

Artículo de revisión

Acetogenins, alternative cancer treatment in dogs*Acetogeninas, alternativa en el tratamiento de cáncer en caninos**Acetogeninas, alternativa no tratamiento de câncer em caninos*Mónica Marcela Gaviria Calle¹, Biol, MSc, CvLAC, Silvia Posada Arias^{2*} ✉, MV, Adm Emp, MSc, cPhD, CvLAC; Juliana Mira Hernández^{2*}, MV, MSc, CvLAC**Fecha correspondencia:**

Recibido: 3 de marzo de 2018.

Aceptado: 17 de agosto de 2018.

Forma de citar:

Gaviria Calle MM, Posada Arias S, Mira Hernández J. Acetogeninas, alternativa en el tratamiento de cáncer en caninos. Rev. CES Med. Zootec. 2018; Vol 13 (2): 157-172.

[Open access](#)[© Copyright](#)[Creative commons](#)[Ethics of publications](#)[Peer review](#)[Open Journal System](#)DOI: [http://dx.doi.org/10.21615/](http://dx.doi.org/10.21615/cesmvz.13.2.5)[cesmvz.13.2.5](#)

ISSN 1900-9607

Filiación:*Autor para correspondencia: Silvia Posada Arias, carrera 51 118 Sur 57, Caldas Antioquia, 3201999. siposada@lasallistasdocentes.edu.co¹ Corporación Universitaria Lasallista, Caldas, Colombia.

Comparte

**Abstract**

Cancer is a disease that alter cellular processes, like cell metabolism, activation and deactivation of genes and uncontrolled growth. It is one of the main causes of death in humans, as well as in companion animals, which is why it is increasingly important to seek and develop medicines for the treatment. Some of the drugs that are produced to treat cancer come from plants, such as taxol and vincristine. The necessity to expand the use of natural products to treat this disease, not only in humans but also in companion animals such as dogs, opens the doors to seek biological activity of plants that are commonly used because they present some effect over the disease. This is the case of soursop (*Annona muricata*), from which secondary metabolites (acetogenins) have been extracted and have presented *in vitro* greater toxicity in cancer cell lines compared to normal cell lines. Therefore, this review was carried out in order to make an approximation of the uses of these metabolites in cancer, for which a search was carried out in PubMed with different key words and it was concluded that acetogenins comprise a potential source for the development of medicines against cancer.

Keywords: *Acetogenins, cancer, canine, ACGs.***Resumen**

El cáncer es una enfermedad que implica la alteración de procesos celulares, como metabolismo celular, activación o silenciamiento de genes y crecimiento descontrolado. Es una las principales causas de muerte en humanos, así como en animales de compañía, por lo cual cada vez es más importante la búsqueda y desarrollo de medicamentos. Algunos de los medicamentos que se producen para tratar el cáncer, provienen de plantas, como el taxol y la vincristina. La necesidad de ampliar el uso de productos naturales para tratar esta enfermedad, no solo en humanos sino en animales de compañía como caninos, abre las puertas a la búsqueda de actividad biológica de plantas que son usadas popularmente por presentar algún efecto con la enfermedad. Este es el caso de la guanábana (*Annona muricata*), de la cual se han extraído metabolitos secundarios (acetogeninas) que presentan *in vitro* mayor toxicidad en líneas celulares cancerígenas comparadas con líneas celulares normales. El fin de esta revisión fue realizar una aproximación de los usos de estos metabolitos en cáncer,

² Grupo de Investigación en Medicina Veterinaria GIVET, Corporación Universitaria Lasallista, Caldas, Colombia.

para ello fue hecha una búsqueda en PubMed con diferentes palabras claves y se concluyó, que las acetogeninas comprenden una fuente potencial para el desarrollo de medicamentos contra el cáncer.

Palabras clave: *Acetogeninas, cáncer, caninos, ACGs.*

Resumo

O câncer é uma doença que envolve a alteração de processos celulares, como o metabolismo celular, ativação ou silenciamento de genes e o crescimento descontrolado. É uma das principais causas de morte em humanos, assim como em animais de companhia, para os quais a busca e o desenvolvimento de medicamentos são cada vez mais importantes. Algumas das drogas que são produzidas para tratar o câncer são derivadas de plantas, como o taxol e a vincristina. A necessidade de ampliar o uso de produtos naturais para tratar esta doença, não somente em humanos, mas em animais de companhia, como cães, abre as portas para a busca da atividade biológica de plantas que são popularmente usadas para causar algum efeito na doença. Este é o caso da graviola (*Annona muricata*), da qual se extraíram os metabólitos secundários (acetogeninas), que apresentam maior toxicidade *in vitro* nas linhagens de células cancerígenas do que nas linhagens normais. O objetivo desta revisão foi fazer uma aproximação dos usos desses metabólitos no câncer, para os quais foi feita uma pesquisa em PubMed com palavras-chave diferentes e concluiu-se que as acetogeninas constituem uma fonte potencial para o desenvolvimento de drogas anti-câncer.

Palavras-chave: *Acetogeninas, cães, câncer, ACGs.*

Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS): “el cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolada de células. Se puede presentar en cualquier parte del cuerpo, invadir el tejido circundante y provocar metástasis en puntos distantes del organismo. Muchos tipos de cáncer se podrían prevenir evitando la exposición a factores de riesgo comunes como el consumo de cigarrillo” ⁵⁸.

El cáncer es una enfermedad en la cual intervienen factores micro-ambientales, genéticos, epigenéticos, ambientales y factores de riesgo ^{23, 32, 73}. En los factores microambientales, se presentan las células del estroma no transformadas, como células endoteliales, fibroblastos, algunas células del sistema inmune y matriz extracelular (ECM) que brindan soporte, oxígeno, nutrientes y factores que permiten la degradación de la matriz y potencian la metástasis ²³ la alteración de oncogenes y genes supresores de tumor intervienen en diferentes procesos que van a favorecer la progresión del cáncer, como el gen *ras* que mutado puede conferir al tumor capacidad metastásica entre otras funciones ³², c-Kit receptor de la familia tirosina quinasa (RTK) potencia la proliferación celular e invasión ⁷³, entre otros genes que contribuyen al desarrollo del cáncer ^{32, 73}.

El desarrollo del tumor o de una segunda neoplasia puede ser ocasionada por el mismo tratamiento como es el caso de la radioterapia, que se utiliza en diferentes tipos de cáncer y se ha encontrado asociada con tumores en el sistema nervioso central, cáncer del tracto digestivo, cáncer de piel, entre otros ^{52, 70}.

Debido a los efectos de las terapias convencionales, el desarrollo de mejores medicamentos para el tratamiento del cáncer es un tema de interés mundial, tanto para humanos como para animales de compañía, por lo cual la búsqueda de compuestos de productos naturales con actividad antitumoral se presenta como una opción [15](#), [22](#). Los productos naturales, metabolitos secundarios producidos por diferentes procesos en plantas, hongos, bacterias y otros seres vivos, han sido usados desde hace mucho tiempo en el tratamiento de muchas enfermedades y se perfilan como buenos candidatos para el desarrollo de diferentes medicamentos [22](#), [50](#).

Los metabolitos de la familia Annonaceae, a la cual pertenece una fruta extensamente producida en Colombia, como la guanábana [54](#), han sido caracterizados por presentar actividad antitumoral en diferentes líneas celulares malignas, asimismo se ha observado reducción de tumores inducidos en ratones [14](#), [49](#). Igualmente, en Colombia se produce una gran cantidad de residuos de guanábana, por lo cual debe aprovecharse este insumo para innovar de forma sostenible en el campo farmacéutico.

Con base en esto la presente revisión describe generalidades del cáncer, qué son las acetogeninas, cómo actúan en procesos antioncogénicos y los desarrollos que se han obtenido hoy en día, con el fin de mejorar el conocimiento del papel que tienen las acetogeninas como futura terapia alternativa contra el cáncer tanto en humanos como en perros, debido a la similitud de ambas enfermedades.

Para ello en el buscador PubMed se utilizaron las palabras claves: *Acetogenins and cancer*, *Acetogenins anticancer*, *Annona muricata*, *cancer*, *acetogenins* y *canine cancer*; como buscador secundario se utilizó Scielo con las palabras claves cáncer y acetogeninas. Se revisaron al azar las referencias y en caso de ser necesario fue buscada la referencia inicial sugerida por los artículos revisados.

Generalidades del cáncer

La *International Agency for Research on Cancer* (IARC) predice para el 2020 17,1 millones de casos nuevos de cáncer y 10,1 millones de personas morirán de cáncer alrededor del mundo [33](#). Y aunque se han desarrollado muchos tratamientos subdivididos principalmente en resección quirúrgica, quimioterapia y radioterapia, aún existe un vacío en los mismos, porque la cirugía no siempre resulta exitosa, algunos medicamentos no son muy específicos, el costo no garantiza el acceso de todos los pacientes, se reporta resistencia al tratamiento con una gran variedad de medicamentos y sus combinaciones, o los efectos secundarios generan otro tipo de neoplasia [42](#), [57](#).

En términos de la organización mundial de la salud (OMS), el cáncer es un proceso que implica alteraciones, crecimiento y diseminación incontrolada de células; algunos tipos de cáncer se podrían prevenir evitando la exposición a factores de riesgo, como el consumo crónico de alcohol, exposición a aflatoxinas, exposición a virus oncogénicos, tabaco, entre otros [33](#), [58](#).

A nivel celular, una célula cancerígena comparte características en común con una célula madre, capacidad para auto-renovarse, expresión activa de la telomerasa, activación de vías anti-apoptóticas, incremento de transportadores activos en la membrana y la capacidad de migración [76](#). Además, presentan una alta demanda energética, que no solo es suplida por el metabolismo aerobio, sino por procesos anaeróbicos [61](#), por lo cual el establecimiento de una neoplasia a nivel celular no solo se ve afectada por los cambios genéticos y epigenéticos, sino también por el metabolismo celular [6](#), [61](#).

Con relación a los cambios en el metabolismo celular durante la progresión del cáncer, se debe tener en cuenta que el perfil metabólico del tumor es complejo y depende de muchas variables; por ello se han identificado seis categorías: consumo desregulado de aminoácidos y glucosa, adquisición de nutrientes por el medio que sea necesario, uso de intermediarios del ciclo de la glucólisis o el ciclo del ácido tricarbóxico para la biosíntesis y producción de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida), incremento en la demanda del nitrógeno, alteraciones en los genes reguladores de las rutas metabólicas y las interacciones metabólicas con el microambiente [5](#), [63](#), [75](#). El control en los puntos metabólicos puede ser considerado una diana para el tratamiento del cáncer [21](#), de allí la importancia de desarrollar nuevos medicamentos basados en compuestos naturales que intervengan en estos procesos [15](#).

Cáncer en perros

Los animales de compañía son parte fundamental en una sociedad, ya que mejoran las experiencias de vida en las personas y se convierten en un miembro más de la familia, por lo cual surge la preocupación por su estado de salud y calidad de vida, lo que se refleja en la investigación y mejoramiento en el tratamiento de sus enfermedades, como el cáncer, el cual se estima que aumenta su frecuencia a la edad de diez años [24](#), [41](#). En Estados Unidos se predicen cuatro millones de diagnósticos nuevos de cáncer para perros, en hembras los tipos más comunes son cáncer de mama, tejido conectivo, melanoma maligno y linfoma; y en machos cáncer de tejido conectivo, testicular, melanoma maligno, de boca y faringe [37](#), [38](#).

Entre los diferentes cánceres en caninos, el cáncer de piel ha sido reportado en diferentes estudios como uno de los más predominantes en perros. En una investigación realizada en Japón se encontró que los tumores de piel corresponden a un 30% de 3985 tumores caninos analizados, en Italia un 19% de 3303 tumores caninos y en Uruguay en un 17,8% de 1171 muestras analizadas [25](#), [41](#), [53](#), [59](#). En Colombia, un estudio de la Universidad de los Llanos ha reportado el cáncer de piel como el más predominante en caninos, en un 60,2% [2](#), entre ellos, el carcinoma escamoso celular (SCC) constituye la neoplasia más común, aproximadamente del 26-29% de los casos [2](#), [74](#); seguida por el mastocitoma en un 15 - 22%, el cual ha sido relacionado con razas específicas: Bóxer, Bulldog, Boston Terrier, Labrador, Cocker Spaniel, Sharpei, Golden Retriever y Schnauzer.

Un reporte del laboratorio de patología Animal de la Universidad de Antioquia ubicó al mastocitoma como la causa más común de cáncer en perros entre 1994 y el 2003 con un 22%, y menciona que los criollos fueron la quinta raza en presentar malignidad aunque no fue especificado qué tipos de cáncer padecieron [27](#), [28](#), [62](#). Sin embargo al ser de una raza con mayor predisposición a neoplasias, puede aumentar la probabilidad de hallar mastocitomas entre los diagnósticos.

Debido a que los perros presentan características del desarrollo biológico, presentación histológica del tumor, y respuesta al tratamiento convencional del cáncer comparables con humanos, se sugiere que deben existir mecanismos genéticos y moleculares similares [19](#), [38](#); incluso han sido propuestos para ser utilizados como modelo en el estudio de la enfermedad [38](#), por ejemplo, el cáncer de mama canino se ha propuesto como modelo para estudiar el carcinoma de seno en humanos debido a que comparten características histológicas y moleculares [10](#), [69](#). Por lo tanto, si entre humanos y caninos se comparten características similares en el desarrollo de la enfermedad, se esperaría que ambos respondan a los diferentes tratamientos;

por lo cual el desarrollo de medicamentos a partir de productos naturales puede ser beneficioso para ambas especies.

Acetogeninas

Los productos naturales han sido utilizados en la medicina desde tiempos remotos, y fue a través del ensayo y error que se conocieron algunas de sus propiedades [16, 22](#). Con las técnicas que se han desarrollado hoy en día, se han aislado diferentes alcaloides, como la morfina, la penicilina, ácido acetilsalicílico, digitoxina entre otros, útiles en aplicaciones clínicas [22](#); entre ellas tratamiento de infecciones, inflamación, cáncer, entre otros [8, 30, 71](#). Igualmente, de los nuevos medicamentos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) se estima que el 34% están basadas en productos naturales [17, 29](#).

Las acetogeninas (ACGs) son metabolitos secundarios provenientes de la familia de plantas tropicales Annonaceae, como *Annona muricata* (guanábana), *Annona cherimola* (chirimoya) entre otros [44](#), aunque también se han reportado acetogeninas en la familia Vitaceae (en plantas reportadas en Filipinas, *Ampelocissus sp.*) [65](#) y en la familia Lauraceae, específicamente en *Persea americana* (aguacate) [68](#). Las ACGs presentan una cadena larga de carbonos derivada de ácidos grasos, constituidos por 34/37 carbonos, con uno o varios anillos de tetrahidrofurano (THF), en algunos casos se han reportado anillos de tetrahidropirano (TDH), una butirolactona terminal, algunos sustituyentes oxigenados, epóxidos y dobles enlaces ([Figura 1](#)). Se ha propuesto una clasificación con base en estos motivos: acetogeninas tipo A con un solo anillo de THF (annonacina), el tipo B con dos anillos de THF adyacentes (asimicina, bulatacina), el tipo C con dos anillos no adyacentes (bulatanocina), el tipo D con tres anillos adyacentes (goniocina), y recientemente se ha sugerido el grupo E, con ausencia de anillos de THF presentando en su reemplazo dobles enlaces o grupos epóxidos, este grupo son precursores de las acetogeninas, como la coriadienina [4, 12](#).

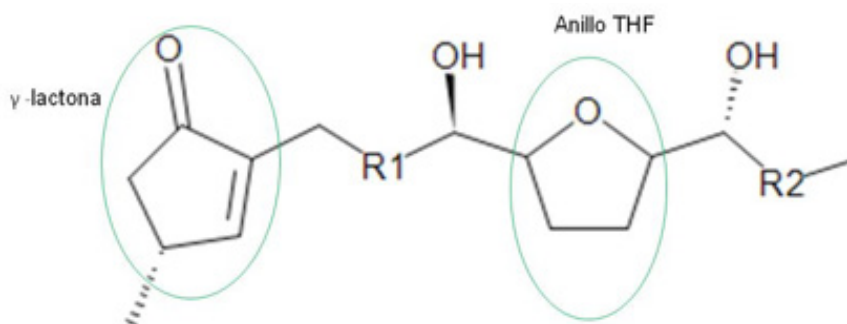


Figura 1. Estructura general de las acetogeninas. Se señala un anillo de THF y la γ -lactona, los R1 y R2 son radicales de carbonos. Modificada de Pub-chem [67](#).

Las ACGs se encuentran en semillas, tallo y hojas; se han obtenido más de 500 compuestos, y hasta la fecha se siguen reportando nuevos hallazgos, como la dieporeticenina B [40, 48, 52](#). Hay evidencias de su efecto pesticida, parasiticida, citotóxico, antitumoral, antimicrobiano, fungicida, acaricida y herbicida [7, 12](#).

En la búsqueda de plantas con efectos inhibitorios de tumores para 1982 se reportó la primera acetogenina aislada, la uvaricina de la planta *Uvaria holstii* o *Uvaria acuminata* reportada en Mozambique con actividad antitumoral en ratones con leucemia linfocítica inducida [34](#).

Las ACGs actúan a nivel del complejo de respiración mitocondrial I (NADH:ubiquinona oxidorreductasa), al intervenir en el paso terminal de la transferencia de electrones señalado en la Figura 2 [20](#), [47](#), [51](#), [78](#). Abe, *et al* (2008) proponen un modelo en el cual el anillo THF y el de γ -lactona se acoplan simultáneamente a dos sitios importantes de unión con una distancia inferior a 13 carbonos del complejo I de la cadena de respiración, en ND1 una de las siete subunidades del brazo de membrana del complejo I mitocondrial, evitando la continuación de la cascada de protones (Figura 3). Esto indica que la presencia de un anillo de THF sería suficiente para realizar el bloqueo en la respiración celular, y en caso de presentar dos anillos de THF funcionaría como espaciador para dar mayor estabilidad a la unión [1](#), [2](#).

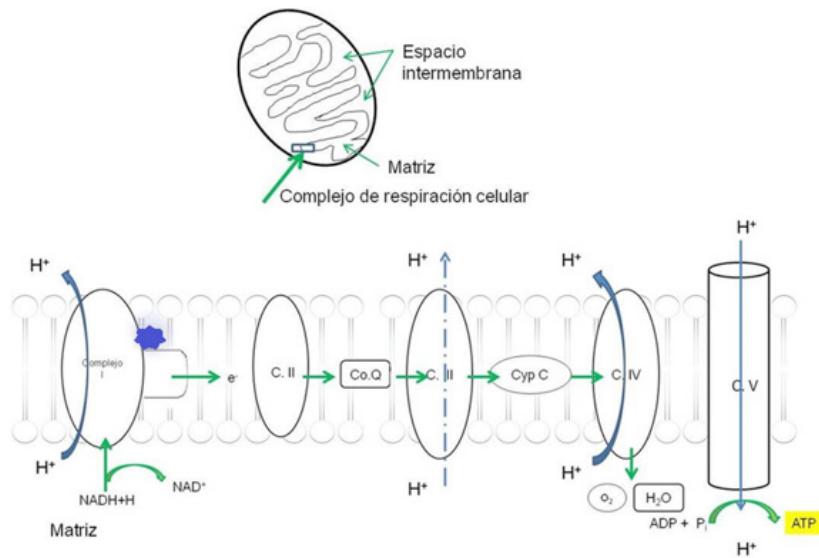


Figura 2. Representación general del lugar y proceso de la respiración celular en la mitocondria. La estrella indica el complejo que es afectado por las acetogeninas. Modificado de Mathews [51](#).

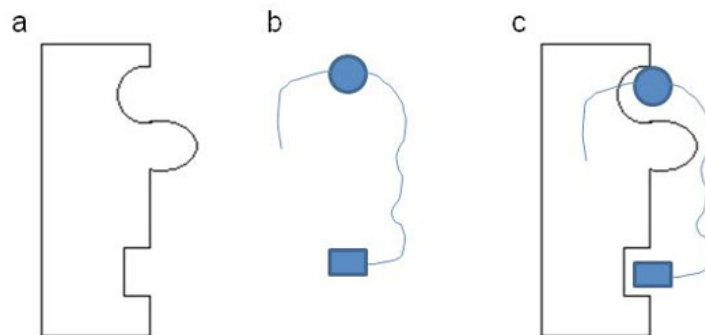


Figura 3. Representación del sitio de unión de las acetogeninas al complejo I. a. Subunidad ND1 del complejo I mitocondrial. b. Esquema de una ACGs mono-THF y c. Unión de la ACG a la subunidad. ● Representa el anillo de THF, el ■ representa la lactona. Figura adaptada de Abe, *et al* (2008) [1](#).

También se reportan otros mecanismos de citotoxicidad, al utilizar la acetogenina escuamocina (bis-THF) en la modulación de la fosforilación de histona 3 (H3) al desregular la expresión de la proteína aurora B y la proteína quinasa activada por mitógenos (pMSK1), que sobre-expresadas disminuyen la fosforilación en las posiciones

H3S10 y H3S28 H3; consecuente arresto del ciclo celular en G1 y activación de la apoptosis por vías intrínsecas (a través de mitocondria) y extrínsecas (ligandos de muerte celular) activando caspasas 8 y 9 ⁴⁵. Otra alternativa para activar la muerte celular ha sido demostrada al tratar una línea celular de cáncer de vejiga con la acetogenina annonacina, en la cual se encontró de forma significativa la expresión de Bax y Bad, genes pro-apoptóticos, igualmente se detectó activación de p21 en células con p53 mutado, que permitían un arresto en G1 ⁷⁷.

Igualmente se ha observado la formación de complejos de Ca^{2+} con ACGs de forma espontánea, lo cual desestabiliza la homeostasis del Ca^{2+} , aumentando el nivel de calcio en la mitocondria, desregulando el potencial de membrana, dañando la mitocondria y activando muerte celular ^{26, 46}.

Consecuente al daño de la mitocondria, se presenta liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales aumentan el mal plegamiento de proteínas por la formación de aductos "proteína-ROS", generando respuesta al estrés por el retículo endoplasmático que activa una vía de señalización única (UPR: *unfolded protein response*) que restablece el equilibrio y funcionamiento del mismo; sin embargo, si se presenta una considerable acumulación de proteínas mal plegadas se desencadenan mecanismos de apoptosis y muerte celular ^{36, 64}.

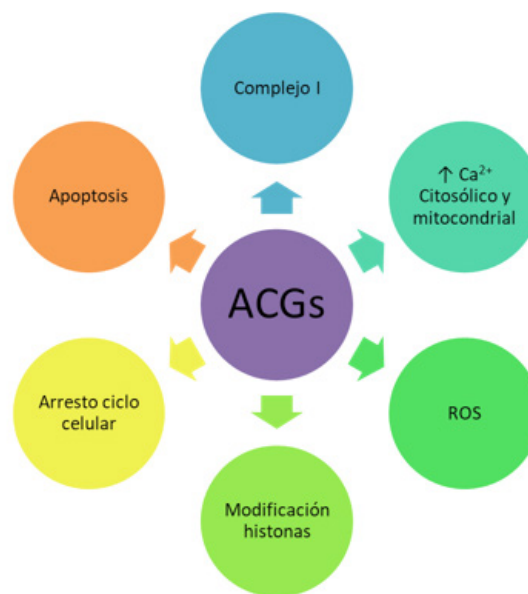


Figura 4. Blancos de acción de las acetogeninas. Entre los diferentes blancos del mecanismo de acción de las acetogeninas, se describe la modificación de histonas, producción de ROS, arresto del ciclo celular, aumento del calcio Citosólico y mitocondrial, modificación del complejo I en la respiración y apoptosis.

El consumo debe ser con precaución y en bajas dosis, ya que se ha reportado casos atípicos de Parkinson en Guadalupe (Filipinas) donde el factor de riesgo común es el consumo de anonáceas ^{11, 43}. Adicionalmente, se ha observado que la presencia de altas concentraciones de extractos de acetogeninas en la fruta Paw paw o banano de montaña son tóxicos para cultivos celulares de neuronas corticales y a su vez esta toxicidad puede ser dada por la presencia de múltiples ACGs, como la bulatacina principalmente ^{7, 66}.

Acetogeninas con potencial terapéutico contra el cáncer

Se estima que el 75% de los medicamentos usados contra el cáncer desarrollados entre 1981 a 2002 provienen de compuestos naturales [13.15](#). Entre ellos, las acetogeninas de las anonáceas constituyen una fuente de búsqueda importante, ya que se ha observado su bioactividad en líneas tumorales y modelos de ratones con tumores inducidos [31.72](#).

La primera acetogenina aislada, la uvaricina, fue caracterizada por sus propiedades antitumorales, *in vitro e in vivo*, se utilizó la línea celular de leucemia linfocítica (3PS) y se indujo cáncer en ratones, se observó una actividad citotóxica del 157% de las ACGs en una dosis de 1,4 mg/kg [12.34](#).

La comparación de la actividad antitumoral de varias acetogeninas *in vitro* (annonicina, montanacina, goniotalamicina y annonacina), evidenció mejor efecto con la annonacina en dos líneas celulares de leucemia murina y una de adenocarcinoma mamario humano, con dosis inhibitorias al 50% de $1,76 \times 10^{-6}$, $8,88 \times 10^{-4}$ y $8,35 \times 10^{-2}$ µg/mL respectivamente y se observó mayor actividad al ser comparada con el medicamento adriamicina [35](#). Desde 2,5 µg/plato de bulatacina en cultivos celulares ha sido inhibitoria para el crecimiento celular, tanto en células cancerígenas de ratón y humanos como en células no tumorales; si se disminuye la concentración buscando no afectar células normales a 0,25 µg/plato, el efecto es comparable con el correspondiente al utilizar el medicamento adriamicina y hay disminución de su acción en células normales [56](#). Esto indica que es factible encontrar dosis de acetogeninas que sean selectivamente inhibitorias.

En ratones con cáncer inducido al ser trasplantados con una línea celular de leucemia murina, se ha reportado la dosis de 0,05 mg/kg/día de bulatacina 400 - 600 veces más activa cuando se compara con el medicamento taxol [3](#). Igualmente, se ha logrado la disminución del tamaño en tumores inducidos en ratones en un 65,8% con una dosis de 15 µg/kg; además la supervivencia durante el tratamiento fue del 80%, iniciaron 10 ratones y terminaron 8 el tratamiento, contrario al utilizar la dosis de 60 µg/kg en la cual solo sobrevivieron el 42,9%, debido a los efectos adversos de las ACGs [14](#). Aunque en perros ha sido probada oralmente una forma de acetogeninas encapsuladas, de 50 a 800 mg fueron administrados cuatro veces al día, se destaca que eran perros sanos y no presentaban tumores, sin embargo, se debe notar la mayor cantidad de extracto suministraba en comparación a ratones, lo cual puede deberse a la diferencia de tamaño y por tanto a la variación en la capacidad metabólica entre los animales, además que los perros necesitan consumir en su dieta alimentos ricos con ácidos grasos por lo cual su organismo puede estar más adaptado al consumo de estos en comparación de ratas y ratones, que desarrollan más fácil obesidad [60](#).

Por otro lado, algunos estudios indican que el número de carbonos entre el anillo de THF y la γ-lactona son cruciales para aumentar la actividad biológica de las ACGs, por ejemplo la línea celular MCF-7/Adr (células de cáncer de mama resistente a la adriamicina) al ser tratada con ACGs con una longitud espaciadora mayor a 13 carbonos (como la bulatacina y la motrilina) presentaron mayor citotoxicidad contra la línea celular [55](#). Lo anterior indica que los efectos pueden ser muy variados de acuerdo con las características y concentraciones de las ACGs a utilizar, en las tablas 1 y 2 se resumen algunos estudios *in vitro e in vivo* en los cuales se evalúa toxicidad, activación de rutas celulares, ciclo celular, inhibición del crecimiento del tumor y aumento de la esperanza de vida.

Tabla 1. Algunos estudios realizados en líneas celulares con diferentes concentraciones de ACGs.

Acetogeninas	CI al 50%	Línea celular	Efectos	Referencia
Bulatacina Motrilina Escuamotacina	mg/mL 1,08x10 ⁻² 2,56x10 ⁻² 1,41x10 ⁻¹	MCF-7/Adr	Citotoxicidad aumentada en comparación con adriamicina, vinblastina y vincristina	Oberlies <i>et al.</i> 1997 ⁵⁵
Piranicina Piragonicina Goniotrionina	µg/mL 1,3 x10 ⁻³ 5,8 x10 ⁻² 5,3 x10 ⁻⁶	Varias líneas celulares humanas. PACA-2* Varias líneas celulares humanas. MCG-7*	Citotoxicidad selectiva contra línea celular pancreática (PACA-2) Mayor citotoxicidad contra línea celular de cáncer de mama (MCG-7)	Alali, <i>et al.</i> 1998 ⁴
Annonacina (THF: 1)	0,1 µM	MCF-7	Arresto de ciclo celular en la fase G0/G1 e incrementó la apoptosis a las 48 h. Disminución fosforilación de ERK1/2, JNK y STAT3.	Ko, <i>et al.</i> 2011 ³⁹
Scuamocina M (THF: 2 anillos no adyacentes)	4,2 nM	Jurkat	Se analizaron diferentes líneas celulares con diferentes ACGs, (1 o más anillos), todas presentan un efecto antiproliferativo, inducen arresto en el ciclo celular en G2/M, acumulación de Ca ²⁺ en mitocondria y apoptosis.	Juang, <i>et al.</i> 2016 ³⁶
Scuamostatina A (THF: 2 adyacentes)	4,6 nM	HONE R-MTX (resistentes a medicamentos)		
Corrosolona (1 anillo THF)	0,3 nM	Jurkat		
Escuamocina P (2 THF adyacentes)	µM 0,435 3,34 6,32	SMMC 7721/T MCF-7/Adr A549/T	Se analizaron diferentes ACGs y líneas celulares, se observa actividad citotóxica más potente que al comparar con la cisplatina.	Ma <i>et al.</i> 2017 ⁴⁸

MCF-7/Adr: Células de cáncer mamario resistente a adriamicina, PACA-2: línea celular de carcinoma pancreático, MCG-7: cáncer de mamá, HONE R-MTX: línea celular de carcinoma nasofaríngeo resistente a metotrexato, Jurkat: leucemia aguda de células T, SMMC 7722/T: células de hepatocarcinoma humano, A549/T: línea celular de carcinoma de pulmón.

Tabla 2. Algunos estudios realizados en modelos in vivo con diferentes concentraciones de ACGs

Acetogeninas	Concentración	Modelo	Tratamiento	Efectos	Referencia
Bulatacina Bulatacinona	50 µg/kg 400 µg/kg	Modelo murino con tumor inducido	Inyecciones diarias por 9 días	Aumentaba expectativa de vida del ratón en un 38% y 44% respectivamente	Ahammansa, 1993 ³
Extracto de ACGs	50 a 800 mg	Modelo canino, Beagle	Aumento gradual. Extracto encapsulado de forma oral cuatro veces al día.	Aumento gradual de emesis y heces blandas a medida que aumentaban las dosis; no hubo efectos sobre el estado de alerta, el apetito o el peso	D'Ver, 2001 ¹⁸
Annonacina	50 mg/kg	Modelo murino con tumor inducido	Inyección intraperitoneal por 22 días.	Disminuyó el tamaño del tumor entre los 7 a 22 días y la expresión ERα, ciclina D1 y Bcl-2 en el tumor.	Ko, <i>et al.</i> 2011 ³⁹
Bulatacina	15 µg/kg	Modelo murino con tumor inducido		Inhibición tumor del 63,4%	Chent, <i>et al.</i> 2012 ¹⁴
Scuamostatina A	0,5 y 1 mg/kg	Modelo murino BALB/c sin y con cáncer inducido.	Inyección intraperitoneal	Para ambos tratamientos se detectan concentraciones superiores en sangre comparadas a ensayos in vitro (no se reportan efectos adversos al comparar con los tratamientos estándar). La ACGs retarda el crecimiento del tumor 5 semanas después de iniciado el tratamiento comparado con el tratamiento convencional.	Juang, <i>et al.</i> 2016 ³⁶

Conclusiones

El cáncer continúa siendo una enfermedad de salud pública, tanto en humanos como animales, por lo cual la búsqueda de tratamientos alternativos con base científica comprobada y menos efectos secundarios, constituye una necesidad actual.

Entre los diferentes productos naturales, las acetogeninas comprenden una fuente potencial para el desarrollo de medicamentos contra el cáncer; además, deberá ser necesaria la evaluación de efectos tóxicos en otros órganos, por ejemplo toxicidad hepática o nefrotoxicidad, para garantizar dosis efectivas contra células tumorales, que no afecten células normales.

Debido a la mejora en el cuidado de animales de compañía, se pueden considerar las ACGs como sustitutos o terapia complementaria de los medicamentos que hoy en día se utilizan en ellos, sobre todo para ciertos tipos de tumores.

Teniendo en cuenta que existen características en el desarrollo de la enfermedad compartidas entre perros y humanos, es posible predecir que si funciona un medicamento en uno de ellos, puede servir para el otro y desde ese punto de vista concebir el canino como un modelo de experimentación que aporte a la medicina humana.

Agradecimientos

A Colciencias por el apoyo al desarrollo del Programa Nacional de Biotecnología "Programa nacional para la investigación y desarrollo de productos veterinarios, nanotecnología farmacéutica: una estrategia de innovación", y a la vicerrectoría de Investigación de la Corporación Universitaria Lasallista.

Referencias

1. Abe M, Kubo A, Yamamoto S, Hatoh Y, Murai M, et al. Dynamic function of the spacer region of acetogenins in the inhibition of bovine mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochemistry (Mosc)*. 2008;47(23):6260-6266. doi:10.1021/bi800506s.
2. Abe M, Murai M, Ichimaru N, Kenmochi A, Yoshida T, et al. Dynamic function of the alkyl spacer of acetogenins in their inhibitory action with mitochondrial complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase). *Biochemistry (Mosc)*. 2005;44(45):14898-14906. doi:10.1021/bi051568t.
3. Ahammadsahib KI, Hollingworth RM, McGovren JP, Hui YH, McLaughlin JL. Mode of action of bullatacin: a potent antitumor and pesticidal annonaceous acetogenin. *Life Sci*. 1993;53(14):1113-1120.
4. Alali FQ, Liu XX, McLaughlin JL. Annonaceous acetogenins: recent progress. *J Nat Prod*. 1999;62(3):504-540. doi:10.1021/np980406d.
5. Amoedo ND, Obre E, Rossignol R. Drug discovery strategies in the field of tumor energy metabolism: Limitations by metabolic flexibility and metabolic resistance to chemotherapy. *Biochim Biophys Acta*. 2017. doi:10.1016/j.bbabi.2017.02.005.
6. Bakhom SF, Landau DA. Chromosomal Instability as a Driver of Tumor Heterogeneity and Evolution. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017. doi:10.1101/cshperspect.a029611.

7. Bermejo A, Figadere B, Zafra-Polo M-C, Barrachina I, Estornell E, et al. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat Prod Rep*. 2005;22(2):269-303. doi:10.1039/b500186m.
8. *Bioactive Compounds from Natural Sources: Isolation, Characterization and Biological Properties*. 1st ed. (Tringali C, ed.). London: CRC Press; 2001.
9. Bravo T D, Cruz-Casallas P, Ochoa A J. Prevalence of neoplasm in canines in the university of the Llanos, during 2004 to 2007. *Rev MVZ Córdoba*. 2010;15(1):1925-1937.
10. Caceres S, Peña L, Lacerda L, Illera MJ, de Andres PJ, et al. Canine cell line, IPC-366, as a good model for the study of inflammatory breast cancer. *Vet Comp Oncol*. 2017;15(3):980-995. doi:10.1111/vco.12238.
11. Caparros-Lefebvre D, Elbaz A. Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study. *The Lancet*. 1999;354(9175):281-286. doi:10.1016/S0140-6736(98)10166-6.
12. Cavé A, Figadère B, Laurens A, Cortés D. Acetogenins from Annonaceae. In: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Vol 70. 1st ed. India: Springer-Verlag Wien; 1997:81-288.
13. Cendales M, Ricardo D, Suárez C, Enrique L. Cytotoxic compounds from plant sources and their relationship with inhibitor of apoptosis proteins. *Rev Colomb Cancerol*. 2016;20(3):124-134. doi:10.1016/j.rccan.2015.10.002.
14. Chen Y, Chen J, Xu S, Wang Y, Li X, et al. Antitumor activity of annonaceous acetogenins in HepS and S180 xenografts bearing mice. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012;22(8):2717-2719. doi:10.1016/j.bmcl.2012.02.109.
15. Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. *Chem Rev*. 2009;109(7):3012-3043. doi:10.1021/cr900019j.
16. Cragg GM, Newman DJ. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure Appl Chem*. 2005;77(1):7-24. doi:10.1351/pac200577010007.
17. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. 2013;1830(6):3670-3695. doi:10.1016/j.bbagen.2013.02.008.
18. D`Ver A. *Report: Ascending Oral Dosing of Paw Paw Extract in Male Beagle Dogs; WEL Study No. 01-090*. Doylestown; 2001.
19. Davis BW, Ostrander EA. Domestic Dogs and Cancer Research: A Breed-Based Genomics Approach. *ILAR J*. 2014;55(1):59-68. doi:10.1093/ilar/ilu017.
20. Degli Esposti M, Ghelli A, Ratta M, Cortes D, Estornell E. Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). *Biochem J*. 1994;301 (Pt 1):161-167.

21. Deshmukh A, Deshpande K, Arfuso F, Newsholme P, Dharmarajan A. Cancer stem cell metabolism: a potential target for cancer therapy. *Mol Cancer*. 2016;15(1):69. doi:10.1186/s12943-016-0555-x.
22. Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. 2012;2(2):303-336. doi:10.3390/metabo2020303.
23. Ding Z-Y, Zou X-L, Wei Y-Q. Cancer Microenvironment and Cancer Vaccine. *Cancer Microenviron*. 2012;5(3):333-344. doi:10.1007/s12307-012-0107-x.
24. Egenvall A, Bonnett B, Hedhammar Å, Olson P. Mortality in over 350,000 Insured Swedish Dogs from 1995–2000: II. Breed-Specific Age and Survival Patterns and Relative Risk for Causes of Death. *Acta Vet Scand*. 2005;46:121. doi:10.1186/1751-0147-46-121.
25. Elgue V, Piaggio J, Amaral C, Pessina P. Factores asociados a la presentación del tipo de cáncer en caninos atendidos en el Hospital de la Facultad de Veterinaria de Uruguay. *Vet Montev*. 2012;48(187):25-30.
26. Ermak G, Davies KJA. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol*. 2002;38(10):713-721.
27. Ferreira de la Cuesta G, Pedraza F. *Patología Veterinaria*. I. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia; 2003.
28. Garzón-Alzate A, Aranzazu-Taborda D, Rodríguez B, Álvarez-Yépez G. Caracterización de los tumores cutáneos caninos diagnosticados en el laboratorio de patología animal de la Universidad de Antioquia entre 1994 - 2003. *Rev Col Cienc Pec*. 2005;18(4):386.
29. Harvey AL, Edrada-Ebel R, Quinn RJ. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(2):111-129. doi:10.1038/nrd4510.
30. Hasanpourghadi M, Pandurangan AK, Mustafa MR. Modulation of oncogenic transcription factors by bioactive natural products in breast cancer. *Pharmacol Res*. 2017. doi:10.1016/j.phrs.2017.09.009.
31. Hong J, Li Y, Xiao Y, Li Y, Guo Y, et al. Annonaceous acetogenins (ACGs) nanosuspensions based on a self-assembly stabilizer and the significantly improved anti-tumor efficacy. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016;145:319-327. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.05.012.
32. Hurst DR, Welch DR. Metastasis Suppressor Genes: At the Interface Between the Environment and Tumor Cell Growth. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2011;286:107-180. doi:10.1016/B978-0-12-385859-7.00003-3.
33. IARC. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Published 2017. Accessed February 22, 2017.

34. Jolad S, Hoffman J, Schram K, Cole, Tempesta MS, et al. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). *J Org Chem*. 1982;47(16):3151-3153. doi:10.1021/jo00137a024.
35. Jossan A, Dubaele B, Cavé A. Deux nouvelles acetogenines monotetrahydrofuranniques cytotoxiques: L'annonomicine et la montanacine. *Tetrahedron Lett*. 1990;31(13):1-4. doi:10.1016/S0040-4039(00)98805-1.
36. Juang S-H, Chiang C-Y, Liang F-P, Chan H-H, Yang J-S, et al. Mechanistic Study of Tetrahydrofuran- acetogenins In Triggering Endoplasmic Reticulum Stress Response-apoptosis in Human Nasopharyngeal Carcinoma. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/srep39251.
37. Kelsey JL, Moore AS, Glickman LT. Epidemiologic studies of risk factors for cancer in pet dogs. *Epidemiol Rev*. 1998;20(2):204-217.
38. Khanna C, Lindblad-Toh K, Vail D, London C, Bergman P, et al. The dog as a cancer model. *Nat Biotechnol*. 2006;24(9):1065-1066. doi:10.1038/nbt0906-1065b.
39. Ko Y-M, Wu T-Y, Wu Y-C, Chang F-R, Guh J-Y, et al. Annonacin induces cell cycle-dependent growth arrest and apoptosis in estrogen receptor- α -related pathways in MCF-7 cells. *J Ethnopharmacol*. 2011;137(3):1283-1290. doi:10.1016/j.jep.2011.07.056.
40. Kojima N, Tanaka T. Medicinal chemistry of Annonaceous acetogenins: design, synthesis, and biological evaluation of novel analogues. *Mol Basel Switz*. 2009;14(9):3621-3661. doi:10.3390/molecules14093621.
41. Komazawa S, Sakai H, Itoh Y, Kawabe M, Murakami M, et al. Canine tumor development and crude incidence of tumors by breed based on domestic dogs in Gifu prefecture. *J Vet Med Sci*. 2016;78(8):1269-1275. doi:10.1292/jvms.15-0584.
42. Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci*. 2000;11(4):265-283.
43. Lannuzel A, Höglinger GU, Champy P, Michel PP, Hirsch EC, et al. Is atypical parkinsonism in the Caribbean caused by the consumption of Annonaceae? *J Neural Transm Suppl*. 2006;(70):153-157.
44. Leboeuf M, Cavé A, Bhaumik PK, Mukherjee B, Mukherjee R. The phytochemistry of the annonaceae. *Phytochemistry*. 1982;21(12):2783-2813. doi:10.1016/0031-9422(80)85046-1.
45. Lee C-C, Lin Y-H, Chang W-H, Lin P-C, Wu Y-C, et al. Squamocin modulates histone H3 phosphorylation levels and induces G1 phase arrest and apoptosis in cancer cells. *BMC Cancer*. 2011;11:58. doi:10.1186/1471-2407-11-58.
46. Liaw C-C, Liao W-Y, Chen C-S, Jao S-C, Wu Y-C, et al. The calcium-chelating capability of tetrahydrofuranic moieties modulates the cytotoxicity of annonaceous acetogenins. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011;50(34):7885-7891. doi:10.1002/anie.201100717.

47. Liaw C-C, Wu T-Y, Chang F-R, Wu Y-C. Historic perspectives on Annonaceous acetogenins from the chemical bench to preclinical trials. *Planta Med.* 2010;76(13):1390-1404. doi:10.1055/s-0030-1250006.
48. Ma C, Wang Q, Shi Y, Li Y, Wang X, et al. Three new antitumor annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. *Nat Prod Res.* 2017;1-6. doi:10.1080/14786419.2016.1274897.
49. Magadi VP, Ravi V, Arpitha A, Litha null, Kumaraswamy K, et al. Evaluation of cytotoxicity of aqueous extract of *Graviola* leaves on squamous cell carcinoma cell-25 cell lines by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay and determination of percentage of cell inhibition at G2M phase of cell cycle by flow cytometry: An in vitro study. *Contemp Clin Dent.* 2015;6(4):529-533. doi:10.4103/0976-237X.169863.
50. Maplestone RA, Stone MJ, Williams DH. The evolutionary role of secondary metabolites--a review. *Gene.* 1992;115(1-2):151-157.
51. Mathews C, van Holde K, Ahern K. *Biochemistry*. 3rd ed. <https://www.pearson-highered.com/program/Mathews-Biochemistry-4th-Edition/PGM39253.html>. Accessed April 24, 2017.
52. McLaughlin JL. Paw paw and cancer: annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. *J Nat Prod.* 2008;71(7):1311-1321. doi:10.1021/np800191t.
53. Merlo DF, Rossi L, Pellegrino C, Ceppi M, Cardellino U, et al. Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *J Vet Intern Med.* 2008;22(4):976-984. doi:10.1111/j.1939-1676.2008.0133.x.
54. Ministerio de Agricultura. Agronet. Estadísticas Guanábana. <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>. Published 2016. Accessed January 2, 2017.
55. Oberlies NH, Chang CJ, McLaughlin JL. Structure-activity relationships of diverse Annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF-7/Adr) cells. *J Med Chem.* 1997;40(13):2102-2106. doi:10.1021/jm9700169.
56. Oberlies NH, Jones JL, Corbett TH, Fotopoulos SS, McLaughlin JL. Tumor cell growth inhibition by several Annonaceous acetogenins in an in vitro disk diffusion assay. *Cancer Lett.* 1995;96(1):55-62.
57. Oeffinger KC, Baxi SS, Friedman DN, Moskowitz CS. Solid Tumor Second Primary Neoplasms: Who is at Risk, What Can We Do? *Semin Oncol.* 2013;40(6):676-689. doi:10.1053/j.seminoncol.2013.09.012.
58. OMS. Temas de salud: Cáncer. WHO. <http://www.who.int/topics/cancer/es/>. Accessed February 23, 2017.
59. Ortiz CEA, López JHF. Estudio retrospectivo de masas cutáneas neoplásicas en caninos diagnosticadas histopatológicamente en la Universidad de La Salle (1999-2003). *Rev Med Vet.* 2008;(16):111-120.

60. Osorio J, Suárez J, Uribe-Velásquez L. Metabolismo de los lípidos en caninos en el contexto de salud-enfermedad. 2010;4(1):83-97.
61. Pacini N, Borziani F. Cancer Stem Cell Theory and the Warburg Effect, Two Sides of the Same Coin? *Int J Mol Sci*. 2014;15(5):8893-8930. doi:10.3390/ijms15058893.
62. Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol*. 1984;21(5):469-474.
63. Pavlova NN, Thompson CB. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab*. 2016;23(1):27-47. doi:10.1016/j.cmet.2015.12.006.
64. Pelicano H, Feng L, Zhou Y, Carew JS, Hileman EO, et al. Inhibition of Mitochondrial Respiration. A novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *J Biol Chem*. 2003;278(39):37832-37839. doi:10.1074/jbc.M301546200.
65. Pettit GR, Mukku VJRV, Cragg G, Herald DL, Knight JC, et al. Antineoplastic agents. 558. Ampelocissus sp. cancer cell growth inhibitory constituents. *J Nat Prod*. 2008;71(1):130-133. doi:10.1021/np068050q.
66. Potts LF, Luzzio FA, Smith SC, Hetman M, Champy P, et al. Annonacin in *Asimina triloba* fruit: Implication for neurotoxicity. *NeuroToxicology*. 2012;33(1):53-58. doi:10.1016/j.neuro.2011.10.009.
67. Pubchem. NSC695405: Acetogenins. Published 2005. Accessed March 31, 2017. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/393472>.
68. Rodríguez-Sánchez D, Silva-Platas C, Rojo RP, García N, Cisneros-Zevallos L, et al. Activity-guided identification of acetogenins as novel lipophilic antioxidants present in avocado pulp (*Persea americana*). *J Chromatogr B*. 2013;942:37-45. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.10.013.
69. Saad ES, Milley KM, Al-Khan AA, Nimmo JS, Bacci B, et al. Canine Mixed Mammary Tumour as a Model for Human Breast Cancer with Osseous Metaplasia. *J Comp Pathol*. 2017;156(4):352-365. doi:10.1016/j.jcpha.2017.03.005.
70. Shaitelman SF, Chiang Y-J, Griffin KD, DeSnyder SM, Smith BD, et al. Radiation therapy targets and the risk of breast cancer-related lymphedema: a systematic review and network meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;162(2):201-215. doi:10.1007/s10549-016-4089-0.
71. de Sousa OV, Vieira GD-V, de Jesus R G de Pinho J, Yamamoto CH, Alves MS. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of *Annona muricata* L. leaves in animal models. *Int J Mol Sci*. 2010;11(5):2067-2078. doi:10.3390/ijms11052067.
72. Sun S, Liu J, Kadouh H, Sun X, Zhou K. Three new anti-proliferative Annonaceous acetogenins with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona muricata*). *Bioorg Med Chem Lett*. 2014;24(12):2773-2776. doi:10.1016/j.bmcl.2014.03.099.

73. Tan J, Yang S, Shen P, Sun H, Xiao J, et al. C-kit signaling promotes proliferation and invasion of colorectal mucinous adenocarcinoma in a murine model. *Oncotarget*. 2015;6(29):27037-27048.
74. Torres-Vidales G. Estudio histológico retrospectivo de tumores en caninos diagnosticados en el laboratorio de patología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia. 2003.
75. Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol*. 1927;8(6):519-530.
76. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res*. 2006;66(4):1883-1890; discussion 1895-1896. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3153.
77. Yuan S-SF, Chang H-L, Chen H-W, Yeh Y-T, Kao Y-H, et al. 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*. 2003;72(25):2853-2861. doi:10.1016/S0024-3205(03)00190-5.
78. Zafra-Polo MC, González MC, Estornell E, Sahpaz S, Cortes D. Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. *Phytochemistry*. 1996;42(2):253-271.