

TRABAJOS ORIGINALES

ACTIVIDAD CITOTÓXICA *IN VITRO* DE LA MEZCLA DE *Annona muricata* y *Krameria lappacea* SOBRE CÉLULAS CANCEROSAS DE GLÁNDULA MAMARIA, PULMÓN Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Jorge Arroyo A¹, Mahabir Prashad G², Yelkaira Vásquez B², Elena Li P³, Gloria Tomás C⁴

RESUMEN

Objetivos: Determinar la actividad citotóxica de las fracciones procedentes de la combinación 1:1 del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L (guanábana) y el extracto acuoso atomizado de la raíz de *Krameria lappacea* (ratania) en cultivos de líneas celulares cancerosas de glándula mamaria (MCF-7), pulmón (H-460) y sistema nervioso central (SF-268). **Materiales y métodos:** Para el fraccionamiento de la mezcla 1:1 de *Annona* más *Krameria* se preparó una columna cromatográfica de 50 cm de longitud empleando diclorometano, diclorometano:acetato de etilo y CHCl₃:MeOH como sistemas de elusión de polaridad creciente, obteniéndose 186 fracciones. Se evaluaron las fracciones 2 a 83 en cultivo de células cancerosas de glándula mamaria (MCF-7), de pulmón (H-460) y del sistema nervioso central (SF-268). Todas las fracciones fueron ensayadas en duplicado. Aquellas fracciones que presentaron un porcentaje de crecimiento de células cancerosas (%G) <50% en alguna de las tres líneas celulares fueron ensayadas nuevamente a cinco concentraciones, para determinar finalmente la concentración a la cual se inhibe el 50% del crecimiento de las células cancerosas (GI₅₀). Se consideraron activas aquellas fracciones con una GI₅₀ <10 µg/mL. **Resultados:** Las fracciones 7 a 17 procedentes de la asociación de los dos productos naturales frente a los cultivos de las líneas celulares tumorales MCF-7, H-460 y SF-268 mostraron una GI₅₀ de 1,6, 1,4 y 1,4 µg/mL respectivamente. **Conclusiones:** Las fracciones 7 a 17 procedentes de la asociación de *Annona* más *Krameria* mostraron acción citotóxica *in vitro* frente al cultivo de células cancerosas de glándula mamaria, pulmón y del sistema nervioso central.

Palabras clave: Plantas medicinales; Fitoterapia; Citotoxicidad; Agentes Antineoplásicos; Cultivo Celular, *Annona muricata*, *Krameria lappacea* (fuente: DeCS BIREME).

ABSTRACT

Objectives: To determine cytotoxic activity of fractions from a 1:1 combination of an ethanol extract of *Annona muricata* leaves (soursop) and atomized aqueous extract of *Krameria lappacea* root (Ratania) in breast (MCF-7), lung (H-460), and central nervous system (SF-268) cancer cell cultures. **Material and methods:** For fractionating the 1:1 mixture of *Annona* and *Krameria* a 50-cm long chromatographic column was prepared using dichloromethane, dichloromethane: ethyl acetate and CHCl₃:MeOH as increasing polarity eluting systems and 186 fractions were obtained. Fractions 2 to 83 were assessed in breast (MCF-7), lung (H-460), and central nervous system (SF-268) cancer cell cultures. All fractions were assessed two times. Those fractions that showed <50% growth of cancer cells (%G) in any of the three cell lines were assayed once again using five different concentrations, in order to determine the concentration where there was a 50% inhibition of cancer cell growth (GI₅₀). Those fractions with a <10 µg/mL GI₅₀ were considered to be active against cancer cell lines. **Results:** Fractions 7 to 17 of the association of the two aforementioned natural products has GI₅₀ values reported as 1,6, 1,4, and 1,4 µg/mL against MCF-7, H-460, and SF-268 cancer cell lines, respectively. **Conclusions:** Fractions 7 to 17 of the *Annona* and *Krameria* combination showed *in vitro* cytotoxic activity against breast, lung, and central nervous system cancer cultured cells.

Key words: Medicinal Plants; Phytotherapy; Cytotoxicity; Antineoplastic Agents, Cell Culture; *Annona muricata*, *Krameria lappacea* (source: DeCS BIREME).

¹ Facultad de Medicina Humana, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

² CIFLORPAN (Centro de Investigaciones Farmacognósticas de la Flora Panameña), Facultad de Farmacia, Universidad de Panamá. Panamá, República de Panamá.

³ Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

⁴ Facultad de Química e Ingeniería Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo, se relaciona con mayor índice de morbilidad y mortalidad; la enfermedad se diagnostica en gran parte en una etapa avanzada sin las alternativas terapéuticas eficaces¹; el cáncer de mama es el más común en mujeres de la mayor parte del mundo, la incidencia va en promedio de 95 por 100 000 en los países desarrollados y en 20 por 100 000 en los países en desarrollo².

Por muchos años, las acciones citotóxicas de las drogas quimioterapéuticas fueron atribuidas solamente a su capacidad de inducir la muerte genotóxica³; sin embargo, se han acumulado evidencias que estos agentes ejercen sus efectos citotóxicos principalmente induciendo apoptosis en células del tumor; la debilitación de la apoptosis está relacionada con la inmortalidad de la célula y la carcinogénesis³.

Actualmente se dispone de una gama de drogas quimioterapéuticas como el etopósido, camptotecina, VM26, vincristina, cisplatino, ciclofosfamida, paclitaxel, 5-fluorouracilo y doxorubicina que inducen la apoptosis en las células neoplásicas⁴⁻⁶; pero debido a la necesidad de seguir encontrando alternativas para el tratamiento del cáncer, se han buscado a través de los datos etnomédicos, plantas medicinales que puedan tener alguna actividad antitumoral, para identificar posteriormente sus sustancias activas⁷⁻⁸.

Dentro de este grupo de plantas, en la medicina tradicional peruana, se reconoce a las hojas de *Annona muricata* y la raíz de *Krameria lappacea* como agentes antiinflamatorios, astringentes, hemostáticos y antidisentéricos⁹⁻¹⁰.

La *Annona muricata* L (guanábana), de la familia Annonaceae, es un árbol pequeño y ramificado, con hojas gruesas y siempre verdes, brillantes en la parte inferior, de amplia distribución¹⁰, en la cual se han encontrado más de 50 acetogeninas con diferentes actividades biológicas presentes en frutos, corteza y hojas; identificándose 21 acetogeninas citotóxicas en las hojas¹¹.

Se ha evaluado la actividad citotóxica *in vitro* de los extractos de la *Annona muricata* contra diversas líneas celulares tumorales como el carcinoma pancreático línea PAKA-2¹², cáncer prostático línea PC-3¹³, carcinoma pulmonar(A-549), adenocarcinoma de colon(HT-29), carcinoma de mama(MCF-7), carcinoma epidermoide(KB), células HepG2 o células de hepatoma humano¹⁴. Su actividad citotóxica se podría

explicar por la presencia de la uvaricina, que es una acetogenina que estaría inhibiendo la enzima NADH, ubiquinona oxidoreductasa o complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial¹⁵.

La *Krameria lappacea* (ratania) clasificada en una pequeña familia monotípica emparentada con las Polygalaceae; es un subarbusto con flores rojas que crece en la altitud de Perú a Chile, se emplea por sus órganos subterráneos desecados (raíces), generalmente fragmentados y cocidos para uso antiinflamatorio¹⁰.

Los metabolitos secundarios presentes en estas plantas, entre ellos los compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos y taninos), son la categoría más grande de compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, son biológicamente activos y considerados como potenciales agentes quimiopreventivos del cáncer¹⁶⁻¹⁷.

Los estudios fitoquímicos indican que al asociar *Annona muricata* más *Krameria lappacea* se incrementa el número de compuestos fenólicos y triterpenoides, ambos con diferente estructura química¹⁸, por lo que se plantea que al asociarlas se dispondría de un extracto rico en estos compuestos, que estarían coadyuvando en la actividad citotóxica.

Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue determinar la actividad citotóxica de las fracciones procedentes de la combinación 1:1 del extracto etanólico de hojas *Annona muricata* L (guanábana) y el extracto acuoso atomizado de raíz *Krameria lappacea* (ratania) en cultivos de líneas celulares cancerosas MCF-7: células cancerosas de glándula mamaria; H-460: células cancerosas de pulmón; y SF-268: células cancerosas del sistema nervioso central.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL DE ESTUDIO

Las hojas de *Annona muricata* L (guanábana) fueron recolectadas del caserío de San José Bajo del distrito de Santiago de Cao, provincia de Ascope, departamento La Libertad; en tanto que la raíz de *Krameria lappacea* (Dombey) Burdet & B. Simpson (ratania) de la zona agrícola de Huacho, departamento de Lima; para la posición taxonómica de ambas plantas se tuvo en cuenta el sistema de clasificación de Cronquist (1988), y fue realizada en el Herbario San Marcos del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

ESTUDIOS FITOQUÍMICOS^{19,20}

Preparación del extracto alcohólico de hojas de *Annona muricata*. Se preparó según la técnica de maceración etanólica, se maceró en 10 L de etanol cinco kilos hojas secas y pulverizadas, durante ocho días al cabo del cual se filtró obteniéndose la solución etanólica que se concentró a sequedad en estufa con temperatura regulable (≤ 40 °C) y se obtuvo el extracto etanólico seco.

Preparación del extracto acuoso de la raíz de *Krameria lappacea*. Cinco kilos de raíz seca, pulverizadas se maceró con agua destilada fría por 24 horas al cabo del cual se filtró obteniéndose una solución acuosa que se concentró a sequedad a estufa con temperatura regulable (≤ 40 °C) y se obtuvo el extracto acuoso seco.

MARCHA FITOQUÍMICA^{19,20}

Cada reacción de identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico seco se realizó con los reactivos específicos, los resultados se mostraron indicando presencia o ausencia del metabolito: 5 mg de extracto problema con 5 gts de reactivos.

Cromatografía en capa fina. Se usó como muestra problema el extracto etanólico seco F1; para la fase fija el silicagel G 60, para la fase móvil: cloroformo:metanol (3:1); y como reveladores: luz visible, luz UV, reactivo de Dragendorff, H₂SO₄ al 50% y FeCl₃.

Cromatografía en columna rápida. Se usó solventes de polaridad creciente: n-hexano, cloroformo, metanol y agua destilada, para fraccionar el extracto etanólico total y separar metabolitos afines y poder relacionar estructura química con actividad farmacológica de cada subextracto.

Cromatografía en capa fina preparativa. Se usó esta técnica fisicoquímica para purificar y aislar metabolitos secundarios de mayor concentración en los subextractos.

FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LA ASOCIACIÓN 1:1 DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS DE *Annona muricata* MÁS EL EXTRACTO ACUOSO DE LA RAÍZ DE *Krameria lappacea*.

Se pesaron cinco gramos de muestra y se disolvieron en cantidad suficiente de metanol. Se preparó una

columna con 150 g de silicagel en hexano CH₂Cl₂ (1:1). Se corrió la muestra en la columna cromatográfica de 50 cm de longitud empleando los siguientes sistemas de elusión de polaridad creciente, obteniéndose 186 fracciones:

1. Diclorometano CH₂Cl₂ de (1- 44)
2. Diclorometano: Acetato de Etilo CH₂Cl₂: EtOAc (1:1) de (45 - 153)
3. CHCl₃: MeOH (1:1) de (154 - 186)

ENSAYO EN CULTIVO CELULAR

La actividad citotóxica fue determinada de acuerdo con el método de Monks *et al.*^{21,22}. El cual evalúa la citotoxicidad de las muestras en tres líneas celulares: cáncer de glándula mamaria (MCF-7), cáncer de pulmón (H-460) y cáncer del sistema nervioso central (SF268), proporcionadas por el Instituto Nacional del Cáncer de Washington.

Cada línea celular fue inoculada en microplatos de 96 posillos e incubada por 24 horas a 37 °C con 5% CO₂. Al cabo de las 24 horas se adicionaron las muestras [el extracto etanólico de las hojas *Annona muricata* L (A), el extracto acuoso atomizado de la raíz de *Krameria lappacea* (K), las fracciones 2 a la 83 procedentes de la asociación de los extractos (1:1) de *Annona* más *Krameria* (M); y como patrón la adriamicina], luego se incubó por 48 horas.

Transcurridas las 48 horas se retiraron los microplatos de la incubadora, se dejaron reposar por cinco minutos y se realizó la fijación de las células con ácido tricloroacético. Subsecuentemente se tiñeron los microplatos con una solución de sulforodamina por 15 minutos, luego se enjuagaron con ácido acético 1% y se secaron al aire.

Finalmente se adicionó Tris base 10mM a cada posillo del microplato y se colocó en el lector de platos ELISA (*Bio-Tek Instruments*, Inc. Modelo ELX-800). Todas las fracciones fueron ensayadas en duplicado.

Aquellas fracciones que presentaron un porcentaje de crecimiento de células cancerosas (%G) <50% en alguna de las tres líneas celulares fueron ensayadas nuevamente a cinco concentraciones, para determinar finalmente la GI₅₀ (concentración a la cual se inhibe el 50% del crecimiento de las células cancerosas) de éstas. Se consideraron activas aquellas fracciones con una GI₅₀ <10 µg/mL.

ANÁLISIS DE DATOS

Los datos obtenidos fueron introducidos mediante el programa KC Junior a una hoja de Excel® para así determinar los valores de porcentaje de crecimiento de las células cancerosas %G y la concentración a la cual se inhibió el 50% del crecimiento de las células cancerosas GI₅₀.

RESULTADOS

ESTUDIO FITOQUÍMICO

El estudio fitoquímico de *Annona muricata* y *Krameria lappacea* permitió la separación de 147 fracciones, siendo evaluadas solamente las 83 primeras por mayor cantidad disponible; las pruebas de caracterización e identificación revelaron que el extracto metanólico de la asociación de las hojas de *Annona muricata* L más la raíz de *Krameria lappacea*, contiene en gran cantidad: saponinas triterpenoides, flavonoides, taninos, alcaloides y quinonas, estando ausentes las cumarinas; en las fracciones 7 - 17 se

detectaron presencia de terpenoides y saponinas triterpénicas; en las fracciones 34 a 83 se puede esperar la presencia de flavonoides, taninos, alcaloides (Tabla 1 y 2).

ESTUDIO IN VITRO

Al analizar el extracto etanólico de las hojas *Annona muricata* L, el extracto acuoso atomizado de la raíz de *Krameria lappacea*, la combinación (mezcla 1:1) de ambos extractos (*Annona* más *Krameria*) y las fracciones 2 a la 83 a una concentración única de 10 µg/mL en las líneas celulares MCF-7 (cáncer de glándula mamaria), H-460 (cáncer de pulmón) y SF-268 (cáncer de sistema nervioso central), se observó que únicamente la fracción 7-17 mostró un porcentaje de crecimiento de las células cancerosas (%G) menor de 50% (Tabla 3).

Se determinó la GI₅₀ de las fracciones 7-17 de la mezcla de A + K para las tres líneas celulares cancerosas, resultando para MCF-7 en 1,6 µg/mL, H-460 en 1,4 µg/mL y para SF-268 en 1,4 µg/mL.

Tabla 1. Pruebas de caracterización fitoquímica preliminar de la asociación 1:1 de las dos plantas de las hojas de *Annona muricata* más la raíz de *Krameria lappacea*.

Prueba de caracterización	Metabolito secundario	Calificación
Reacción de Dragendorff	Alcaloides	(+++)
Reacción de Shinoda	Flavonoides	(+++)
Prueba de la espuma	Saponinas	(+++)
Reacción del tricloruro férrico	Compuestos fenólicos	(+++)
Reacción de la gelatina	Taninos (tipo catequínicos)	(+++)
Reacción de Liebermann-Burchard	Esteroides o terpenoides	(+++)
Reacción de Molish (alfa naftol)	Glicósidos	(+++)
Reacción de indentificación	Cumarinas	(-)
Reacción de Borntrager	Quinonas	(+++)

(-) = ausente; (+) = poca cantidad; (++) mediana cantidad; (+++) = abundante cantidad

Tabla 2. Características físicas y compuestos hallados en las fracciones procedentes de la asociación 1:1 de las dos plantas de las hojas de *Annona muricata* más la raíz de *Krameria lappacea*.

Fracción	Características físicas	Compuestos
Fracción 2-6	Solución incolora	-
Fracción 7 - 11	Precipitado blanco en solución clara	Terpenoides, saponinas
Fracción 12 - 22	Precipitado grasiento en solución clara	Terpenoides, saponinas
Fracción 23	Precipitado parduzco en solución clara	Terpenoides
Fracción 24 - 33	Precipitado marrón	Terpenoides
Fracción 34 - 40	Solución clara	-
Fracción 41 - 70	Precipitado semejante a grasa amarillenta	Flavonoides, taninos, alcaloides
Fracción 72 - 83	Precipitado color caramelo	Flavonoides, taninos, alcaloides
Fracción 84 - 152	Solución marrón oscura	Flavonoides
Fracción 153 - 186*	Ningún tipo de separación	-

* Fracciones posteriores no fueron de interés fitoquímico.

Tabla 3. Actividad citotóxica *in vitro* de las fracciones de *Annona muricata* más *Krameria lappacea* sobre células tumorales de mama(MCF-7), pulmón(H-460) y del sistema nervioso central(SF268).

Código muestra	Línea celular	Actividad* %G	Calificación
Annona (A)	MCF-7	92,6	Inactivo
Annona (A)	H-460	97,3	Inactivo
Annona (A)	SF268	94,3	Inactivo
Krameria (K)	MCF-7	61,1	Inactivo
Krameria (K)	H-460	62,0	Inactivo
Krameria (K)	SF268	71,2	Inactivo
Mezcla A+K (M)	MCF-7	77,6	Inactivo
Mezcla A+K (M)	H-460	80,7	Inactivo
Mezcla A+K (M)	SF268	81,9	Inactivo
Fracciones 7-17	MCF-7	1,6	Activo
Fracciones 7-17	H-460	1,4	Activo
Fracciones 7-17	SF268	1,4	Activo
Fracciones 72-83	MCF-7	72,6	Inactivo
Fracciones 72-83	H-460	60,3	Inactivo
Fracciones 72-83	SF268	54,4	Inactivo

(A)= extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L.; (K) = extracto acuoso de la raíz de *Krameria lappacea*; (M) = mezcla 1:1 de *Annona* y *Krameria*; * Porcentaje crecimiento de las células cancerosas (%G)

DISCUSIÓN

Se evidenció que sólo las fracciones 7 a 17 procedentes de la asociación del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L (guanábana) y el extracto acuoso atomizado de la raíz de *Krameria lappacea* (ratania) tuvieron efecto citotóxico *in vitro* frente a las líneas celulares de cáncer de glándulas mamarias, pulmón y sistema nervioso (Tabla 3), posiblemente por la presencia de terpenoides y saponinas (Tabla 2).

La asociación de las dos plantas es importante porque ha permitido disponer de un extracto vegetal rico en compuestos fenólicos y triterpenoides¹⁸, y por fraccionamiento (Tabla 2) los terpenoides y saponinas están presentes en las fracciones 7-17, las cuales fueron activas frente a las líneas celulares de cáncer de mama, pulmón y sistema nervioso; asimismo se observa que al usar por separado el extracto de *Annona muricata* y *Krameria lappacea* eran inactivos, lo cual contrasta con estudios anteriores, en los que se demuestra que los extractos de hoja de guanábana son activos frente a líneas de células cancerígenas¹¹⁻¹⁴.

La bioactividad observada sobre el cultivo celular de células tumorales en la presente investigación se explicaría posiblemente por la presencia de terpenoides y saponinas, metabolitos secundarios que expresan actividad citotóxica como a continuación se detalla.

Los terpenoides constituyen el más amplio conjunto conocido como metabolitos secundarios de los vegetales, se clasifican en monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, esteroides, carotenos, poliisoprenos²³. Así se han evaluado ha diversos compuestos procedentes de plantas demostrando su potencial anticancerígeno²⁴, como el caso del ácido kaurenoico un diterpeno aislado de la oleoresina de *Copaifera langsdorffii*, que demostró inhibir *in vitro* el crecimiento de células leucémicas, cáncer de mama y cáncer de colon²⁵.

Las saponinas constituyen un amplio grupo de heterósidos muy frecuentes en los vegetales²³ con propiedad antimicótica, antibacteriana antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena²⁶. Existe una familia de saponinas triterpenoides (avecina de *Acacia victoriae*) que disminuye la proliferación celular del tumor e induce apoptosis²⁷; también inhiben moléculas proinflamatorias tales como sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y la expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX2)²⁸; otros derivados como los ginsenósidos de las hojas de *Panax ginseng* muestran propiedades antiinflamatorias²⁹ e inhiben la invasión y metástasis de células tumorales³⁰ y el desarrollo del tumor³¹; las saponinas de la soya suprimen el crecimiento *in vitro* de células de adenocarcinoma de colón³²; nuevas saponinas triterpenoides procedentes de *Albizia julibrissin* Durazz han mostrado una significativa actividad *in vitro*³³; protoneodioscina (NSC-698789) es una saponina del rizoma de *Dioscorea collettii* var. hypoglauca (Dioscoreaceae), evidenció actividad citotóxica contra líneas celulares de leucemia, sistema nervioso central, y de próstata³⁴.

Se reporta actividad citotóxica *in vitro* para algunas especies de las Dioscoreaceae como *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill y *Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill, siendo el extracto acuoso más efectivo contra líneas celulares del cáncer de mama, colon y pulmón, pero menos en células normales (IC₅₀) 5,5, 15,6, 16,3 y 78,4 mg/ml, respectivamente), según Itharat *et al*³⁵; posiblemente por la presencia de saponinas en el género dioscórea, metabolitos secundarios que han evidenciado actividad citotóxica³⁶⁻³⁸.

Los modelos en investigación de la citotoxicidad *in vitro* proporcionan datos preliminares importantes a los extractos selectos de plantas, ayudan a proyectar para este caso en particular de la investigación, características antineoplásicas potenciales para el trabajo futuro^{39,40}; en una fase siguiente de investigación debería ser la verificación de la eficacia utilizando animales de experimentación, en donde además debería

buscarse la seguridad de los productos, para seguidamente hacer estudios de investigación clínica en caso se encuentren resultados positivos.

Se recomienda realizar estudios fitoquímicos de mayor profundidad mediante técnicas modernas que permitan la separación de compuestos más puros, su identificación, y la evaluación de su actividad; así mismo, se debería continuar buscando mayores evidencias mediante el uso de animales de experimentación, que corroboren el efecto *in vitro* hallado.

En conclusión, las fracciones 7 - 24 se detectaron presencia de terpenoides y saponinas triterpénicas; y en las otras fracciones se observa la presencia de flavonoides, taninos. Las fracciones 7 a 17 procedentes de la asociación de *Annona* más *Krameria* mostraron ser efectivas frente a los cultivos de células cancerosas de glándula mamaria (MCF-7), pulmón (H-460) y sistema nervioso central (SF-268).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Digel W, Lübbert M.** DNA methylation disturbances as novel therapeutic target in lung cancer: Preclinical and clinical results. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 55(1): 1-11.
- Tan M, Sulaiman S, Najimuddin N, Samian M, Muhammad T.** Methanolic extract of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47-D cell line. *J Ethnopharmacol* 2005; 98(1-2): 287-94.
- Kamesaki H.** Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *Int J Hematol* 1998; 68(1): 29-43.
- Kaufmann SH.** Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res* 1989; 49(21): 5870-78.
- Havrilesky LJ, Elbendary A, Hurteau JA, Whitaker RS, Rodriguez GC, Berchuck A.** Chemotherapy-induced apoptosis in epithelial ovarian cancers. *Obst Gynecol* 1995; 85(6): 1007-10.
- Huschtscha LI, Bartier WA, Ross CE, Tattersall MH.** Characteristics in cancer death after exposure to cytotoxic drugs in vitro. *Brit J Cancer* 1996; 73(1): 54-60.
- Cordell G, Beecher C, Pezzuto J.** Can ethnopharmacology contribute to the development of new anticancer drugs? *J Ethnopharmacol* 1991; 32(1-3): 117-33.
- Chapuis J, Sordat B, Hostettmann K.** Screening for cytotoxic activity of plants used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 1988; 23(2-3): 273-84.
- Gupta MP.** 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Santa Fe de Bogotá: Editorial Presencia; 1995.
- Soukup J.** Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana y catálogo de los géneros. Lima: Editorial Salesiana; 1987.
- Kim GS, Zeng L, Alali L, Wu F, Sastrodihardjo S, McLaughlin J.** Muricoreacin and murihexocin C. mono-tetrahydrofuran acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. *Phytochemistry* 1998; 49(2): 565-71.
- Hopp DC, Zeng L, Gu ZM, Kozlowski JF, McLaughlin JL.** Novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, from the bark of *Annona squamosa*, showing cytotoxic selectivities for the human pancreatic carcinoma cell line, PACA-2. *J Nat Prod* 1997; 60 (6): 581-86.
- Hopp DC, Zeng L, Gu Z, McLaughlin JL.** Squamotacin: an annonaceous acetogenin with cytotoxic selectivity for the human prostate tumor cell line PC-3. *J Nat Prod* 1997; 59(2): 97-99.
- Chang FR, Liaw CC, Lin CY, Chou CJ, Chiu HF, Wu YC.** New adjacent Bis-tetrahydrofuran Annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Planta Med* 2003; 69(3): 241-46.
- Tormo J, González M, Cortes D, Estornell E.** Kinetic characterization of mitochondrial complex I inhibitors using annonaceous acetogenins. *Arch Biochem Biophys* 1999; 369(1): 119-26.
- Krishnaswamy K, Raghuramulu N.** Bioactive phytochemicals with emphasis on dietary practices. *Indian J Med Res.* 1998; 108: 167-81.
- Stavric B.** Role of chemopreventers in human diet. *Clin Biochem* 1994; 27(5): 319-32.
- Arroyo J, Rojas J, Ruez E, Ronceros G, Bonilla P, Li E.** Influencia de compuestos fenólicos y triterpenoides de *Annona muricata* más *Krameria lappacea* sobre el proceso inflamatorio crónico. Estudio preclínico y clínico. *An Fac Med* 2004; 65(Supl 1): 36.
- Lock O.** Investigación fitoquímica; métodos en el estudio de productos naturales, 2^{da} ed. Lima: Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
- Domínguez XA.** Métodos de investigación fitoquímica. México: Limusa; 1973.
- Monks A, Scudiero DA, Johnson GS, Pauli KD, Sausville EA.** The NCI anti-cancer drug screen: a smart screen to identify effectors of novel targets. *Anticancer Drug Des* 1997; 12(7): 533-41.
- Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Pauli K, Vistica D, et al.** Feasibility of high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Nat Cancer Inst* 1991; 83(11): 757-66.
- Bruneton J.** Farmacognosia: Fitoquímica. Plantas medicinales. 2^{da} ed. Zaragoza: Ed. Acribia; 2001.
- Setzer WN, Setzer MC.** Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Mini Rev Med Chem* 2003; 3(6): 540-56.
- Costa-Lotufo L, Cunha GM, Farias PA, Viana GS, Cunha KM, Pessoa C, et al.** The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated

- from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. *Toxicol* 2002; 40(8): 1231-34.
- 26 **Lin RC, Hanquet B, Lacaille-Dubois MA.** Aferoside A, a steroidal saponin from *Costus afer*. *Phytochemistry* 1996 ; 43 (3) : 665-68.
- 27 **Haridas V, Higuchi M, Jayatilake G, Bailey D, Mujoo K, Blake M, et al.,** Avicins: triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98(10) 5821-26.
- 28 **Haridas V, Arntzen C, Gutterman J.** Avicins, a family of triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth), inhibit activation of nuclear factor-kappaB by inhibiting both its nuclear localization and ability to bind DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(20) 11557-62.
- 29 **Shibata S.** Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds, *J Korean Med Sci* 2001; 16(Suppl): S28-37.
- 30 **Zhu JH, Takeshita T, Kitagawa I, Morimoto K.** Suppression of the formation of sister chromatid exchanges by low concentrations of ginsenoside Rh2 in human blood lymphocytes. *Cancer Res* 1995; 55(6): 1221-23.
- 31 **Kikuchi Y, Sasa H, Kita T, Hirata J, Tode T, Nagata I.** Inhibition of human ovarian cancer cell proliferation in vitro by ginsenoside Rh2 and adjuvant effects to cisplatin in vivo, *Anticancer Drugs* 1991; 2(1): 63-67.
- 32 **Sung MK, Kendall CW, Koo MM, Rao AV.** Effect of soybean saponins and gypsophilla saponin on growth and viability of colon carcinoma cells in culture. *Nutr Cancer* 1995; 23(3): 259-70.
- 33 **Liang H, Tong WY, Zhao YY, Cui JR, Tu GZ.** An antitumor compounds julibroside J28 from *Albizia julibrissin*. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; 15(20): 4493-95.
- 34 **Hua K, Yao X.** The cytotoxicity of protoneodioscin (NSC-698789), a furostanol saponin from the rhizomes of *Dioscorea collettii* var. *hypoglauca*, against human cancer cells in vitro. *Phytomedicine* 2002; 9(6): 560-65.
- 35 **Itharat A, Houghton P, Eno-Amooquaye E, Burke PJ, Sampson J, Raman A.** In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *J Ethnopharmacol* 2004; 90(1): 33-38.
- 36 **Kosuge T, Yokota M, Sugiyama K, Yamamoto T, Yan SC.** [Studies on antitumor activities and antitumor principles of Chinese herbs I. Antitumor activities of Chinese herbs]. *Yakugaku Zasshi* 1985; 105(8): 791-95.
- 37 **Dong M, Feng X, Wang B, Wu L, Ikejima T.** Two novel furostanol saponins from the rhizomes of *Dioscorea panthaica* Prain et Burkill and their cytotoxic activity. *Tetrahedron* 2001; 57(3): 501-6.
- 38 **Liu HW, Hu K, Zhao QC, Cui CB, Kobayashi H, Yao XS.** Bioactive saponins from *Dioscorea futschauensis*. *Pharmazie* 2002; 57(8): 570-72.
- 39 **Cardellina JH, Fuller RW, Gamble WR, Westergaard C, Boswell J, Munro, M, et al.** Evolving strategies for the selection, de replication and prioritization of antitumor and HIV-inhibitory natural products extracts. In: Bohlin L, Bruhn JG (Eds.). *Bioassay methods in natural product research and development*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1999. p. 25-36.
- 40 **Keawpradub N, Eno-Amooquaye E, Burke PJ, Houghton PJ.** Cytotoxic activity of indole alkaloids from *Alstonia macrophylla*. *Planta Med* 1999; 65(4): 311-15.

Correspondencia: Jorge Luis Arroyo Acevedo. Facultad de Medicina Humana, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
Dirección: Calle Acuarios 104 Urbanización Naval. Ventanilla, Callao.
Teléfono: (511) 553-4736
Correo electrónico: jorgeluis_arroyoacevedo@yahoo.es