

Efecto citotóxico de las semillas de *Annona cherimola* en cultivos de cáncer de cérvix, mama y leucemia mieloide crónica

Cytotoxic effect of Annona cherimola seeds on cell cultures of cervical and breast cancer and chronic myeloid leukemia.

Angel Quispe-Mauricio^{1,2,3}, David Callacondo Riva^{4,5}, Jose Rojas-Camayo^{3,5}, David Zavala Curzo³, Margarita C. Posso Rivera^{3,5}, Abraham J. Vaisberg Wolach^{4,5}

RESUMEN

Introducción: Diversos productos naturales del género *Annona* han sido utilizados en el tratamiento del cáncer. *Annona cherimola* posee diversos compuestos puros de sus semillas y tallos que han demostrado actividad antitumoral frente a células de carcinoma nasofaríngeo.

Objetivo: Determinar el efecto citotóxico del extracto etanólico de semillas de *Annona cherimola* en las líneas celulares MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), ME-180 (carcinoma epidermoide de cérvix), K562 (leucemia mieloide crónica) y 3T3 (fibroblastos normales de ratón).

Materiales y métodos: Las líneas MCF-7, ME-180, K562 y 3T3, fueron expuestas a cuatro concentraciones del extracto etanólico de semillas de *Annona cherimola* (0,125, 0,031, 0,008, 0,002mg/mL), asimismo a diferentes concentraciones de 5-fluorouracilo (5-FU) (0,01563, 0,00391, 0,00098, 0,00024mg/mL) y Cisplatino (0,00250, 0,00063, 0,00016, 0,00004mg/mL) como controles positivos. Se hallaron los porcentajes de crecimiento en 48 horas. Luego se determinó la concentración inhibitoria de crecimiento 50 (CI₅₀) mediante correlación lineal, asimismo se obtuvieron los coeficientes de determinación r² utilizando Microsoft Office Excel 2007. Finalmente se precisó el Índice de Selectividad de cada muestra.

Resultados: Los CI₅₀ en µg/mL del extracto etanólico de semillas de *Annona cherimola* fueron 9,4 (r²=0,96) para MCF-7; 6,6 (r²=0,99) para ME-180; 2,2 (r²=0,96) para K562 y 29,5 (r²=0,98) para 3T3. Los CI₅₀ de 5-FU fueron 3,4 (r²=0,95) para MCF-7; 3,8 (r²=0,96) para K562 y 0,2 (r²=0,98) para 3T3 y los CI₅₀ del Cisplatino fueron 12,1 (r²=0,96) para MCF-7; 0,1 (r²=0,96) para K562 y 0,3 (r²=0,99) para 3T3. La relación dosis respuesta del extracto para la línea celular 3T3 fue de -0,98 (p<0,05) y para una línea celular tumoral K562 fue de -0,98 (p<0,05). Los índices de selectividad del extracto fueron de 2,17, 6,07 y 2,39 para las líneas celulares MCF-7, K562 y ME-180 respectivamente. Por el contrario, el 5-FU y Cisplatino, solo alcanzaron valores índices de 0,07 y 0,06; 0,02 y 2,25 para las líneas MCF-7 y K562 respectivamente.

Conclusiones: El perfil citotóxico del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimola* es muy alentador por su alta citotoxicidad para células tumorales y su baja toxicidad para las células normales; superando en cuanto a índice de selectividad a los fármacos ampliamente conocidos como el 5-FU y el cisplatino.

Palabras clave: *Annona cherimola*, efecto citotóxico, cáncer, planta medicinal.

ABSTRACT

Introduction: Diverse natural products of the *Annona* genus has been used in the treatment of the cancer. *Annona cherimola* has diverse pure compounds of its seeds and stems that have demonstrated antitumor activity against nasopharyngeal carcinoma.

Objective: To determine the cytotoxic effect of the *Annona cherimola* seed extract on the cell lines MCF-7 (Human breast adenocarcinoma), ME-180 (epidermal carcinoma of the cervix), K562 (chronic myeloid leukemia) and 3T3 (normal mouse fibroblasts).

Materials and methods: The lines MCF-7, ME-180, K 562 and 3T3, were exposed to four concentrations of the *Annona cherimola* seed ethanolic extract (0.125, 0.031, 0.008, 0.002mg/mL), also to different concentrations of 5-fluorouracil (5-FU) (0.01563, 0.00391, 0.00098, 0.00024mg/mL) and Cisplatin (0.00250, 0.00063, 0.00016, 0.00004mg/mL) which were used as a positive controls. Percentage growth was assessed after 48 hours. The growth inhibitory concentration 50 (CI₅₀) was determined using linear regression analysis; also we obtained the coefficients of determination r² using Microsoft Office Excel 2007. Finally the Selectivity Index of each sample was determined.

Results: The CI₅₀ in µg/mL of the *Annona cherimola* seed ethanolic extracts were 9.4 (r² = 0.96) for MCF-7; 6.6 (r² = 0.99) for ME-180; 2.2 (r² = 0.96) for K562 and 29.5 (r² = 0.98) for 3T3. The CI₅₀ of 5-FU were 3.4 (r² = 0.95) for MCF-7; 3.8 (r² = 0.96) for K562 and 0.2 (r² = 0.98) for 3T3 and the CI₅₀ of Cisplatin were 12.1 (r² = 0.96) for MCF-7; 0.1 (r² = 0.96) for K562 and 0.3 (r² = 0.99) for 3T3. The dose-response relationship of the extract to the 3T3 cell line was -0.98 (p<0.05) and for the K562 tumor cell line was -0.98 (p<0.05). The extract selectivity index were 2.17, 6.07 and 2.39 for the MCF-7, K562 and ME-180 cell lines, respectively; On the contrary, the 5-FU and Cisplatin, only reached values of 0.07 and 0.06; 0.02 and 2.25 for the lines MCF-7 and K562 respectively.

Conclusions: The cytotoxic profile of the *Annona cherimola* seed ethanolic extract is very encouraging by its high cytotoxicity against tumor cells and low cytotoxicity against normal cells; surpassing, drugs widely known like 5-FU and Cisplatin in selectivity index.

Key words: *Annona cherimola*, cytotoxic effect, cancer, medicinal plant.

INTRODUCCIÓN

La *Annona cherimola* es un árbol tropical originario del Perú y Ecuador, que es usado en la medicina tradicional como insecticida y antiparasitario¹. Tiene un fruto conocido en nuestro medio como “chirimoya” habiendo sido cultivado desde los tiempos de los incas².

Se ha reportado que la *Annona cherimola* posee diversos compuestos naturales de interés biológico tales como alcaloides y acetogeninas³⁻¹¹. Compuestos aislados de las semillas de la *Annona cherimola* como las acetogeninas: cis-annonacin y (2,4)-cis-y trans-isoannonacinas, han mostrado citotoxicidad frente a las líneas tumorales humanas A-549 (carcinoma de pulmón), MCF-7 (carcinoma de mama), HT-29 (adenocarcinoma de colon), A498 (carcinoma renal), PC-3 (adenocarcinoma de próstata), MIA PaCa-2 (carcinoma de páncreas), con una notable selectividad a ésta última línea con una potencia 1 000 veces superior a la adriamicina¹². En otro estudio publicado dos años después aislaron dos acetogeninas más: *Annomolin* con una potencia de citotoxicidad 10 000 veces superior que la adriamicina sobre la línea PC-3 y *Annocherimolin* que mostró una citotoxicidad 10 000 veces superior que la

1 Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Vie, Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, Paris, Francia.

2 Faculté de Médecine Paris-Sud, Université Paris-Sud – Paris 11, Paris, Francia.

3 Sociedad Científica de San Fernando, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

4 Departamento de Microbiología, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

5 Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía Alberto Carzola Talleri, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

adriamicina para las líneas MCF-7 y HT-29¹³. Tres años después se aisló el compuesto cherimolaciclopeptido C, el cual mostró citotoxicidad significativa contra las células tumorales KB (carcinoma nasofaríngeo)¹⁴. Asimismo, un año después se aisló el compuesto cherimolaciclopeptido D, donde se evaluó su citotoxicidad frente a las células KB; sin embargo los resultados no fueron publicados¹⁵. Recientemente se aislaron cherimolaciclopeptido E y cherimolaciclopeptido F con una citotoxicidad significativa contra la línea tumoral KB¹⁶.

Dentro de los esquemas de quimioterapia actuales para el tratamiento del cáncer de mama avanzado, cérvix y leucemia mieloide crónica se emplean drogas como el cisplatino y el 5-fluorouracilo, medicamentos que poseen diversos efectos adversos, lo que incentiva a la búsqueda de nuevas fuentes de drogas más seguras¹⁷⁻²⁰.

No hay estudios donde se evalúe la citotoxicidad de las semillas de *Annona cherimola* en las líneas celulares ME-180 (carcinoma epidermoide de cervix), K562 (leucemia mieloide crónica) y 3T3 (fibroblastos normales de ratón), asimismo que comparen este efecto con antineoplásicos como 5-fluorouracilo y cisplatino.

En nuestro estudio evaluamos la citotoxicidad de las semillas de *Annona cherimola* en líneas tumorales de cáncer de mama y cérvix, debido a que éstas son las neoplasias ginecológicas de mayor prevalencia en el Perú²¹; asimismo en la leucemia mieloide crónica, tomando además como control una línea celular normal que viene a ser la 3T3.

MATERIALES Y MÉTODOS

Es un estudio experimental realizado en los Laboratorios del Departamento de Farmacología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) y los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

La unidad de investigación fue cada célula perteneciente a las líneas celulares ME180, MCF-7, K562 y 3T3. El material biológico utilizado fueron semillas de *Annona cherimola*, proporcionados por el Museo de Historia Natural de la UNMSM, líneas celulares del *American Type Culture Collection* (ATCC): ME180, MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), K562 y 3T3; proporcionadas por el Laboratorio de Biología Celular y Virología de los LID - UPCH (Lima, Perú).

Para la preparación de los extractos, se desecó 500 gramos de semillas de *A. cherimola* a una temperatura de 40 °C por 3 días; luego fue pulverizada con un molino eléctrico. La sustancia obtenida fue introducida en un matraz conteniendo 1 000 mL de etanol al 95%, por un período de 4 días. Posteriormente, se filtró el macerado, utilizando para ello papel de porosidad media y se sometió a una temperatura de 40 °C para volatilizar el alcohol, obteniéndose finalmente el extracto etanólico de semillas de *Annona cherimola*.

Las líneas MCF-7 y K562 fueron cultivadas y mantenidas en crecimiento logarítmico en el medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con 7,5% de suero bovino fetal y 50 µg/mL de gentamicina. La línea 3T3 fue cultivada y mantenida en crecimiento logarítmico en el medio de cultivo DMEM (*Dulbecco modified Eagle medium*) suplementado con 10% de suero bovino fetal y 50 µg/mL de gentamicina y la línea celular ME-180 en el medio de cultivo MEM (*Minimum Essential Medium*). Las cuatro líneas fueron mantenidas a una temperatura de 37° C, en un ambiente húmedo, con 95% de aire y 5% de CO².

Para resuspender cada línea celular, se lavó la monocapa de células con 3 x 4 mL de la solución de Hanks sin Ca-Mg; luego, se agregó 1 mL de la solución de tripsina-EDTA, que después de 10 segundos fue eliminada. Se incubó el frasco invertido por 8 minutos a 37 °C, al término de los cuales los cultivos fueron resuspendidos en 2 mL de cada medio de cultivo. En el caso de la línea K562 no se utilizó este método, porque las células crecen en suspensión.

Luego, se contó las células usando un hemocitómetro. Cada pozo de una placa de 96 pozos recibió 160 uL de medio conteniendo el número de células que se especifica en la Tabla 1.

Tabla 1. Número y concentración de células por pozo

Línea celular	Nº de células/pozo	Nº de células/38 mL
ME-180 ^a	3 500	831 250
MCF-7 ^b	5 000	1 187 500
K-562 ^c	3 000	712 500

a Carcinoma epidermoide de cérvix

b Adenocarcinoma de mama

c Leucemia mieloide crónica

Para el ensayo de la actividad antitumoral se utilizó una placa 0 (control), asignándose 4 pozos para cada línea celular y una placa 1 (experimental) con 12 pozos para cada línea celular. En cada pozo de ambas placas se colocó 160 uL de medio de cultivo conteniendo las células. Se incubó a 37 °C en una atmósfera húmeda de 5% de CO² y 95% de aire, por 24 h. A la placa 0 se le añadió ácido tricloroacético (TCA), para fijar las células y cuantificarlas luego en tiempo cero. A la placa 1 se le agregó las diferentes diluciones de los extractos, de cisplatino y de 5-FU, que se muestra en la Tabla 2.

Para las diluciones de extracto, se mezcló 20 mg de extracto + 100 mL de etanol al 100% y fue centrifugado a 12 000 RPM, por 10 minutos. El sobrenadante fue el stock de 20 mg/100 mL y de este 8,5 mL fueron diluidos en 340 mL de medio, con diluciones sucesivas de 1:4. La concentración inicial que se usó fue 15,63 µg/mL para el 5-FU, 2,5 µg/mL para el Cisplatino y 125 µg/mL para el extracto.

Tabla 2. Diluciones de extracto de semillas

Diluciones	Annona Cherimola (mg/mL)	Control Positivo	
		5 Fluoruracilo (mg/mL)	Cisplatino (mg/mL)
1	0,125	0,01563	0,00250
2	0,031	0,00391	0,00063
3	0,008	0,00098	0,00016
4	0,002	0,00024	0,00004

La placa 1 fue incubada por 48 horas adicionales. Luego, a cada pozo se le agregó TCA frío y se incubó a 4 °C por 1 hora.

Para determinar el número de células de las líneas ME180, MCF-7 y 3T3 se empleó el método del bioensayo de citotoxicidad con sulforodamina B (SRB)²². Para la línea K562, se utilizó conteo directo, mediante el contador Coulter. Fueron respetadas las medidas de bioseguridad de trabajo con material biológico. Para todas las líneas se halló los porcentajes de crecimiento en 48 horas, en función a las 4 diluciones (Tabla 2). La concentración inhibitoria de crecimiento 50 (CI₅₀) se halló mediante el análisis de regresión lineal (ecuación de la recta: y=mx+b). Finalmente, se precisó la relación CI₅₀ (línea control) / CI₅₀ (línea tumoral), que indica el índice de selectividad de la sustancia en la línea tumoral, siendo >1 cuando la citotoxicidad para las células tumorales supera a la citotoxicidad en las células normales. Para todos los análisis, se utilizó Microsoft Office Excel 2007.

RESULTADOS

En la línea ME180 los porcentajes de crecimiento variaron de -13,0 a 60,1. Las menores concentraciones del extracto de semillas mostraron un crecimiento similar al del control sin extracto, mientras que las mayores concentraciones no solo inhibieron el crecimiento sino que destruyeron las células inoculadas (Figura 1).

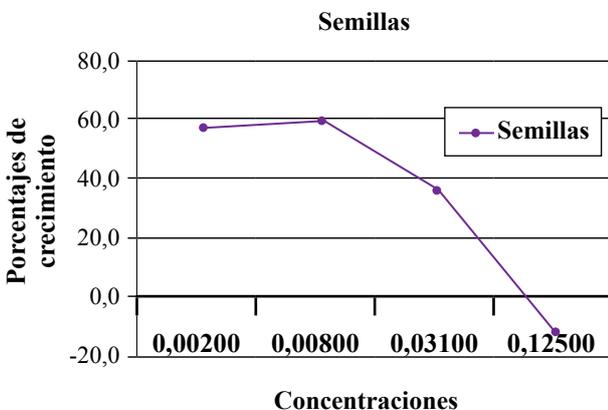


Figura 1. Curva de crecimiento de la línea tumoral ME180

Los porcentajes de crecimiento para la línea celular MCF-7, expuesta al extracto, fueron de -45,5 hasta 67,3. El comportamiento del extracto también mostró, una mayor capacidad de inhibir el crecimiento tumoral, en comparación al Cisplatino, llegando a tener concentraciones muy tóxicas, que se observan al encontrar porcentajes de crecimiento negativos (Figura 2). El 5-FU alcanzó una concentración más citotóxica que los extractos, de acuerdo a las equivalencias observadas en la Tabla 3.

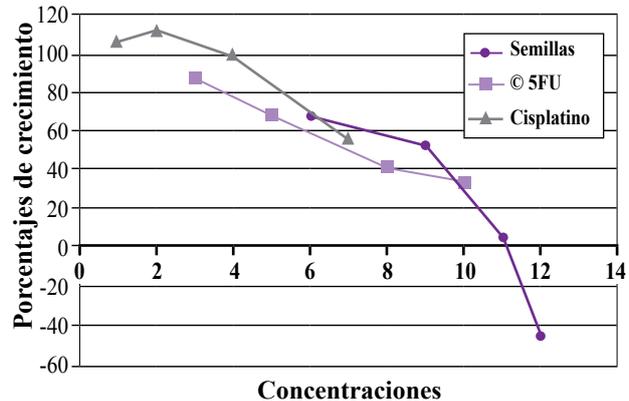


Figura 2. Curva de crecimiento de la línea tumoral MCF-7

Respecto a la línea K-562 expuesta al extracto de semillas, los porcentajes de crecimiento variaron entre -15,1 y 59,5. La curva descrita para el extracto muestra una mayor capacidad de inhibir el crecimiento tumoral en comparación al 5-FU, pero no al Cisplatino.

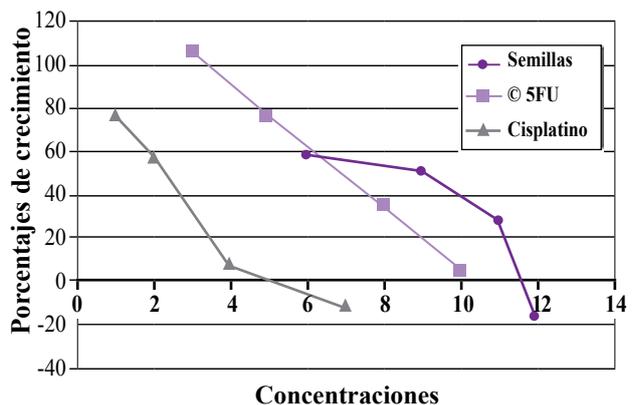


Figura 3. Curva de crecimiento de la línea tumoral K-562

Las menores concentraciones del extracto de semillas, no mostraron actividad citotóxica sobre la línea 3T3, mientras que las mayores concentraciones inhibieron el crecimiento de las células inoculadas (Figura 4).

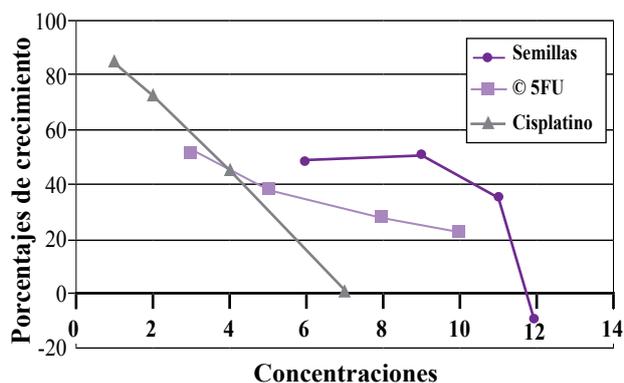


Figura 4. Curva de crecimiento de la línea celular 3T3

En la Tabla 3, se muestran los CI_{50} del extracto de semillas de *Annona cherimola*, 5-FU y cisplatino para las diferentes líneas celulares. La línea ME-180 no fue evaluada con los controles positivos 5FU y cisplatino.

Tabla 3. Valores CI_{50} del extracto etanólico de semillas de *annona cherimola*, 5-fluorouracilo y cisplatino

Líneas celulares	<i>Annona cherimola</i>	5-fluorouracilo	Cisplatino
3T3 ^d	0,01603	0,00024	0,00033
ME180 ^a	0,00668	-	-
MCF-7 ^b	0,00739	0,00341	0,01212
K562 ^c	0,00264	0,00383	0,00015

a Carcinoma epidermoide de cérvix

b Adenocarcinoma de mama

c Leucemia mieloide crónica

d Fibroblastos normales de ratón

Los índices de selectividad del extracto fueron de 2,17, 6,07 y 2,39 para las líneas MCF-7, K562 y ME-180 respectivamente. Contrariamente, el 5-FU y Cisplatino, solo alcanzaron valores índices de 0,07 y 0,06; 0,02 y 2,25 para las líneas MCF-7 y K562 respectivamente.

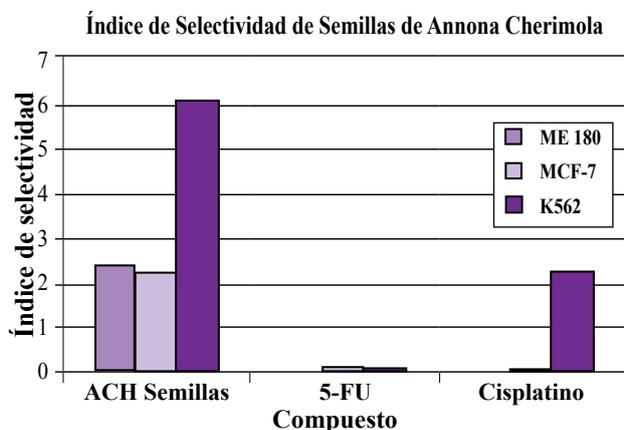


Figura 5. Índices de selectividad de los extractos etanólicos de semillas de *Annona cherimola*, 5-FU y cisplatino

En la Figura 6, se observa la relación dosis respuesta del extracto etanólico de semillas de *Annona cherimola*.

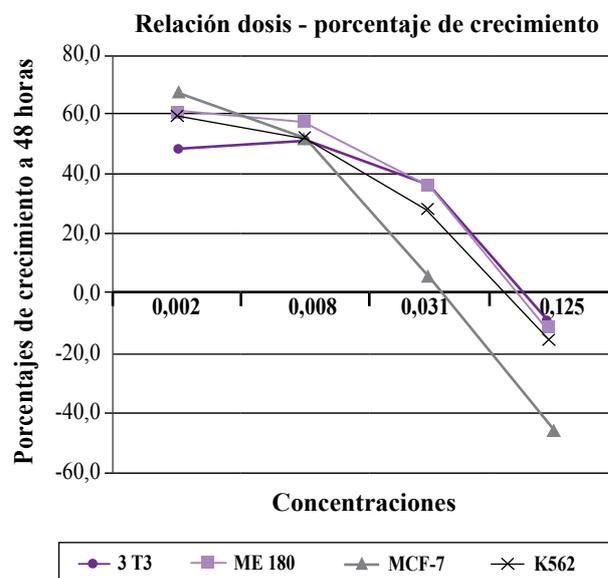


Figura 6. Relación dosis respuesta del extracto etanólico de semillas de *Annona cherimola*

El grado de correlación dosis respuesta para la línea normal 3T3 fue de -0,98 ($p < 0,05$) y para una línea tumoral K562 fue de -0,98 ($p < 0,05$), lo que evidencia una fuerte relación tanto en líneas tumorales como normales.

DISCUSIÓN

Los extractos etanólicos de las semillas de *Annona cherimola* muestran actividad citotóxica frente a las líneas MCF-7, K562 y ME-180, superando en el caso de los dos primeros al cisplatino y 5-fluorouracilo. Además, la citotoxicidad es menor para la línea 3T3, comparada con el 5-fluorouracilo y el Cisplatino.

En un estudio realizado por Woo et al. donde evaluaron la citotoxicidad de la acetogenina cis-annonacin hallaron un CI_{50} de 9,25 $\mu\text{g/mL}$ para la línea MCF-7, mientras que en nuestro estudio encontramos un CI_{50} de 9,4 $\mu\text{g/ml}$ resultados que son comparables¹². En otro estudio realizado por Kim et al. encontraron un CI_{50} en $\mu\text{g/ml}$ de $1,15 \times 10^{-4}$ para las acetogeninas annomolin y $4,06 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g/ml}$ para la annocherimolin¹³.

En cuanto a la línea K562 un estudio que evaluó la citotoxicidad del extracto etanólico de *Goldfussia psilostachys*, una planta que crece en el suroeste de China, encontró un CI_{50} de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ ²³, mientras que en nuestro estudio obtuvimos un CI_{50} de 2,2 $\mu\text{g/ml}$ que si bien es cierto representa una citotoxicidad algo inferior, pero la continua manteniendo en varias líneas celulares mencionadas anteriormente y con menor citotoxicidad para las células normales (3T3).

Para la línea ME-180 (cáncer de cervix) no existen trabajos previos que evalúen la citotoxicidad de las semillas de *Annona cherimola*; sin embargo, existe un estudio donde evaluaron la citotoxicidad de una acetogenina, squamocin, aislada de las semillas de la *Annona reticulata*, donde hallaron un CI_{50} de 0,39 $\mu\text{g/ml}$ para la línea HeLa y HeLa S3 (cáncer de cervix) mientras que el CI_{50} de las semillas de *Annona cherimola* fue de 6,6 $\mu\text{g/ml}$ para la línea ME-180²⁴.

Como se observa en los resultados, el perfil citotóxico del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimola* es muy alentador por su alta citotoxicidad para células tumorales y su baja toxicidad para las células normales; superando en cuanto a índice de selectividad a fármacos ampliamente conocidos como el 5-fluorouracilo y el cisplatino.

Para la quimioterapia del cáncer de mama se utilizan las antraciclina. Sin embargo, los regímenes que contienen Vinorelbina, Cisplatino y 5-fluorouracilo, han reportado también ser efectivos, especialmente en los pacientes que no responden a la terapia endocrina²⁵. En nuestro estudio 5-fluorouracilo y el cisplatino, son superados ampliamente en índice de selectividad por el extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimola* con un valor de 2,17 frente a 0,07 y 0,02 respectivamente.

En cuanto a la leucemia mieloide crónica si bien es cierto que se ha logrado avances importantes con el trasplante de células madre y el uso de los inhibidores de tirosin kinasa, aún es utilizada la quimioterapia donde uno de los antineoplásicos principales es la hidroxíurea²⁶. Aunque en el bioensayo no se haya probado con la hidroxíurea, las semillas de *Annona cherimola* han mostrado ser superior al 5-fluorouracilo más no al cisplatino; sin embargo, tiene un índice de selectividad de 6,07 que supera a los índices del 5-fluorouracilo y del cisplatino que son: 0,06 y 2,26 respectivamente.

Desde hace mucho tiempo los productos naturales han sido estudiados como fuente de agentes antineoplásicos. Esta búsqueda ha resultado alentadora. Tal es el caso los antineoplásicos como la vinblastina y el paclitaxel que se derivan de *Catharanthus roseus* y *Taxus brevifolia* respectivamente²⁷.

Como podemos observar, las semillas de *Annona cherimola* tienen un buen perfil de citotoxicidad y un amplio margen de seguridad, llegando a superar en varias líneas tumorales a medicamentos ampliamente reconocidos, teniendo en cuenta que se comparó el extracto frente a principios activos aislados en trabajos previos. Sería interesante que futuros estudios continúen evaluando las propiedades de la *Annona cherimola* y sobre todo los compuestos de sus semillas, las cuales poseen un gran potencial como fuente de nuevas sustancias anticancerígenos, más aun teniendo en cuenta el origen peruano de esta planta.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Arroyo Acevedo del departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNMSM, por prestar ambientes y asesoría para la preparación del extracto etanólico de semillas de *Annona cherimola*.

RECONOCIMIENTOS

Premio Nacional ABEEFE BRISTOL–MYERS SQUIBB a la Investigación en Medicina 2007, primer puesto categoría estudiantes-internos.

BIBLIOGRAFÍA

1. García H. Flora Medicinal de Colombia. Bogotá: Botánica Médica; 1974; 3: 285-289.
2. Morales A CB, Aquino P. Genetic diversity and geographic distribution of *Annona cherimola* in Southern Ecuador. *Lyonia* 2004;7 (2): 159-170.
3. Chen CY, Chang FR, Pan WB, Wu YC. Four alkaloids from *Annona cherimola*. *Phytochemistry* 2001;56 (7): 753-757.
4. Woo MH, Kim DH, Fotopoulos SS, McLaughlin JL. Annocherin and (2,4)-cis- and trans-annocherinones, monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins with a C-7 carbonyl group from *Annona cherimolia* seeds. *J Nat Prod* 1999; 62 (9): 1250-1255.
5. Chen CY, Chang FR, Chiu HF, Wu MJ, Wu YC. Aromin-A, an Annonaceous acetogenin from *Annona cherimola*. *Phytochemistry* 1999; 51 (3): 429-433.
6. Chen CY, Chang FR, Teng CM, Wu YC. Cheritamine, a new N-fatty acyl tryptamine and other constituents from the stems of *Annona cherimola*. *Journal of the Chinese Chemical Society* 1999b; 46 (1): 77-86.
7. Chen CY, Chang, FR, Wu YC. Cherimoline, a novel alkaloid from the stems of *Annona cherimola*. *Tetrahedron Letters* 1997; 38 (35): 6247-6248.
8. Chen CY, Chang FR, Wu YC. The constituents from the stems of *Annona cherimola*. *Journal of the Chinese Chemical Society* 1997; 44 (3): 313-319.
9. Chen CY, Chang FR, Wu YC. Cherinonaine, a novel dimeric amide from stems of *Annona cherimola*. *Tetrahedron Letters* 1998; 39 (5): 407-410.
10. Chen CY, Chang FR, Yen HF, Wu YC. Amides from the stems of *Annona cherimola*. *Phytochemistry* 1998; 49 (5): 1443-1447.
11. Chen CY, Wu TY, Chang FR, Wu YC. Lignans and kauranes from the stems of *Annona cherimola*. *Journal of the Chinese Chemical Society* 1998; 45 (5): 629-634.
12. Woo MH, Chung SO, Kim DH. cis-Annonacin and (2,4)-cis-and trans-isoannonacins: cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona cherimolia*. *Arch Pharm Res* 1999; 22 (5): 524-528.
13. Kim DH, Ma ES, Suk KD, Son JK, Lee JS, Woo MH. Annomolin and annocherimolin, new cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* seeds. *J Nat Prod* 2001; 64 (4): 502-506.
14. Wele A, Zhang Y, Ndoye I, Brouard JP, Pousset JL, Bodo B. A cytotoxic cyclic heptapeptide from the seeds of *Annona cherimola*. *J Nat Prod* 2004; 67 (9): 1577-1579.

15. Wele A, Ndoye I, Zhang Y, Brouard JP, Bodo B. Cherimolacyclopeptide D, a novel cycloheptapeptide from the seeds of *Annona cherimola*. *Phytochemistry* 2005; 66 (6): 693-696.
16. Wele A, Zhang Y, Brouard JP, Pousset JL, Bodo B. Two cyclopeptides from the seeds of *Annona cherimola*. *Phytochemistry* 2005; 66 (19): 2376-2380.
17. Sheppard C. Breast cancer follow-up: literature review and discussion. *Eur J Oncol Nurs* 2007;11 (4): 340-347.
18. Frame D. Chronic myeloid leukemia: standard treatment options. *Am J Health Syst Pharm* 2006; 63 (23):10-14.
19. Janicek MF, Averette HE. Cervical cancer: prevention, diagnosis, and therapeutics. *CA Cancer J Clin* 2001; 51 (2): 92-114.
20. Waggoner SE. Cervical cancer. *Lancet* 2003; 361 (9376): 2217-2225.
21. "Maes-Heller". CdIeC. Registro del Cáncer de Lima Metropolitana. Lima; 1994-1997.
22. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Victica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82 (13): 1107-1112.
23. Gao X, Zhang G, Zhou M, Luo D, Li B. Antiproliferative activity of *Goldfussia psilostachys* ethanolic extract on K562 leukemia cells. *Fitoterapia* 2004; 75 (7-8): 639-644.
24. Yuan SS, Chang HL, Chen HW, Kuo FC, Liaw CC, Su JH, et al. Selective cytotoxicity of squamocin on T24 bladder cancer cells at the S-phase via a Bax-, Bad-, and caspase-3-related pathways. *Life Sci* 2006; 78 (8): 869-874.
25. Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, Viale G. Breast cancer. *Lancet* 2005; 365 (9472): 1727-1741.
26. Silver RT. Chronic myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2003; 17 (5): 1159-1173.
27. Laza D, Rodríguez I, Sardiña G. Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. *Rev Cubana Plant Med* 2003; 8 (3): e12.

CORRESPONDENCIA

Dr. Angel Quispe Mauricio

angelquispe2@gmail.com

Recibido: 01/03/09

Arbitrado: Sistema por pares

Aprobado: 31/04/09