveris A. 1998. Regulación de la respiración mitocondrial por ADP, O₂ y NO. *Medicina.* 58, 559-560.
- Brantley-Finley Ch, Lyle CS, Du L, Goodwin ME, Hall T, Szewedo D, Causal GP, Timothy C and Chambers TC. 2003. The JNK, ERK and p53 pathways play distinct roles in apoptosis mediated by the antitumor agents vinblastine, doxorubicin, and etoposide. *Biochem. Pharmacol.* 66, 459–469.
- Bredel M, 2001. Anticancer drug resistance in primary human brain tumors. *Brain Res. Rev.* 35(2) 161–204.
- Brown JM, Wouters BG. 1999. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res.* 59,1391-1399.
- Butler MS. 2005. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. . *Nat. Prod. Rep.*22(2):162–195.
- Cai Y, Wu MH, Ludeman SM, Grdina DJ, and Dolan M.E. 1999. Role of o6-alkylguanine-dna alkyltransferase in protecting against cyclophosphamide-induced toxicity and mutagenicity. *Cancer Res.* 59, 3059 – 3063 pp.
- Caparros–Lefebvre D, Elbaz A and the Caribbean Parkinsonism Study Group. 1999. Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case- control study. *Lancet.* 354,(9175): 281-286 .

- Caparros-Lefebvre D and Lees AJ. 2005. Atypical unclassifiable parkinsonism on Guadeloupe: an environmental toxic hypothesis. *Mov. Disord. Suppl.* 12, 114-8.
- Cates RG. 1996. The role of mixtures and variation in the production of terpenoids in conifer-insect-pathogen interactions. En: J. Romeo, J. Saunders & P. Barbosa (Eds.) *Phytochemical diversity and redundancy in ecological interactions. Rec. Adv. Phytochem.* 30, 179-215.
- Cavé A, Figadère B, Laurens A and Cortes D. 1997. Acetogenins from Annonaceae. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, 70: 81-288.
- Champy P, Höglinger GU, Féger J, Gleye C, Hocquemiller R, Laurens, A, Guérineau V, Laprévotte O, Medja F, Lombe's A, Michel PP, Lannuzel A, Hirsch EC and Ruberg M. 2004. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical Parkinsonism in Guadeloupe. *J. Neurochem.* 88(1): 63–69.
- Champy P, Melot A, Guérineau EV, Gleye C, Fall D, Hoglinger GU, Ruberg M, Lannuzel A, Laprevote O, Laurens A, Hocquemiller R. 2005. Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Mov. Disord.* 20, 1629-1633.
- Chih HW, Chiu HF, Tang KS, Chang FR, Wu Y. 2001. Bullatacin, a potent antitumor annonaceous acetogenin, inhibits proliferation of human hepatocarcinoma cell line 2.2.15 by apoptosis induction, *Life. Sci.* 69(11): 1321-1331..
- Chiu HF, Chih TT, Hsian YM, Tseng CH, Wu MJ, Wu YC. 2003. Bullatacin, a potent antitumor Annonaceous acetogenin, induces apoptosis through a reduction of intracellular cAMP and cGMP levels in human hepatoma 2.2.15 cells, *Biochem. Pharmacol.* 65(3): 319-327.
- Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, Totteé J, Pieters L, Vlietinck AJ. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Ethnopharmacol.* 79(2): 213–220.
- Clarke R, Leonessa F, Welch JN, and Skaar TC. 2001. Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 53(1): 25 – 72..

- Coates-Estrada R and Estrada A. 1988. Frugivory and seed dispersal in *Cymbopetalum baillonii* (Annonaceae) at Los Tuxtlas, Mexico. *J. Trop. Ecol.* 4, (2):157-172.
- Colman-Saizarbitoria T, Johnson HA, Alali FQ, Hopp DC, Rogers LL, McLaughlin JL. 1998. Annohainin from *Annona jahni*: a possible precursor of mono-tetrahydrofuran acetogenins. *Phytochemistry.* 49(6):1609-1616.
- Colman-Saizarbitoria T, Alfonso D, McLaughlin JL. 1996. 2,4-cis- and trans-venezinones: new bioactive ketolactone annonaceous acetogenins, lacking tetrahydrofuran rings, from *Xylopiya aromatica*. *Phytochem. Anal.* 7:313–317.
- Cortes D, Myint SH, Dupont B and Davoust D. 1993 . Bioactive acetogenins from seeds of *Annona cherimolia*. *J. Phytochem.* 32(6) 1475–1482..
- Cotran RS, Kumar V and Collins T. 1999. Pathologic basis of disease. 6th edition. W.B. Saunders Company. USA.
- Cowan MM. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (4): 564–582.
- Cragg MG, Newman DJ, Yang SS. 2006. Natural product extracts of plant and marine origin having antileukemia potential. The NCI experience. *J. Nat. Prod.* 69(3): 488-498.
- Damaraju VL, Hamilton KH, Seth-Smith ML, Cass CE and Sawyer MB. 2005. Characterization of binding of folates and antifolates to brush-border membrane vesicles isolated from human kidney. *Mol. Pharmacol.* 67, 453 – 459 .
- Das S, Li LS, Abraham S, Chen Z, Sinha SC. 2005. A bidirectional approach to the synthesis of a complete library of adjacent-bis-THF annonaceous acetogenins. *J. Org. Chem.* 70 (15): 5922-5931.
- De la Cruz CI. 2001. Acetogeninas bioactivas de *Annona diversifolia* Saff. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, México. 1-77 pp.
- Degli M. 1998. Inhibitors of NADH–ubiquinone reductase: an overview. *Biochim. Biophys. Acta.* 1364 (2): 222–235..
- Depeille P, Cuq P, Passagne, SMI, Evrard A, Cupissol D and Vian L. 2004. Glutathione S-transferase M1 and multidrug resistance protein 1 act in synergy to protect melanoma cells from vincristine effects. *Mol. Pharmacol.* 65, 897 – 905.

- Dharmasena CMD, Blaney WM, Simmonds MSJ. 2001. Effect of storage on the efficacy of powdered leaves of *Annona squamosa* for the control of *Callosobruchus maculatus* on Cowpeas (*Vigna unguiculata*). *Phytoparasitica*. 29(3):1-6.
- Doebley J and Lukens, L. 1998. Transcriptional regulators and the evolution of plant form. *The plant cell*.10, 1075-1082 pp.
- Dudareva N, Pichersky E and Gershenzon J. 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol*.135(4): 1893–1902
- Dupuis A, Darrouzet E, Duborjal H, Cauvin B, Chevallet M, van Belzen R, Albracht SPJ and Lunardi J. 1998. The Complex I from *Rhodobacter capsulatus*. En .BBA-Special Issue on Complex I. 1364 (2),147-165 pp.
- Duret P, Hocquemiller R, Gantier JC and Figadère B. 1999. Semisynthesis and cytotoxicity of amino acetogenins and derivatives. *Bioorg. Med. Chem*. 7(9): 1821-1826.
- Duval RA, Duret P, Lewin G, Peris E and Hocquemiller R. 2005a. Semisynthesis and biological activity of aminoacyl triesters of squamocin, an annonaceous acetogenin. *Bioorg. Med. Chem*. 13 (11): 3773-3781.
- Duval RA, Lewin G, Peris E, Chahboune N, Garofano A, Droese S, Cortes D, Brandt U, Hocquemiller R. 2006. Heterocyclic analogues of squamocin as inhibitors of mitochondrial complex I. On the role of the terminal lactone of annonaceous acetogenins. *Biochemistry*. 45 (8): 2721-2728.
- Duval RA, Poupon E, Brandt U, Hocquemiller R. 2005b. Remarkable substituent effect: beta-aminosquamocin, a potent dual inhibitor of mitochondrial complexes I and III. *Biochim. Biophys Acta*. 1709 (3): 191-194.
- Ejechi BO and Akpomedaye DE. 2005. Activity of essential oil and phenolic acid extracts of pepperfruit (*Dennetia tripetala* G. Barker; Anonaceae) against some food-borne microorganisms. *Afr. J. Biotechnol*. 4 (3): 258-261.
- El Tahir A, Sattia G, Khalid S. 1999. Antiplasmodial activity of selected Sudanese medicinal plants with emphasis on *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell. *J. Ethnopharmacol*. 64(3): 227–233.

- Espinosa-García FJ. 2001. La diversidad de los metabolitos secundarios y la teoría de la defensa vegetal. En: Anaya, A. L, Espinosa-García, F. J. y Cruz-Ortega, R. (Eds.). Relaciones químicas entre organismos. Aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. pp. 231-249. Universidad Nacional Autónoma de México y Plaza y Valdés. México, D. F.
- Estornell E, Tormo JR and Cortes D. 1997. Cherimolin-1, new selective inhibitor of the first energy-coupling site of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240(1): 234–238.
- Fujita D, Ichimaru N, Abe M, Murai M, Hamada T, Nishioka T and Miyoshi H. 2005. Synthesis of non-THF analogs of acetogenin toward simplified. *Tetrahedron Lett.* 46 (34): 5775-5779.
- Gaidano ME, Goodman SN, Zagonel V, Capello D, Botto B, Rossi D, Gloghini A, Vitolo U, Carbone A, Baylin SB and Herman JG. 2002. Hypermethylation of the DNA repair gene O6-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large b-cell lymphoma. *J. Natl. Can. Inst.* 94, 26– 32.
- Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer. J Clin.* 55 ,178 –194.
- Gleye C, Raynaud S, Hocquemiller R, Laurens A, Fourneau C, Serani L, Laprèvote O, Roblot F, Leboeuf M, Fournet A, Rojas de Arias A, Figadère B and Cavé A. 1998. Muricadienin, muridienins and chatenaytrienins, the early precursors of annonaceous acetogenins. *Phytochemistry.* 47(5):749-754.
- Fogh J and Giovanella BC.1982. En: *The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research.* Fogh, J; Giovanella, BC (eds) Academic Press 502 pp.
- González-Coloma A, Guadaño A, Concepción I, Martínez-Díaz R, and Cortes D. 2002. Selective Action of Acetogenin Mitochondrial Complex I Inhibitors. *Z. Naturforsch.* 57(11-12): 1028-1034.
- González-Esquinca AR. 2005. La familia Annonaceae en Chiapas y sus metabolitos. *Revista Ciencia y Tecnología en la Frontera, COCYTECH.* Año II, número 3

- González-Esquinca AR. 2001 Contribución al estudio del género *Annona* (Annonaceae), análisis fitoquímico de tres especies del estado de Chiapas. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 251 pp.
- González-Esquinca AR, Luna-Cazáres LM, Schlie-Guzmán MA, Laguna-Hernández G. 2007. Actividad Insecticida de anonas sobre la mosca mexicana de la fruta: Papausa, guanábana y anona amarilla. Manual técnico. Plantarum. UNICACH.
- Gros EG, Pomilio AB, Soldo AM y Burton G. 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. 1ª. Edición. Serie química No 30. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos.
- Gu ZM, Zhou D, Lewis NJ, Wu J, Shi G, McLaughlin JL. 1997. Isolation of new bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa* guided by liquid chromatography/mass spectrometry. *Bioorg. Med. Chem.* 5(10):1911-1916.
- Guadaño A, Gutierrez C, de la Peña E, Cortes D, González-Coloma A. 2000. Insecticidal and mutagenical evaluation of two annonaceous acetogenins. *J. Nat. Prod.* 63(6): 773-776.
- Gudipati V, Curran DP, Wilcox CS. 2006. Solution-phase parallel synthesis with oligoethylene glycol sorting tags. Preparation of all four stereoisomers of the hydroxybutenolide fragment of murisolin and related acetogenins. *J. Org. Chem.* 71(9): 3599-3607.
- Guerrero A, Debitus C, Laurent D, D'Ambrosio M, Pietra F. 1998. Aztèquynol A, the first clearly defined, C-branched polyacetylene and the analogue Aztèquynol B. Isolation from the tropical marine sponge *Petrosia* sp. *Tetrahedron Lett.* 39(25): 6395-6398.
- Gupta, ML, Bode CJ, Georg GI and Himes RH. 2003. Understanding tubulin–taxol interactions: mutations that impart taxol binding to yeast tubulin. *PNAS.* . 100(11): 6394 – 6397.
- Hajitou A, Grignet-Debrus CG, Sarah Berndt LD, Blacher S, Deroanne CF, Bajou K, Fong T, Chiang Y, Foidart JM. and Noël A. 2002. The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells. *FASEB J*, 16(13): 1802- 1804.
- Hamada T, Ichimaru N, Abe M, Fujita D, Kenmochi A, Nishioka T, Zwicker K, Brandt U, Miyoshi H. 2004. Synthesis and inhibitory action of novel acetogenin mimics with bovine heart mitochondrial complex I. *Biochemistry.* 43(12): 3651-3658.

- Hanessian S, Giroux S, Buffat M. 2005. Total synthesis and structural confirmation of (+)-longicin. *Org. Lett.* 7(18): 3989-3992.
- Harker WG, Bauer D, Etiz BB, Newman RA and Sikic BI. 1986. Verapamil-mediated sensitization of doxorubicin-selected pleiotropic resistance in human sarcoma cells: selectivity for drugs which produce DNA scission. *Cancer Res.* 46(5): 2369-2373.
- Hasan CM, Rashid MA, Haider SS and Reza MS. 1994. Review of chemical constituents and biological activities of annonaceous plants of Bangladesh. *Bangla.JOL.* 6, 1-10.
- Hasrat JA, Pieters L, De Backer JP, Vauquelin G and Vlietinck AJ. 1997 Screening of medicinal plants from Suriname for 5-HT_{1a} ligands: bioactive isoquinoline alkaloids from the fruit of *Annona muricata*. *Phytomedicine*, 4,133-140
- He YT, Xue S, Hu TS and Yao ZJ. 2005. An iterative acetylene–epoxide coupling strategy for the total synthesis of longimicin. *Tetrahedron Lett.* 46(32): 5393-5397.
- He K, Zhao GX, Shi G, Zeng L, Chao JF, McLaughlin JL. 1997. Additional bioactive annonaceous acetogenins from *Asimina triloba* (Annonaceae). *Bioorg. Med. Chem.* 5 (3):501-506
- Hemminki H. 1985. Binding of metabolites of cyclophosphamide to DNA in a rat liver microsomal system and in vivo in mice. *Cancer. Res.* 45(9): 4237- 4243.
- Hu Y, Cecil AR, Frank X, Gleye C, Figadere B, Brown RC. 2006. Natural cis-solamin is a mixture of two tetra-epimeric diastereoisomers: biosynthetic implications for Annonaceous acetogenins. *Org. Biomol. Chem.* 4, 1217-1219.
- Huang Y and Fan W. 2002. I κ B kinase activation is involved in regulation of paclitaxel-induced apoptosis in human tumor cell lines. *Mol. Pharmacol.* 61(1): 105–113.
- Huang Y, Fang Y, Wu J, Dziadyk JM, Zhu X, Sui M and Fan W. 2004. Regulation of Vinca alkaloid-induced apoptosis by NF-KB/I κ B pathway in human tumor cells. *Mol. Cancer. Ther.* 3(3): 271–277.
- Hutchinson J. 1964. *The Genera of Flowering Plants. Dicotyledones.* Oxford at the Clarendon Press. I: 70 – 109 pp.
- Ichimaru N, Abe M, Murai M, Senoh M, Nishioka T, Miyoshi H. 2006. Function of the alkyl side chains of Δ lac-acetogenins in the inhibitory effect on mitochondrial complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16(13): 3555-3558.

- Ichimaru N, Murai M, Abe M, Hamada T, Yamada Y, Makino S, Nishioka T, Makabe H, Makino A, Kobayashi T, Miyoshi H. 2005. Synthesis and inhibition mechanism of Delta lac-acetogenins, a novel type of inhibitor of bovine heart mitochondrial complex I. *Biochemistry*. 44(2): 816-825.
- Illmer Y, Schuler US, Thiede C, Schwarz UI, Kim RB, Gotthard S, Freund S, Schäkel U, Ehninger G and Schaich, M. 2002. MDR1 Gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Res*. 62(17): 4955–4962.
- IMSS. 2005. El IMSS en Cifras. Los tumores malignos en población derechohabiente, 1990-2003. División Técnica de Información Estadística en Salud. *Rev Med IMSS*. 43 (4): 349-356 pp.
- INEGI. 2003. Cuaderno estadístico municipal. Tuxtla Gutiérrez. INEGI. México. 3-17 pp.
- Jaramillo MC, Arango GD, González MC, Robledo SM, Velez ID. 2000. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia* 71, 183-186 pp.
- Juranka PF, Zastawny RL and Ling V. 1989. P-glycoprotein: multidrug resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. *FASEB J*. 3(14): 2583-2592.
- Kamanzi K, Schmid C, Brun R, Konéa MW and Traorea, D. 2004. Antitrypanosomal and antiplasmodial activity of medicinal plants from Côte d'Ivoire. *J. Ethnopharmacol*. 90 (1-2): 221-227 pp.
- Kant MR, Ament K, Sableéis MW, Haring MA and Schuurink RC. 2004. Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. *Plant Physiol*. 135(1): 483–495.
- Kao M-C, Di-Bernardo S, Perego M, Nakamaru-Ogiso E, Matsuno-Yagi A and Yagi T. 2004. Functional roles of four conserved charged residues in the membrane domain subunit NuoA of the proton-translocating NADH-Quinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*. 279(31): 32360-32366..
- Kaufmann SH and Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. 2000. *Exp. Cell Res*. 256(1): 42–49.
- Kim EJ, Suh KM, Kim DH, Jung EJ, Seo CS, Son JK, Woo MH, McLaughlin JL. 2005. Asimitrin and 4-hydroxytrilobin, new bioactive annonaceous acetogenins from the seeds of *Asimina triloba* possessing a bis-tetrahydrofuran ring. *J. Nat. Prod*. 68(2): 194-197.

- Kim GS, Zeng L, Alali F, Rogers LL, Wu FE, Sastrodihardjo S, McLaughlin JL. 1998. Muricoreacin and murihexocin C, mono-tetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata*. *Phytochem.* 49(2):565-571.
- Kiue A, Sano T, Suzuki K, Inada H, Okumura M, Kikuchi J, Sato S, Kohno K and Kuwano M. 1990. Activities of newly synthesized dihydropyridines in overcoming of vincristine resistance, calcium antagonism, and inhibition of photoaffinity labeling of P-glycoprotein in rodents. *Cancer. Res.* 50(2): 310 – 317.
- Kojima N, Maezaki N, Tominaga H, Yanai M, Urabe D, Tanaka T. 2004. Stereodivergent and reiterative synthesis of bistetrahydrofuran ring cores of annonaceous acetogenins. 10(3): 672-680..
- Konno H, Hiura N, Makabe H, Abe M and Miyoshi, H. 2004. Synthesis and mitochondrial complex I inhibition of dihydroxy-cohibin A, non-THF annonaceous acetogenin analogue. . *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14(13): 629-632.
- Lage H. 2003. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Inter. J. Antimicrobiol. Agents.* 22(3): 188-199.
- Lambert AJ and Brand MD. 2004 .Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *J. Biol. Chem.* 279(38): 39414 – 39420..
- Landolt JL, Ahammadsahib KI, Hollingworth RM, Barr R, Crane FL, Buerckv NL, McCabe GP and McLaughlin JL. 1995. Determination of structure-activity relationships of annonaceous acetogenins by inhibition of oxygen uptake in rat liver mitochondria. *Chem. Biol. Interact.* 98(1): 1-13.
- Lannuzel A, Michel PP, Höglinger GU, Champy P, Jousset A, Medja F, Lombès A, Darios F, Gleye C, Laurens A, Hocquemiller R, Hirsch EC and Ruberg M. 2003. The mitochondrial complex I inhibitor annonacin is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism. *Neurosci.* 121(2): 287-296..
- Leatemala JA and Isman MB. 2004. Insecticidal activity of crude seed extracts of *Annona* spp, *Lansium domesticum* and *Sandoricum koetjape* against lepidopteran larvae. *Phytoparasitica* 32(1):30-37.

- Lebedeva I, Rando R, Ojwang J, Cossum P, Stein CA. 2000. BCL-xL in prostate cancer cells: effects of overexpression and downregulation on chemosensitivity. *Cancer Res.* 60(21): 6052-6060.
- Lehninger. Principles of Biochemistry. David L Nelson and Micael M Cox. 4 th edition. 2005. W H Freeman. New York.
- Lewis MA, Arnason JT, Philogene BJ, Rupprecht JK, McLaughlin JL. 1993. Inhibition of respiration at site I by asimicin, an insecticidal acetogenin of the pawpaw, *Asimina triloba* (Annonaceae). *Pest. Biochem. Physiol.* 45(1): 15-23.
- Lin MZ, Teitell MA and Schiller GJ. 2005. The Evolution of antibodies into versatile tumor-argeting agents. *Clin. Cancer Res.* 11(1). 129 – 138
- Liu HX and Yao ZJ. 2005. Synthesis of a tetra-deuterium-labeled derivative of potent and selective anticancer agent AA005. *Tetrahedron Lett.* 46(20): 3525-3528.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SA, Matsudaira P, Baltimore D, and Darnell J. En: *Biología celular y molecular.* 4a Edición. 2003. Médica Panamericana (Eds) Buenos Aires, Argentina. 664-674 pp.
- Loeb L. 1994 Microsatellite instability: marker of mutation phenotype. *Cancer Res.* 54, 5059.
- Lu H, Forbes RA and Verma A. 2002. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J. Biol. Chem.* 277(26): 23111–23115.
- Lu MC, Yang SH, Hwang SL, Lu YJ, Lin YH, Wang SR, Wu YC, Lin SR. 2006. Induction of G2/M phase arrest by squamocin in chronic myeloid leukemia (K562) cells. *Life Sci.* 78(20):, 2378 – 2383.
- Makabe H, Higuchi M, Konno H, Murai M, Miyoshi H. 2005. Synthesis of (4R,15R,16R,21S)- and (4R,15S,16S,21S)-rollicosin. *Tetrahedron Lett.* 46((27): 4671-4675.
- Makabe H, Hattori Y, Kimura Y, Konno H, Abe M, Miyoshi H, Tanaka A, Oritani T. 2004a. Total synthesis of cis-solamin and its inhibitory action with bovine heart mitochondrial complex. *Tetrahedron,* 60((47): 10651-10657.

- Makabe H, Miyawaki A, Takahashi R, Hattori Y, Konno H, Abe M, Miyoshi H. 2004 b. Synthesis of two possible diastereomers of reticulatain-1. *Tetrahedron Lett.* 45 (5): 973-977.
- Margotta R. 1972. La Medicina en Mesopotamia pp 20-24. En: *Historia de la Medicina Ed.* Novarro, México D.F. 304 pp.
- Marx J. 1994. How cells cycle toward cancer. *Science* 263 (5145):319-321.
- Matsuno-Yagi A and Yagi T. 2001. Complex I an L-shaped black box. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33 (3) 155-157.
- Mertz E, Tinsley JM, Roush WR. 2005. [3+2]-annulation reactions of chiral allylsilanes and chiral aldehydes. Studies on the synthesis of bis-tetrahydrofuran substructures of annonaceous acetogenins. *J. Org. Chem.* 70 (20): 8035-8046.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G and Gianni L. 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 56(2): 185–229.
- Miyoshi H. 2001. Probing the ubiquinone reduction site in bovine mitochondrial Complex I using a series of synthetic ubiquinones and inhibitors. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33(3), 223-231 pp.
- Miyoshi H, Ohshima M, Shimada H, Akagi T, Iwamura H, McLaughlin JL. 1998. Essential structural factors of annonaceous acetogenins as potent inhibitors of mitochondrial complex. *Biochim Biophys Acta.* 1365(3): 443-452.
- Morré DJ, de Cabo R, Farley C, Oberlies NH, McLaughlin JL. 1995. Mode of action of bullatacin, a potent antitumor acetogenin: inhibition of NADH oxidase activity of HeLa and HL-60, but not liver, plasma membranes. *Life Sci.* 56 (5):343-348.
- Morton J. 1987. Ilima. En: *Fruits of warm climates.* p. 83–85. Julia F. Morton, Miami, FL.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65 (1-2): 55–63.
- Motoyama T, Yabunaka H and Miyoshi H. 2002. Essential structural factors of acetogenins, potent inhibitors of mitochondrial complex I, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12(16): 2089-2092.

- Nakanishi Y, Chang FR, Liaw CC, Wu CY, Bastow KF and Lee KH. 2003. Acetogenins as selective inhibitors of the human ovarian 1A9 tumor cell line. *J. Med. Chem.* 46(15):3185-3188.
- Newman DJ, Cragg GM and Snader KM. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 66(7): 1022-1037.
- Oberlies NH, Chang C and McLaughlin J.L. 1997a. Structure-activity relationships of diverse annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF-7/Adr) cells. *J. Med. Chem.* 40(13): 2102-2106.
- Oberlies NH, Croy VL, Harrison ML and McLaughlin JL. 1997b. The annonaceous acetogenin bullatacin is cytotoxic against multidrug-resistant human mammary adenocarcinoma cells. *Cancer Lett.* 115(1): 73-79.
- Oberlies NH, Jones JL, Corbett TH, Fotopoulos SS and McLaughlin JL. 1995. Tumor cell growth inhibition by several annonaceous acetogenins in an in vitro disk diffusion assay. *Cancer Lett.* 96(1): 55-62.
- Ochoa FJ. 2008. Editorial. 4 de febrero, Día mundial contra el cáncer. *GAMO.* 7(1): 1-2 pp.
- Orth M and Schapira AHV. 2002. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease. *Neurochem. Inter.* 40(6): 533-541.
- Padma P, Pramod NP, Thyagarajan SP, Khosa RL. 1998. Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on Herpes simplex virus. *J. Ethnopharmacol.* 61(1): 81-83.
- Padmaja V, Thankamany V, Hishati A. 1993. Antibacterial, antifungal and anthelmintic activities of root barks of *Uvaria hookeri* and *Uvaria narum*. *J. Ethnopharmacol.* 40(3): 181-186 pp.
- Pardhasaradhi BV, Reddy M, Ali AM, Kumari AL, Khar A. 2005. Differential cytotoxic effects of *Annona squamosa* seed extracts on human tumour cell lines: role of reactive oxygen species and glutathione. *J. Biosci.* 30(2):237-244.
- Perales-Segovia C y Martínez-Díaz E. 1999. Control de la mosca de la fruta con extractos de *Annona squamosa* (Annonaceae). II International Congress of Annonaceae. Tuxtla Gutierrez, Chiapas. Mx.

- Pérez Amador MC, González-Esquinca A, García-Argáez A, Bratoeff E, Labastida C. 1997. Oil composition and flavonoid profiles of the seeds of three *Annona* Species. *Phyton* 61(1/2): 77 – 80.
- Pérez-Pacheco R, Rodríguez-Hernández C, Lara-Reyna J, Montes-Belmont R, Ramírez-Valverde G. 2004. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Díptera: Culicidae). *Acta Zoo. Mex.* 20 (1), 141-152.
- Pichersky E and Gang DR. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.* 5(10): 439-445.
- Pincemin S. 1999. Evidencias del uso de las anonas entre los mayas prehispánicos. En: *Memorias del II International Congress of Annonaceae*, Tuxtla Gutierrez, Chiapas. Mx.
- Pinto AC de Q, Cordeiro MCR, de Andrade SRM, Ferreira FR, Filgueiras HA, Alves RE, Kinpara DI. 2005. *Annona* species. En: *Annona species*. Williams JT, Smith RW, Hughes A, Haq N, Clement CR (Edit.). *Internacional Centre for Underutilised Crops*, University of Southampton. UK. 284.
- Piñol MT, Palazón J. 1993. Metabolismo Secundario. En: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Interamericana Mc. Graw – Hill. España
- Prestat G, Baylon C, Heck MP, Grasa GA, Nolan SP, Mioskowski C. 2004. New strategy for the construction of a monotetrahydrofuran ring in annonaceous acetogenin based on a ruthenium ring-closing metathesis: application to the synthesis of solamin. *J. Org. Chem.* 69(17): 5770-5773.
- Procaccio V, Mousson B, Beugnot R, Duborjal H, Feillet F, Putet G, Pignot-Paintrand I, Lombès A, De Coo R, Smeets H, Lunardi J, Issartel JP. 1999. Nuclear DNA origin of mitochondrial complex I deficiency in fatal infantile lactic acidosis evidenced by transnuclear complementation of cultured fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 104,(1): 83–92.
- Quinn KJ, Isaacs AK, De Christopher BA, Szklarz SC, Arvary RA. 2005. Asymmetric total synthesis of rollicosin. *Org. Lett.* 7(7): 1243-1245.
- Rakotomanga M, Razakantoanina V, Raynaud S, Loiseau PM, Hocquemiller R, Jaureguiberry G. 2004. Antiplasmodial activity of acetogenins and inhibitory effect on *Plasmodium falciparum* adenylate translocase. *J. Chemother.* 16(4): 350-356.

- Ramu E, Bhaskar G, Venkateswara-Rao B and Ramanjaneyulu GS. 2006. Stereoselective synthesis of bis-hydroxy-tetrahydrofurans using cross metathesis. *Tetrahedron Lett.* 47(20): 3401-3403.
- Ratnayake S, Gu ZM, Miesbauer LR, Smith DL, Wood KV, Evert DR, McLaughlin JL. 1994. Parvifloracin and parviflorin: cytotoxic bistetrahydrofuran acetogenins with 35 carbons from *Asimina parviflora* (Annonaceae). *Can. J. Chem.* 72: 287-293.
- Raynaud S, Némati F, Miccoli L, Michel P, Poupon MF, Fourneau C, Laurens A and Hocquemiller R. 1999. Antitumoral effects of squamocin on parental and multidrug resistant MCF7 (human breast adenocarcinoma) cell lines. *Life Sci.* 65(5): 525-533.
- Raynaud-Le Grandic S, Fourneau C, Laurens A, Bories C, Hocquemiller R, Loiseau PM. 2004. In vitro antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. *Biomed Pharmacother.* 58(6-7): 388-392.
- Richardson ME and Siemann DW. 1995. DNA damage in cyclophosphamide-resistant tumor cells: the role of glutathione. *Cancer. Res.* 55(88): 1691– 1695.
- Robert J. 2001. Resistance to cytotoxic agents. *Cancer.* 1, 353–35.
- Rodríguez-Enriquez S and Moreno-Sanchez R. 1998. Intermediary metabolism of fast-growth tumor cells. *Arch. Med. Res.* 29(1): 1-12.
- Rodríguez-Enriquez S, Torres-Marquez ME, Moreno-Sanchez R. 2000. Substrate oxidation and ATP supply in AS-30D hepatoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 375(1): 21-30.
- Rodríguez-Enriquez S, Vital-Gonzalez PA, Flores-Rodríguez FL, Marin-Hernandez A, Ruiz-Azuara L, Moreno-Sanchez R. 2006. Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 215(2): 208-217.
- Royo I, DePedro N, Estornell E, Cortes D, Peláez F and Tormo, J.R. 2003. In vitro antitumor SAR of *threo/cis/threo/cis/ erythro* bis THF acetogenins: correlations with their inhibition of mitochondrial complex I. *Onco. Res.* 13(12): 521-528.
- Schuler F, Yano T, Di Bernardo S, Yagi T, Yankovskaya V, Singer TP, Casida JE. 1999. NADH-quinone oxidoreductase: PSST subunit couples electron transfer from iron-sulfur cluster N2 to quinone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(7): 4149–4153.

- Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Greenamyre JT. 2003. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 23(34): 10756 –10764.
- Silverman AP, Bu W, Cohen SM, and Lippard SJ. 2002. 2.4-Å Crystal structure of the asymmetric platinum complex {Pt(amine)(cyclohexylamine)}₂⁺ bound to a dodecamer DNA duplex. *J. Biol. Chem.* 277(51): 49743 – 49749.
- Singh P, Singh VK, Singh DK. 2005. Effect of binary combination of some plant-derived molluscicides with MGK-264 or piperonyl butoxide on the reproduction of the snail *Lymnaea acuminata*. *Pest. Manag. Sci.* 61(2): 204-208.
- Shi G, Gu ZM, He K, Wood KV, Zeng L, Ye Q, MacDougal JM, McLaughlin JL. 1996. Applying Mosher's method to acetogenins bearing vicinal diols. The absolute configurations of muricatetrocin C and rollidecins A and B, new bioactive acetogenins from *Rollinia mucosa*. *Bioorg. Med. Chem.* 4(8):1281-1286.
- Slapak CA, Mizunuma N and Kufe DW. 1994. Expression of the multidrug resistance associated protein and p-glycoprotein in doxorubicin-selected human myeloid leukemia cells. *Blood.* 84(9): 3113-3121.
- Son JK, Kim DH, Woo MH. 2003. Two new epimeric pairs of acetogenins bearing a carbonyl group from *Annona cherimolia* seeds. *J. Nat. Prod.* 66(10):1369-1372.
- Standley PC y Steyermark JA. 1946. Flora de Guatemala. Fieldiana Botany. Chicago Natural History Museum. U.S.A. Part IV. 24 (4), 270 –294 pp.
- Strand D, Norrby PO, Rein T. 2006. Divergence en route to nonclassical annonaceous acetogenins. Synthesis of pyranicin and pyragonin. *J. Org. Chem.* 71(5): 1879-1891.
- Sundberg JP. 1994. The nude (*nu*) and streaker (*nu^{str}*) mutations, chromosome 11 En: Handbook of Mouse Mutations with Skin and Hair Abnormalities: Animal Models and Biomedical Tools. CRC Press.
- Sunnaram BL, Gandemer V, Sebillot M, Grandgirard N, Amito L, Leray E, Goasguen JE. 2003. LRP overexpression in monocytic lineage. *Leuk. Res.* 27(8): 755–759.
- Szewczyk A. and Wojtczak L. 2002. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol. Rev.* 54(1): 101–127.

- Takada M, Kuwabara K, Nakato H, Tanaka A, Iwamura H, Miyoshi H. 2000. Definition of crucial structural factors of acetogenins, potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Biochim. Biophys. Acta.* 1460(2-3): 302-310.
- Takahashi JA, Pereira CR, Pimenta LP, Boaventura MA, Silva LG. 2006. Antibacterial activity of eight Brazilian annonaceae plants. *Nat. Prod. Res.* 20(1): 21-26.
- Tian SK, Wang ZM, Jiang JK and Shi M. 1999. Stereocontrolled construction of the trans-tetrahydrofuran units in annonaceous acetogenins. *Tetrahedron.* 10(13): 2551-2562.
- Tormo JR, DePedro N, Royo I, Barrachina I, Zafra-Polo MC, Cuadrillero C, Hernández P, Cortes D and Peláez F. 2005. In vitro antitumor structure-activity relationships of *threo/trans/threo/trans/erythro* bis-tetrahydrofuranic acetogenins: correlations with their inhibition of mitochondrial complex I. *Onco. Res.* 15(3): 129-138.
- Tormo JR, Estornell E, Gallardo T, González MC, Cavé A, Granell S, Cortes D, Zafra-Polo MC. 2001. γ -Lactone-functionalized antitumoral acetogenins are the most potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Bioogr. Med. Chem. Lett.* 11(5): 681-684.
- Tormo JR, Gallardo T, Aragon R, Cortes D, Estornell E. 1999a. Specific interactions of monotetrahydrofuranic annonaceous acetogenins as inhibitors of mitochondrial complex I. *Chem. Biol. Interact.* 122(3): 171–183.
- Tormo JR, Gallardo T, González MC, Bermejo A, Cabedo N, Andreu I, Estornell E. 1999b. Annonaceous acetogenins as inhibitors of mitochondrial complex I. *Curr. Top. Phytochem.*, 2: 69–90.
- Tormo JR, Gallardo T, Peris E, Bermejo A, Cabedo N, Estornell E, Zafra-Polo MC and Cortes D. 2003a. Inhibitory effects on mitochondrial complex I of semisynthetic mono-tetrahydrofuran acetogenin derivatives, *Bioor. Med. Chem. Lett.* 13(22): 4101-4105.
- Tormo JR, González MC, Cortes D and Estornell E. 1999c. Kinetic characterization of mitochondrial complex I inhibitors using annonaceous acetogenins. *Arch. Biochem. Biophys.* 369(1): 119-126.
- Tormo JR, Royo I, Gallardo T, Zafra-Polo MC, Hernandez P, Cortes D, Pelaez F. 2003b. In vitro antitumor structure-activity relationships of *threo/trans/threo* mono-tetrahydrofuranic acetogenins: correlations with their inhibition of mitochondrial complex I. *Oncol. Res.*, 14(3): 147-154..

- Vogelstein B and Kinzler KW. 1993. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 9(4): 138-141.
- Volk EL, Rohde K, Rhee M, McGuire JJ, Doyle LA, Ross DD, Schneider E. 2000. Methotrexate cross-resistance in a mitoxantrone-selected multidrug-resistant MCF7 breast cancer cell line is attributable to enhanced energy-dependent drug efflux. *Cancer Res.* 60(13): 3514–3521 pp.
- Wallace DC. 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* 39: 359-407.
- Wang M, Chen Y, Lou L, Tang W, Wang X and Shen J. 2005. Synthesis of pyrrolidine analogues of solamin. *Tetrahedron Lett.* 46(32): 5309-5312.
- Wang LQ, Min BS, Li Y, Nakamura N, Qin GW, Li CJ, Hattori M. 2002. Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona montana*. *Bioorg. Med. Chem.* 10(3):561-565.
- Warmerdam E, Tranoy I, Renoux B, Gesson JP. 1998. Study of butyrolactones related to sub-type 3 annonaceous acetogenins. Structure revision of itrabin, jetein, laherradurin and otivarin, *Tetrahedron Lett.* 39,(44): 8077-8080.
- Waterman PG. 1984. Unusual metabolites from some african Annonaceae. *Rev. Latinoamer. Quím.* 15 (3), 90 – 96.
- Wélé A, Zhang Y, Ndoye I, Brouard JP, Pousset JL, Bodo B. 2004. A cytotoxic cyclic heptapeptide from the seeds of *Annona cherimola*. *J. Nat. Prod.* 67(9): 1577-1579.
- Wolvetang EJ, Johnson KI, Krauer K, Ralph SJ, Linnane AW. 1994. Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis. *FEBS Lett.* 339(1-2): 40-44.
- Woo MH, Chung SO, Kim DH. 2000. Asitrilobins C and D: two new cytotoxic mono-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Asimina triloba* seeds. *Bioorg. Med. Chem.* 8(1): 285-290.
- Woo MH, Kim DH, McLaughlin JL. 1999. Asitrilobins A and B: cytotoxic mono-THF annonaceous acetogenins from the seeds of *Asimina triloba*. *Phytochem.* 50(6):1033-1040.
- Woo MH, Zeng L, McLaughlin JL. 1995. Asitribin and asiminenins A and B, novel bioactive annonaceous acetogenins from the seeds of *Asimina triloba*. *Heterocycles.* 41(8): 1731-1742.

- Yabunaka H, Abe M, Kenmochi A, Hamada T, Nishioka T, Miyoshi H. 2003. Synthesis and inhibitory activity of ubiquinone–acetogenin hybrid inhibitor with bovine mitochondrial complex I. *Bioorg Med. Chem. Lett.* 13(14):2385–2388..
- Yagi T, Yano T, Di Bernardo S and Matsuno-Yagi A. 1998. Overview: Prokaryotic Complex I (NDH-1). *Biochim. Biophys. Acta.* 1364(2) : 125-133.
- Yamada M, O'Regan E, Brown R, Karran P. 1997. Selective recognition of a cisplatin-DNA adduct by human mismatch repair proteins. *Nucleic Acids Res.* 25(3): 491– 496.
- Ye Q, Alfonso D, Evert D, McLaughlin JL. 1996a. Longifolicin, longicoricin, and gigantetronenone, three novel bioactive mono-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Asimina longifolia* (Annonaceae). *Bioorg. Med. Chem.* 4(4):537-545.
- Ye Q, He K, Oberlies NH, Zeng L, Shi G, Evert D, McLaughlin JL. 1996b. Longimicins A-D: novel bioactive acetogenins from *Asimina longifolia* (Annonaceae) and structure-activity relationships of asimicin type of annonaceous acetogenins. *J. Med. Chem.* 39(9):1790-1796.
- Ye Q, Zeng L, Shi G, Evert D, McLaughlin JL. 1996c. 4-acetyl annonacin and 4-acetyl xylomaticin: two novel bioactive mono-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Asimina longifolia* (Annonaceae). *Nat. Prod. Res.* 8(4):291–298.
- Ye Q, Zeng L, Zhang Y, Zhao GX, McLaughlin JL, Woo MH, Evert DR. 1995. Longicin and goniothalamycinone: novel bioactive monotetrahydrofuran acetogenins from *Asimina longifolia*. *J. Nat. Prod.* 58(9):1398- 406.
- Yuan SS, Chang HL, Chen HW, Kuo FC, Liaw CC, Su JH, Wu YC. 2006. Selective cytotoxicity of squamocin on T24 bladder cancer cells at the S-phase via a Bax-, Bad-, and caspase-3-related pathways. *Life Sci.* 78(8): 869–874.
- Yuan SS, Chang HL, Chen HW, Yeh YT, Kao YH, Lin KH, Wu YC, Su JH. 2003. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. *Life Sci.* 72(25): 2853-2861.
- Zafra-Polo MC, Figadère B, Gallardo T, Tormo JR and Cortes D. 1998. Natural acetogenins from Annonaceae, synthesis and mechanisms of action. *Phytochemistry.* 48(7):1087-1117

- Zafra–Polo MC, González MC, Estornell E, Saphaz S and Cortes D. 1996. Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. *Phytochemistry*. 48(2): 253-271.
- Zeng L, Wu FE, Oberlies NH, McLaughlin JL, Sastrodihadjo S. 1996a. Five new monotetrahydrofuran ring acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.* 59(11): 1035-1042.
- Zeng L, Zhang Y, McLaughlin JL. 1996b. Gigantransenins A, B, and C, novel mono-THF acetogenins bearing trans double bonds, from *Goniothalamus giganteus* (Annonaceae). *Tetrahedron Let.* 37(31): 5449-5452.
- Zeng L, Ye Q, Gu ZM, Zhao GX, McLaughlin JL, Woo MH. 1995. 16, 19-*cis*-murisolin and murisolin A, two novel bioactive mono-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Asimina triloba* seeds. *Bioorg. Med. Chem. Let.* 58(11):1135-1140.
- Zhu XF, Liu ZC, Xie BF, Li ZM, Feng GK, Xie HH, Wu SJ, Yang RZ, Wei XY, Zeng YX. 2002. Involvement of caspase-3 activation in squamocin-induced apoptosis in leukemia cell line HL-60. *Life Sci.* 70(11): 1259-1269
- Zickermann V, Dröse S, Tocilescu MA, Zwicker K, Kerscher S, Brandt U. 2008. Challenges in elucidating structure and mechanism of proton pumping NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Bioenerg. Biomembr.* 40(5):475-483.