

# Administración *in vivo* de acetogeninas guiada por la concentración inhibitoria media *in vitro*

Schlie-Guzmán, María Adelina<sup>1</sup>, García-Carrancá, Alejandro<sup>2,3</sup>  
Gutiérrez-Jiménez, Javier<sup>1</sup>, Vidal-López, Dolores<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, UNICACH. adelina.schlie@unicach.mx

<sup>2</sup>Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Cancerología, SS.

## Resumen

Las acetogeninas de la familia Anonaceae (ACG) son metabolitos secundarios que exhiben en las células cancerosas un gran efecto citotóxico *in vitro* (Schlie *et al.*, 2009). La actividad antitumoral *in vivo* de algunas ACG ha sido reportada y aunque los resultados son prometedores (Ahmmadsahib *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2002) los autores no señalan razones para las dosis empleadas. En este estudio se administró *in vivo* las acetogeninas laherradurina y cherimolina-2 utilizando la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) *in vitro* en la dosis inicial. La CI<sub>50</sub> *in vitro* de las ACG se determinó a las 48 h en ensayos de proliferación en células HeLa y SW-480 en cultivo. Lotes de ratones atímicos implanta-

dos con células HeLa o SW-480 recibieron diariamente durante 20 días, diferentes dosis de acetogeninas. La dosis inicial correspondió a la  $CI_{50}$  de la ACG multiplicada por el peso del animal; las siguientes dosis fueron 10, 100 o 500 veces la dosis inicial. La doxorubicina fue empleada como compuesto antineoplásico control. La laherradurina en dosis de 100x y 500x (1.5 y 7.5 mg  $kg^{-1} día^{-1}$ ) 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 hasta 100x y 500x (5 y 25 mg  $kg^{-1} día^{-1}$ ) inhibió el desarrollo de los tumores de células HeLa en 30 y 40% pero no mostró efectos significativos sobre los de SW-480. Efectos indeseables en los ratones se encontraron con 15 mg  $kg^{-1} día^{-1}$  de laherradurina y 50 mg  $kg^{-1} día^{-1}$  de cherimolina-2. Con el fin de encontrar *in vivo* el mayor efecto inhibitorio de las ACG en las células cancerosas, así como los menores efectos indeseables en los organismos receptores, un indicativo apropiado puede ser la  $CI_{50}$  de los ensayos de proliferación *in vitro*, la cual puede ser transformada a mg  $kg^{-1} día^{-1}$  y de esta forma es posible su incremento y administración en animales.

Palabras clave: laherradurina, cherimolina-2, antiproliferativo, ratones atímicos

## Introducción

Las acetogeninas de anonáceas (ACG) son metabolitos secundarios que presentan un amplio espectro de actividad biológica como la citotóxica, antitumoral, antiparasitaria y antimicrobiana (Alali *et al.*, 1999; Bermejo *et al.*, 2005; Schlie-Guzmán *et al.*, 2009).

Diversos estudios indican que las ACG son los inhibidores más potentes del Complejo I mitocondrial (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) (Degli-Esposti *et al.*, 1994) lo que les permite exhibir un gran efecto citotóxico en las células cancerosas en cultivo induciendo la apoptosis (Yuan *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2002); sin embargo, aún no se ha encontrado una correlación entre su potencia inhibitoria sobre el Complejo I mitocondrial y su actividad en las células neoplásicas (Royo *et al.*, 2003; Tormo *et al.*, 2005).

Los estudios con animales, especialmente con roedores, señalan que la actividad de las ACG puede ser comparable o inclusive superior a

algunos fármacos anti-neoplásicos. Por ejemplo, en ratones con leucemia murina (L1210), la bullatacina ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) y la bullatacinona ( $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) por vía intraperitoneal, alargaron en 38 y 44% la vida de los animales enfermos con respecto al lote control (Ahammadshahib *et al.*, 1993). En ratones BDF-1 con carcinoma murino de pulmón (LLC), la administración de  $10 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  de annonacina durante dos semanas, logró una reducción de 57.9% en el crecimiento de los tumores, porcentaje similar a la dosis de  $2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  de doxorubicina (Wang *et al.*, 2002). En ratones atómicos implantados con células del carcinoma ovárico humano A2780, la bullatacina ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) y la bullatalicina ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) redujeron en 67 y 75% el crecimiento de los tumores, y semejante al tratamiento de  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  del fármaco antitumoral cisplatina (Ahammadshahib *et al.*, 1993). A pesar de estos resultados prometedores, es difícil establecer alguna relación entre las dosis empleadas en los diferentes trabajos. Por ello, se decidió utilizar como criterio la concentración inhibitoria media de las acetogeninas en los cultivos celulares y multiplicarlo por los gramos de peso del animal experimental. Esta conversión en  $\text{mg kg}^{-1}$  permite que la concentración pueda ser incrementada hasta encontrar el mayor efecto inhibitorio en el desarrollo de los tumores y el menor efecto tóxico en los animales tratados.

En este estudio, las acetogeninas laherradurina (bis THF adyacente con una lactona terminal  $\beta$ -hidroxil  $\gamma$  metil saturada) reportada como uno de los inhibidores más potentes del Complejo I mitocondrial (Warmerdam *et al.*, 1998; Tormo *et al.*, 2001) y la cherimolina-2 (bis THF no adyacente  $\gamma$ -lactona) con actividades citotóxicas (Cortes *et al.*, 1993) (figura 1), fueron utilizadas para analizar el efecto de su administración en ratones implantados con células cancerosas humanas de cérvix HeLa y de colon SW-480 a partir de la concentración inhibitoria media exhibida en las células en cultivo.

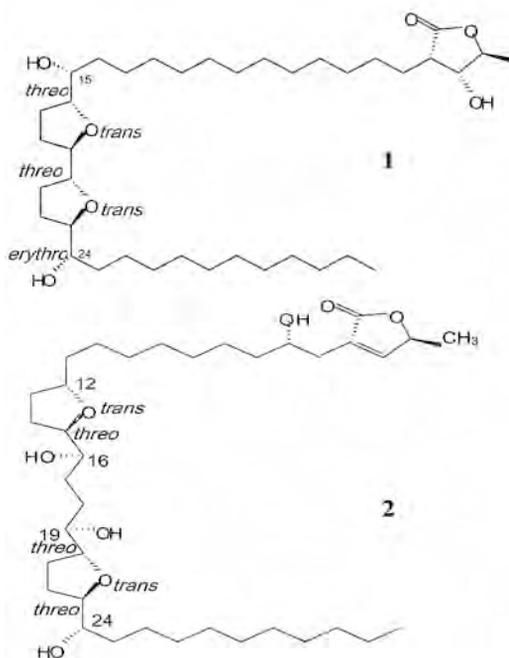


Figura 1. Estructura química de (1) laherradura y (2) cherimolina-2

## Método

Las acetogeninas y el fármaco antineoplásico doxorubicina (Doxolem<sup>®</sup> RU. Lemery, S.A. de C.V. México) fueron inicialmente disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO) para los ensayos de proliferación *in vitro* o en EtOH para la actividad antitumoral *in vivo* (soluciones madre). Las líneas humanas de carcinoma cervical (HeLa) y adenocarcinoma colorectal (SW-480) (ATCC Manassas, VA. USA) se mantuvieron con medio de cultivo D-MEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos (100 unidades/mL de penicilina y 100 pg/mL de estreptomycin) a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Para los ensayos, las células se cosecharon de los cultivos durante su fase exponencial de crecimiento con 0.25% (w/v) tripsina- 0.53 mM EDTA en buffer salino de fosfatos (PBS).

### ***Obtención de la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de las acetogeninas en los cultivos celulares***

Las células fueron sembradas en placas de 96 pozas a una densidad de 10,000 células por poza. Después de 24 h, las soluciones madre de acetogeninas o doxorubicina se diluyeron en medio de cultivo y se agregaron en las pozas para su concentración final de 20, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001  $\mu\text{g/mL}$  (desde 1.3 hasta  $1 \times 10^{-4}$  log  $\mu\text{g/mL}$ ).

La proliferación celular se analizó después de 48 h agregando 10  $\mu\text{L}$  de azul de tetrazolio (MTT) (5 mg/mL) a cada poza e incubando por 4 horas adicionales, posteriormente el medio de cultivo se reemplazó con 100  $\mu\text{L}$  de DMSO y el color desarrollado se midió en un lector de microplacas (Biorad, Hércules CA, USA) a 570 nm de longitud de onda. Cada ensayo se realizó en cuatro ensayos independientes.

El porcentaje de la inhibición de la proliferación se calculó como:  $\text{IP (\%)} = [100 - (\text{valor medio de las células tratadas} / \text{valor medio de las células control})] / 100$ . La concentración de acetogeninas que redujo al 50% la proliferación celular en relación al control (CI<sub>50</sub>) fue determinado gráficamente mediante las curvas de concentración-respuesta.

### ***Administración de las acetogeninas en los ratones implantados con las células neoplásicas***

Se utilizaron ratones atímicos de seis semanas de edad y peso aproximado de 15 g provenientes del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Subirán, México. Los animales se cuidaron de acuerdo con los principios y lineamientos de la Asociación Mexicana para Animales de Laboratorio (AMCAL), en jaulas con aire filtrado y acceso libre a la comida y agua. Para los ensayos, los ratones se inocularon subcutáneamente en el lomo con células HeLa ( $1 \times 10^6$ ) o SW-480 ( $5 \times 10^6$ ). Después de 24 h, grupos de 5 ratones recibieron subcutáneamente en la base del tumor, diariamente durante dos semanas, las diferentes concentraciones de ACG disueltas en 0.1 mL de solución de NaCl al 0.9%. Los animales control recibieron 0.1 mL de la solución vehículo.

Se utilizó como dosis inicial la concentración de la  $CI_{50}$  obtenida de los ensayos de proliferación *in vitro*, multiplicada por el peso del animal (1x). Los siguientes grupos de ratones recibieron 10, 100, y 500 veces la concentración de la dosis inicial (10x, 100x y 500x). Laherradurina también se utilizó en un lote de animales en la dosis de 1000x (15 mg  $kg^{-1} día^{-1}$ ).

Los tumores se midieron con un vernier cada 48 h y su tamaño en  $mm^3$  se calculó con la fórmula (largo x ancho<sup>2</sup>)/2. El porcentaje de reducción en el crecimiento de los tumores se obtuvo como:  $RT (\%) = 100 - [(valor\ medio\ del\ grupo\ tratado / valor\ medio\ del\ grupo\ control) / 100]$  (Wang *et al.*, 2002).

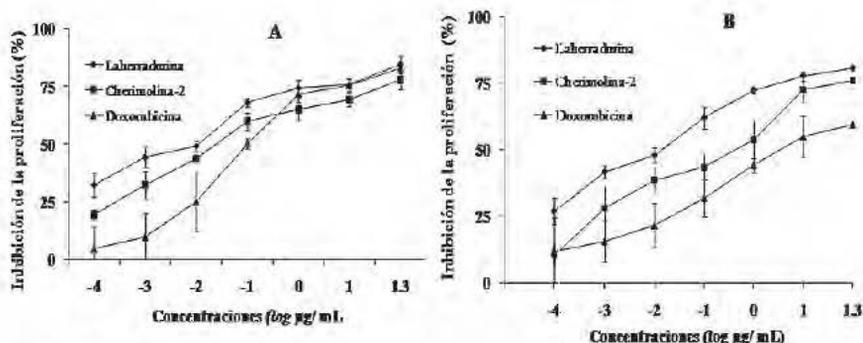
La diferencia estadística entre los grupos experimentales y el grupo control se calculó con la prueba de ANDEVA y la de *a posteriori* de Bonferroni en donde  $P < 0.05$  fue considerado significativo.

## Resultados y discusión

### *Efecto de las acetogeninas en los cultivos celulares*

Después de 48 h de exposición a las acetogeninas, los resultados mostraron que la proliferación de las células HeLa y SW-480 tuvo una reducción dependiente de la concentración de los compuestos. Así, laherradurina a concentración de 20, 0.01 y 0.0001  $\mu g mL^{-1}$ , disminuyó la reproducción de las células HeLa en 85, 49 y 32% y mostró una  $CI_{50}$  de 0.015  $\mu g mL^{-1}$ . A estas mismas concentraciones, la inhibición sobre las células SW-480 fue de 80.5, 48.0 y 27.1% respectivamente y un  $CI_{50}$  cercano a 0.015  $\mu g mL^{-1}$ .

Por su parte la cherimolina-2 redujo la proliferación de las células HeLa en 78, 43 y 19.5% a las concentraciones de 20, 0.01 y 0.0001  $\mu g mL^{-1}$ , y presentó una  $CI_{50}$  de 0.05  $\mu g mL^{-1}$ ; en tanto que en las células SW-480 su efecto fue de 76, 38.6 y 10.5% de descenso en las concentraciones arriba mencionadas y un valor de  $CI_{50}$  de 0.5  $\mu g mL^{-1}$ . Ambas acetogeninas fueron más activas que la doxorubicina que tuvo una  $CI_{50} = 0.1 \mu g mL^{-1}$  sobre las células HeLa y de 5  $\mu g mL^{-1}$  sobre SW-480 (gráficas 1A y 1B; cuadro 1).



Gráfica 1. Inhibición de la proliferación celular *in vitro* de HeLa (A) y SW-480 (B). Los valores están expresados como porcentajes en relación al grupo control. Los valores de las concentraciones se encuentran en escala logarítmica

Cuadro 1. Actividad *in vitro* de las acetogeninas y de la droga control en las líneas neoplásicas humanas

Concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) (mg mL <sup>-1</sup> )			
Células	Laherradurina	Cherimolina-2	Doxorubicina
HeLa	0.015	0.05	0.1
SW-480	0.015	0.5	5.0

Nuestros ensayos de proliferación *in vitro* señalan que las ACG fueron más activas que el fármaco antineoplásico doxorubicina, siendo la herradurina en comparación con la cherimolina 3.3 veces más activa en las células HeLa y 33 veces en las SW-480. La proliferación de ambas líneas tumorales fue inhibida por la herradurina con una  $CI_{50}$  semejante, pero presentaron diferencias con la cherimolina-2, en donde las células HeLa fueron 10 veces más susceptibles que las SW 480.

Los estudios previos con las ACG como agentes inhibidores de la proliferación de líneas celulares en cultivo, señalan algunas tendencias en la actividad de estos compuestos: pueden ser más citotóxicas en las líneas cancerosas que algunas drogas antineoplásicas; las ACG bis THF adyacentes son más activas que las bis THF no adyacentes (Oberlies *et*

al., 1995; Oberlies *et al.*, 1997) y existe diferencias notables en la susceptibilidad de las líneas celulares hacia la misma ACG (Royo *et al.*, 2003; Tormo *et al.*, 2005).

Los estudios de inhibición sobre el Complejo I mitocondrial que buscan la relación entre la estructura de las ACG y su actividad, señalan que la cadena alifática con 13 átomos de carbono del espaciador que une el sistema THF al anillo  $\gamma$ -lactónico en la moléculas de estos compuestos, pudiera ser un factor esencial para exhibir una mayor potencia inhibitoria (Miyoshi *et al.*, 1998; Takada *et al.*, 2000; Abe *et al.*, 2005). La molécula de laherradurina contiene en su cadena espaciadora el largo mencionado, en tanto que la cherimolina-2 con un sistema THF no adyacente y una cadena espaciadora más corta pudiera tener una conformación menos apropiada. Estas diferencias podrían explicar sus diferentes comportamientos en las líneas celulares, sin embargo la laherradurina ha sido reportada como un potente inhibidor del Complejo I mitocondrial, con actividad superior a la rolliniastatina-1 y la cherimolina -1 (Tormo *et al.*, 2001).

### *Efecto de las dosis de acetogeninas en el desarrollo de los tumores in vivo*

La concentración de las ACG administradas a los ratones atímicos fue variable de acuerdo a la  $CI_{50}$  exhibida en los ensayos de proliferación (cuadro 2). En general, las ACG inyectadas diariamente en un periodo de 20 días, tuvieron un efecto inhibitorio en el desarrollo de los tumores, dependiendo de la dosis utilizada.

Cuadro 2. Dosis de acetogeninas administradas en los grupos de ratones atímicos

	1x	10x	100x	500x	1x	10x	100x	500x
Línea celular	Laherradurina*				Cherimolina-2*			
HeLa	0.015	0.15	1.5	7.5	0.05	0.5	5.0	25.0
SW-480	0.015	0.15	1.5	7.5	0.5	5.0	50	250
* mg kg <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup>								

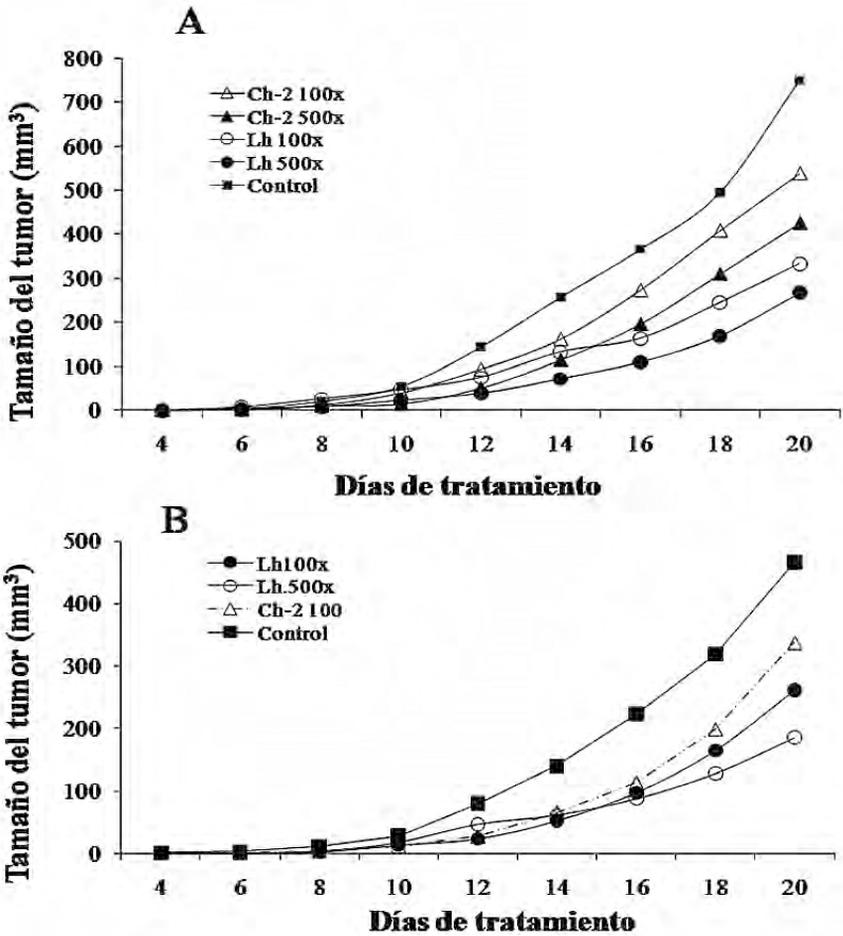
### ***Efecto en los tumores inducidos de células HeLa***

En los animales que recibieron las concentraciones de 10x, 100x, y 500x de la herradurina (Lh), se halló una reducción significativa del tamaño final de los tumores de 39.6, 53.6 y 64% respectivamente con relación al grupo control; en las últimas dos concentraciones, las diferencias estadísticas se encontraron desde los días 15 y 11 respectivamente. En los animales que recibieron la dosis de 1000x ( $15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) si bien el desarrollo de los tumores fue mínimo, manifestaron a partir del cuarto día de tratamiento una pérdida importante de peso, inestabilidad en sus movimientos y finalmente murieron. Por estas razones se decidió suspender la administración de ACG a esta concentración o mayores.

Por su parte la cherimolina-2 (Ch-2) redujo significativamente los tumores en 30% con las dosis de 100x y en 43.4% con la de 500x; con la dosis más alta, la reducción de los tumores de manera significativa se inició el día 13 de tratamiento (gráfica 2A). El fármaco antineoplásico doxorubicina tuvo efectos con valores intermedios entre ambas acetogeninas y no se encontró diferencias significativas entre los animales tratados con las acetogeninas y el fármaco control en dosis similares.

### ***Efecto en los tumores de células SW-480.***

La herradurina también afectó el desarrollo de los tumores de SW-480 en un 29% en la dosis 10x y de manera significativa por las dos más altas; la dosis 100x inhibió el desarrollo tumoral en 44% y la de 500x en 60 %.



Gráfica 2. Inhibición del desarrollo de los tumores *in vivo* de HeLa (A), células SW-480; (B). Diferencias estadísticas se encontraron en todas las dosis mostradas

Debido a que en los ensayos de proliferación *in vitro* las células SW-480 mostraron ser 10 veces menos susceptibles a la cherimolina-2 que las células HeLa, las dosis de esta acetogenina se incrementó considerablemente. Así, la dosis 100x inyectada a los animales implantados con célu-

las SW-480, contenía dos veces la concentración de cherimolina-2 que la administrada como 500x en los ratones con HeLa ( $50$  vs  $25$   $\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) (cuadro 2). Al finalizar el tratamiento, la dosis 10x no produjo reducciones significativas y las siguientes indujeron en los animales, pérdida de peso e inestabilidad de sus movimientos. Con la dosis 100x ( $50$   $\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) únicamente un animal continuó vivo al finalizar el tratamiento (línea punteada, gráfica 2B) y ninguno de ellos en la dosis de 500x ( $250$   $\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ).

Se ha reportado que  $200$   $\mu\text{g kg}^{-1}$  de bullatacina es tóxica en los animales, en tanto que  $100$   $\mu\text{g/kg}^{-1}$  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 10x de laherradurina correspondiente a  $150$   $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  mostró una reducción final de 40% sobre los tumores de células HeLa y de 29% en los de SW-480. Más aún, el incremento de 10 y 50 veces de laherradurina 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 esta inhibición correspondió a 44 y 60%; las reducciones significativas se encontraron en las dosis con mayor contenido de ACG en tiempo cada vez más temprano.

Nuestros resultados señalan que laherradurina es 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  $10$   $\text{mg/kg}$  de la mono-THF annonacina (Wang *et al.*, 2002) y  $1$   $\text{mg kg}^{-1}$  de bullatalicina (Ahammadsahi *et al.*, 1993) donde ningún animal murió al igual que en nuestros ensayos. La muerte de los animales con  $15$   $\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  de laherradurina (1000x) 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. Estos resultados pudieran señalar que los límites entre las dosis terapéuticas vs las tóxicas de laherradurina en estos animales se encuentra entre  $7.5$  hasta  $15$   $\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ .

El efecto significativo de la cherimolina-2 en los animales implantados con células HeLa se encontró en las dosis 100x y 500x al igual que laherradurina, aunque debe resaltarse que su concentración fue 3.3 veces mayor ( $1.5$  y  $7.5$  de laherradurina vs  $5.0$  y  $25$   $\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  de cheri-

molina-2); más aún, la concentración de  $50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  suscitó efectos indeseables en los ratones implantados con células SW-480, lo que pudiera señalar que las dosis terapéuticas de esta ACG son más elevadas y con peligro de llegar a efectos indeseables. Así, tanto laherradurina como la cherimolina-2 presentaron concentraciones perjudiciales en los animales que pudieran ser el resultado de su actividad inhibitoria sobre el Complejo I mitocondrial.

Cuadro 3. 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

	Dosis analizada		Porcentaje de reducción en el tamaño de los tumores (tratados vs controles)	
		$\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$	HeLa	SW-480
<b>Laherradurina*</b>	100x	1.5	55	45
	500x	7.5	65	60
<b>Cherimolina-2</b>	100x	5.0	30	
	500x	25.0	40	
	100x	50		38**
	500x	NA		NA
* Se administró concentraciones iguales de la ACG.				
** Un animal sobreviviente al término del tratamiento				
NA. No analizada				

Uno de mayores problemas durante la quimioterapia en los pacientes con cáncer, es la expresión de mecanismos de resistencia a los fármacos en las células malignas, lo que puede llevar a la ineficacia del tratamiento oncológico. Las ACG 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). Sin embargo, es necesario encontrar métodos que permitan comparar los diferentes estudios con animales, y valorar adecuadamente

te su actividad en las células blanco vs los efectos negativos que puede desarrollar en los organismos receptores (Champy *et al.*, 2004). En el caso de la administración de las acetogeninas esto es un aspecto crucial, debido a que la inhibición del Complejo I mitocondrial pudiera suscitar niveles reducidos de ATP en las células normales, afectando seriamente su funcionamiento.

## Conclusión

Nuestros resultados muestran un enfoque razonable para el diseño de las dosis de ACG a ser administradas *in vivo* a partir de la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) obtenidas de los ensayos de proliferación celular *in vitro*.



## Referencias

- 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.
- Ahammadsahib, K.I., Hollingworth, R.M., McGovren, J.P., Hui, Y.H. and McLaughlin, J.L. 1993. Mode of action of bullatacin: a potent anti-tumor and pesticidal annonaceous acetogenin. *Life Sci*. 53:1113-1120.
- Alali, F.Q., Liu, X.X. and McLaughlin, J.L. 1999. Annonaceous acetogenins. Recent progress. *J Nat Prod*. 62: 504-540.
- Bermejo, A., Figadère, B., Zafra-Polo, M.C., Barrachina, I., Estornell, E. and Cortes, D. 2005. Acetogenins from annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat Prod Rep*. 22: 269-303.
- Champy, P., Höglinger, G.U., Féger, J., Gleye, C., Hocquemiller, R., Laurens, A., Guérineau, V., Laprèvote, O., Medja, F., Lombe's, A., Michel, P.P., Lannuzel, A., Hirsch, E.C. 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.

- Cortes, D., Myint, S.H., Dupont, B. and Davoust, D. 1993. Bioactive acetogenins from seeds of *Annona cherimolia*. *Phytochemistry*. 32: 1475-1482.
- Degli-Esposti, M., Ghelli, A., Ratta, M., Cortes, D. and Estornell, E. 1994. Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). *Biochem J*. 301: 161-167.
- Miyoshi, H., Ohshima, M., Shimada, H., Akagi, T., Iwamura, H. and McLaughlin, J.L. 1998. Essential structural factors of annonaceous acetogenins as potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Biochim Biophys Acta*. 1365: 443-452.
- Oberlies, N.H., Chang, C.J. and McLaughlin, J.L. 1997. Structure-activity relationships of diverse Annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF-7/Adr) cells. *J. Med Chem*. 40: 2102-2106.
- Oberlies, N.H., Jones, J.L., Corbett, T.H., Fotopoulos, S.S. and McLaughlin, J.L. 1995. Tumor cell growth inhibition by several Annonaceous acetogenins in an in vitro disk diffusion assay. *Cancer Lett*. 96: 55-62.
- 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. *Oncol Res*. 13:521-528.
- Schlie-Guzmán, M.A., González-Esquinca, A.R. and Luna-Cazáres, L.M. 2009. Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. *BLACPMA*. 8 (4) 245-257.
- Takada, M., Kuwabara, K., Nakato, H., Tanaka, A., Iwamura, H. and Miyoshi, H. 2000. Definition of crucial structural factors of aceto-

genins, potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Biochim Biophys Acta*. 1460: 302-310.

Tormo, J.R., DePedro, N., Royo, I., Barrachina, I., Zafra-Polo, M.C., 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. *Oncol Res*. 15(3): 129-138.

Tormo, J.R., Estornell, E., Gallardo, T., González, M.C., Cave, A., Grannell, S., Cortes, D. and Zafra-Polo, M.C. 2001. Gamma-lactone-functionalized antitumoral acetogenins are the most potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Bioorg Med Chem Lett*. 11(5): 681-684.

Wang, L.Q., Min, B.S., Li, Y., Nakamura, N., Qin, G.W., Li, C.J. and Hattori, M. 2002. Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona montana*. *Bioorg Med Chem*. 10: 561-565.

Warmerdam, E., Tranoy, I., Renoux, B. and Gesson, J.P. 1998. Study of butyrolactones related to sub-type 3 Annonaceous acetogenins. Structure revision of itrabin, jetein, laherradurina and otivarin. *Tetrahedron Lett*. 39: 8077-8080.

Yuan, S.S., Chang, H.L., Chen, H.W., Yeh, Y.T., Kao, Y.H., Lin, K.H., Wu, Y.C. and Su, J.H. 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.

Zhu, X.F., Liu, Z.C., Xie, B.F., Li, Z.M., Feng, G.K., Xie, H.H., Wu, S.J., Yang, R.Z., Wei, X.Y. and Zeng, Y.X. 2002. Involvement of caspase-3 activation in scumocina-induced apoptosis in leukemia cell line HL-60. *Life Sci*. 70 (11): 1259-1269.

