



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL EXTRACTO
METANÓLICO DE *ANNONA MACROPHYLLATA* EN CÁNCER
COLORRECTAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. PÉREZ ARTEAGA EDUARDO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN.
COMITÉ TUTOR: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.
DR. ADOLFO ANDRADE CETTO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL EXTRACTO
METANÓLICO DE *ANNONA MACROPHYLLATA* EN CÁNCER
COLORRECTAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. PÉREZ ARTEAGA EDUARDO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN.
COMITÉ TUTOR: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.
DR. ADOLFO ANDRADE CETTO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2023

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/064/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **14 de noviembre de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **PÉREZ ARTEAGA EDUARDO** con número de cuenta **312241809** con la tesis titulada "**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Annona macrophyllata* EN CÁNCER COLORRECTAL**", realizada bajo la dirección de la **DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Vocal: DR. CARLOS GUADALUPE PÉREZ PLASENCIA
Vocal: DRA. SONIA MARLEN ESCANDÓN RIVERA
Vocal: DR. OCTAVIO DANIEL REYES HERNÁNDEZ
Secretario: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 12 de enero de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos Institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México

Al apoyo recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), mediante la beca de maestría otorgado (Número de apoyo: 1085312), y por el proyecto no. CB-2016-285884.

A mi tutora, la Dra. Nadia Judith Jacobo Herrera y a los miembros del comité tutor, el Dr. Mariano Martínez Vázquez y el Dr. Adolfo Andrade Cetto.

Agradecimientos

Esta es la conclusión de un ciclo, uno que emprendí hace un par de años con nula idea de todo lo nuevo que estará por llegar, fui bastante ingenuo al pensar que sería sencillo, hacer un cambio de enfoque con respecto a lo que me había estado dedicando con en mi carrera académica, pero, no me arrepiento, he crecido como persona y ahora estoy encaminado en una senda que me apasiona. Ha sido una etapa de un mundo de aprendizaje, en diferentes aspectos de mi vida, no solo la académica, viví situaciones que nunca pensé que tendría que atravesar, sin embargo, aquí estoy, y gran parte de este logro es gracias al conjunto de increíbles personas cercanas a mí a las que tengo el privilegio de llamar familia y amigos.

Agradezco a mis padres, eternamente, todo el apoyo, sacrificio y cariño que me han brindado me hicieron de las herramientas para poder seguir avanzando, para superar cualquier obstáculo, para no darme por vencido. Hermano, verte crecer y superarte a ti mismo me da motivación para todo, gracias, por tanto, estoy muy orgulloso de ti. Son mi motor, siempre lo diré, cualquier logro mío, es suyo también. Los amo

Doctora Nadia, gracias por haberme acogido y guiarme a lo largo de este proceso, valoro mucho el apoyo que me ha dado, no solamente a nivel académico, sino también por las palabras de aliento cuando lo necesitaba, por aconsejarme y no dejarme caer. Lo que soy hoy, es también gracias a usted. La quiero mucho.

A Michael, por su amistad y apoyo incluso antes de entrar a la maestría, gracias por haberme enseñado, por aconsejarme, por el cariño, por siempre haber estado ahí cuando lo necesité, te quiero mucho amigo, eres importante para mí, espero sigamos coincidiendo por mucho tiempo más.

A Izamary, mi mentora, por la dedicación que has tenido conmigo, por la paciencia, por transmitirme tanto conocimiento, muchas gracias. El hecho de que hoy cuente con las herramientas necesarias para potencialmente triunfar en este camino de la

ciencia es en gran parte gracias a ti, sé que no ha sido sencillo, y que nos costó, pero nunca te rendiste ni me abandonaste, y, a pesar de las diferencias y los malentendidos, logramos formar un gran equipo, y una amistad que valoro mucho, te quiero iza.

Joss, Oli, Carlos, Sam, Lili, Bere, Frida, Miguel, David, Eloy, gracias por haber hecho del L-11 un segundo hogar, uno en donde el simple hecho de convivir con ustedes significaba aprender, y a la par no dejar de reír, son maravillosas personas, crecer con ustedes estos años ha sido increíble, son un apapacho al corazón, gracias por todo.

A Juan Pablo, por siempre estar, por escuchar, por alentar, por consolar, por 14 años de amistad. Te admiro, y me enorgullece poder decir que eres mi mejor amigo. Sigamos creciendo, sigamos consiguiendo logros, y espero los podamos seguir compartiendo por muchos años más.

A Dany, porque definitivamente, eres parte de este logro, y gran parte de lo que soy hoy, es por lo mucho que aprendimos y crecimos juntos. Ese apoyo incondicional que me diste me dio mucha fuerza y motivación para poder continuar y levantarme cuando lo necesitaba. Te agradezco infinitamente, siempre serás parte de mi historia.

Al Dr. Carlos Pérez Placencia por permitirme realizar ensayos in vitro del proyecto en el laboratorio de genómica funcional del cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología, así como su apoyo y guía dentro del laboratorio.

A la Dra. Sonia Marlen Escandón Rivera, por su apoyo en la realización del proyecto en el apartado fitoquímico.

Dedicatoria

*A mis padres, **L**aura y **F**ernando y a mi hermano Alejandro, por ser la motivación de mi día a día, la razón por la que soy quien soy.*

"No podemos elegir los tiempos que nos toca vivir, lo único que podemos hacer es decidir qué hacer con el tiempo que se nos ha dado." – J.R.R. Tolkien.

“En algún lugar, algo increíble está esperando a ser descubierto.” – Carl Sagan

Índice

Índice de figuras

Índice de cuadros

Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción	4
1.1 Cáncer.....	4
1.2 Cáncer Colorrectal (CCR).....	6
1.3 Productos Naturales.	12
1.4 <i>Annona macrophyllata</i>	13
1.5 Acetogeninas.....	14
1.6 Autofagia	18
1.7 Antecedentes	22
2. Justificación	23
3 Hipótesis.....	24
4 Objetivos.....	25
4.1 Objetivo General.....	25
4.2 Objetivos particulares	25
5. Metodología.....	26
5.1 Colecta de <i>A. macrophyllata</i> y obtención de extracto.	26
5.2 Cromatografía en placa fina	26
5.3 Cultivo Celular	27
5.4 Concentración inhibitoria media (IC50).....	27
5.5 Extracción de proteínas	28
5.6 Western Blot.....	29

5.7	Modelo In vivo	30
6.	Resultados.....	34
6.2	Concentración inhibitoria 50 (IC50) del extracto sobre una línea celular de CCR HCT116	35
6.3	El extracto metanólico induce autofagia sobre la línea celular HCT116 <i>in vitro</i>	36
6.4	El extracto reduce el crecimiento de tumores <i>in vivo</i>	38
7.	Discusión.....	42
8.	Conclusiones	49
9.	Referencias bibliográficas.....	50

Índice de Figuras

Figura 1 "Hallmarks del cáncer".....	4
Figura 2 Tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad.....	5
Figura 3 Tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad de ambos sexos en México.....	5
Figura 4 Función de APC dentro la vía WNT/ β -catenina/Tcf.....	9
Figura 5 Fruto y árbol de <i>A. macrophyllata</i>	13
Figura 6 Estructura general de Acetogeninas Mono THF.....	15
Figura 7 Estructura general de Acetogeninas Bis-THF adyacentes.....	15
Figura 8 Estructura general de Acetogeninas Bis-THF no Adyacentes.....	15
Figura 9 Representación de la cadena de respiración mitocondrial y el complejo NADH ubiquinona oxidorreductasa afectada por la interacción de las acetogeninas.	17
Figura 10 Proceso de regulación de autofagia.....	19
Figura 11 Inoculación de células HCT116 para el modelo in vivo de xenotrasplante y medición del crecimiento de la masa tumoral con vernier digital.....	33
Figura 12 CCF de E.M.A con annonacina.....	34
Figura 13 Concentración inhibitoria media del E.M.A sobre línea celular HCT116.....	35
Figura 14 Detección de las proteínas en la línea celular HCT116 involucradas en la vía molecular de autofagia mediante Western Blot.....	36
Figura 15 Densitometría relativa de la detección de proteínas seleccionadas de la vía de señalización de autofagia en la línea celular HCT116 expuestas al E.M.A.	37
Figura 16 Dosis letal Media (DL50) del E.M.A sobre los ratones <i>Fox1^{nu}/Fox1^{nu}</i>	38
Figura 17 Volumen del crecimiento tumoral en el modelo de xenotrasplante de la línea celular HCT116.....	39
Figura 18 Volumen total y peso total final de las masas tumorales extirpadas de los ratones al finalizar el tratamiento.....	40
Figura 19 Imágenes representativas de los grupos experimentales de ratones del ensayo de xenotrasplante.....	41

Índice de Cuadros

<i>Tabla 1 Etapas clínicas del CCR (Colorectal cancer alliance, 2022).....</i>	<i>11</i>
<i>Tabla 2 Combinaciones de fármacos quimioterapéuticos para el tratamiento de CCR.....</i>	<i>11</i>
<i>Tabla 4 Listado de anticuerpos utilizados para Western Blot para la detección de proteínas involucradas en la vía de señalización de autofagia</i>	<i>30</i>
<i>Tabla 5 Tratamientos empleados para el modelo in vivo de xenotrasplante. Las dosis fueron seleccionadas con base en el ensayo de dosis letal media (DL50).....</i>	<i>32</i>

Resumen

El cáncer colorrectal es el tercer tipo de cáncer con mayor incidencia y el segundo en mortalidad a nivel mundial para ambos sexos, con aproximadamente 883.200 muertes al año. El tratamiento de este tipo de cáncer depende del estadio, con cirugía en los primeros estadios, y quimioterapia y/o radioterapia en los estadios avanzados. Sin embargo, las recidivas son frecuentes y la tasa de supervivencia a los 5 años se sitúa entre el 50% y el 60%. Por lo tanto, la búsqueda de terapias nuevas y eficaces son primordiales.

Los llamados productos naturales son el resultado del metabolismo secundario de diferentes organismos, que tienen múltiples usos en farmacología, cosmetología y nutrición, entre otros. Especialmente en oncología, los informes destacan que aproximadamente el 60% de los compuestos utilizados para tratar el cáncer provienen de productos naturales.

Las anonáceas son una familia de plantas comúnmente conocidas como la familia de la guanábana, utilizadas en la medicina popular para tratar diversas enfermedades, entre ellas el cáncer. En informes anteriores se estudiaron sus propiedades anticancerígenas, demostrando su citotoxicidad contra diferentes líneas celulares tumorales. Esta actividad se ha atribuido a las acetogeninas, metabolitos secundarios producidos exclusivamente por las especies de Annonaceae. Las acetogeninas pueden bloquear la cadena de transporte de electrones, reduciendo así la producción de ATP e induciendo la muerte celular por apoptosis y autofagia. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen a este efecto aún no se han definido.

En este proyecto evaluamos la actividad citotóxica del extracto metanólico de *A. macrophyllata* en células de cáncer de colon (HCT116) y su actividad antitumoral en un modelo murino. Nuestros resultados obtenidos por medio de un ensayo de Sulforodamina B, indican que el extracto metanólico inhibe la proliferación celular in vitro e induce la autofagia mediante la hiperlipidación de LC3 en las células HCT116.

Además, reduce el crecimiento tumoral en un modelo murino de xenotrasplante. No se observaron señales tóxicas macroscópicas en comparación con los tratados con cisplatino (el fármaco de referencia utilizado). En resumen, se propone un nuevo mecanismo de acción antitumoral para el extracto metanólico de *A. macrophyllata* a través de la inducción de autofagia y su acción de reducción tumoral en ratones xenotrasplantados con células tumorales de colon.

Abstract

Colorectal cancer is the third most common type of cancer and the second in mortality worldwide in both sexes, with approximately 883,200 deaths annually. Treatment of this type of cancer depends on the stage with surgery in the early stages, and chemotherapy and/or radiotherapy in the advanced stages. However, recurrences are frequent, and the 5-year survival rate is between 50% and 60%. The search for new and more effective therapies is therefore of considerable importance.

Natural products are the result of the secondary metabolism of different organisms, which have multiple uses in pharmacology, cosmetology and nutrition, among others. Especially in oncology, reports highlight that approximately 60% of the compounds used to treat cancer come from natural products.

Annonaceae is a family of plants commonly known as the soursop family, used in traditional medicine to treat various diseases, including cancer. Previous reports have studied their anticancer properties, demonstrating their cytotoxicity against different tumor cell lines. This activity has been attributed to acetogenins, secondary metabolites produced mainly by Annonaceae species. Acetogenins can block the electron transport chain, thus reducing ATP production and inducing cell death by apoptosis and autophagy. However, the molecular mechanisms underlying this effect have not yet been defined.

In this project, we evaluated the cytotoxic activity of the methanolic extract of *A. macrophyllata* on colon cancer cells (HCT116) and its antitumor activity in vivo. Our results indicate that the methanolic extract inhibits cell proliferation in vitro and induces autophagy through LC3 hyperlipidation in HCT116 cells. Furthermore, it reduces tumor growth in a murine xenograft model; no cellular macroscopic toxic signals were observed compared to those treated with cisplatin (the reference drug used).

1 Introducción

1.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad que puede ser definida como la reproducción y crecimiento acelerado y sin control de células las cuales tienen la capacidad de migrar e invadir tejidos aledaños o distantes. Esto debido a una serie de alteraciones moleculares adquiridas progresivamente en las células tumorales, ocasionadas principalmente por mutaciones en genes supresores de tumores y/o en oncogenes (Hassanpour y Dehghani, 2017). Estas características distintivas, o “hallmarks del cáncer” se presentan virtualmente en todos los tipos de cáncer, e incluyen el mantenimiento de la señal proliferativa, la evasión de supresores de crecimiento, la resistencia a muerte celular, inmortalidad replicativa, inflamación y angiogénesis sostenida, metástasis, inestabilidad genómica, desregulación del metabolismo energético y resistencia a la muerte celular (Hanahan, 2022) (Figura 1).

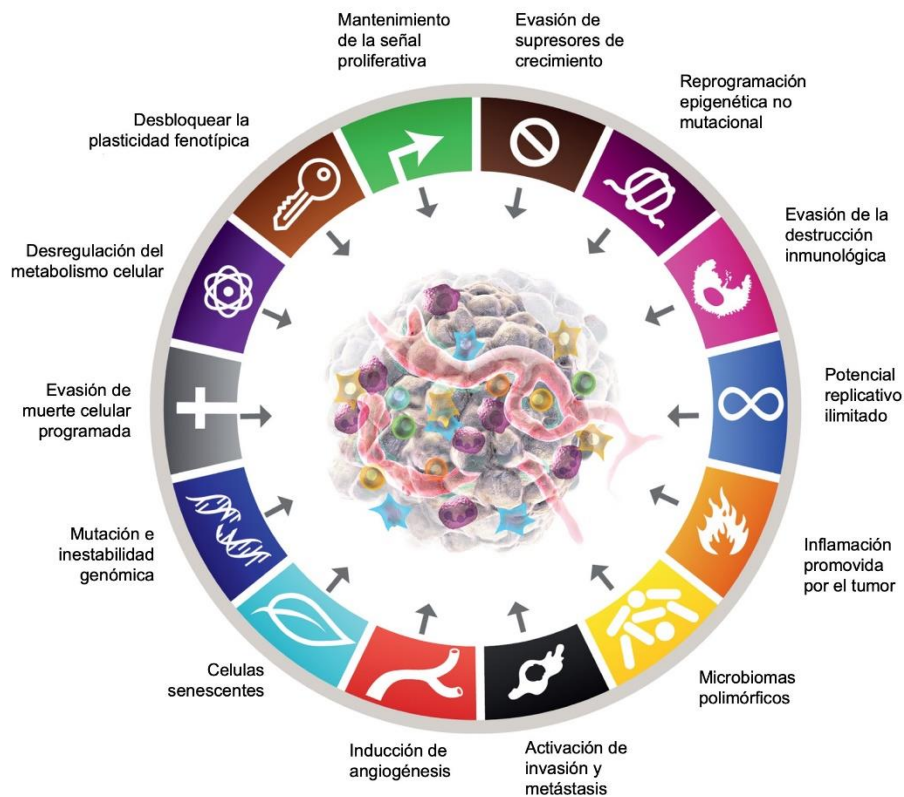


Figura 1 "Hallmarks del cáncer". Modificado de Hanahan 2022.

De acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS,2018) el cáncer es la segunda causa de muertes a nivel mundial, siendo el cáncer pulmonar, de mama, colorrectal, de hígado y estómago los que causan el mayor número de decesos (Figura 2) (Ferlay et al., 2021).

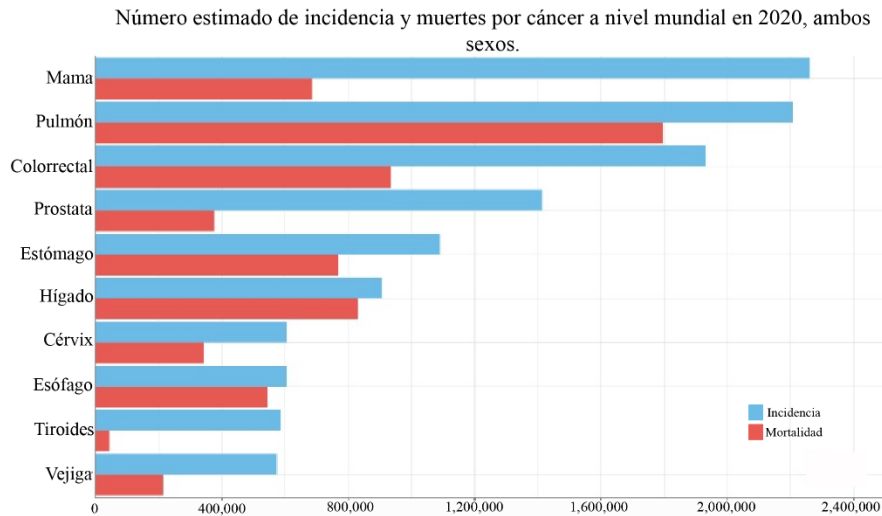


Figura 2 Tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad en ambos sexos a nivel mundial (GLOBOCAN 2020).

En la clasificación de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (International Agency for Research on Cancer, IRC,2020), en México, los tipos de cáncer con mayor índice de incidencia y mortalidad son próstata en hombres, mama en mujeres, y cáncer colorrectal en ambos (Figura 3).

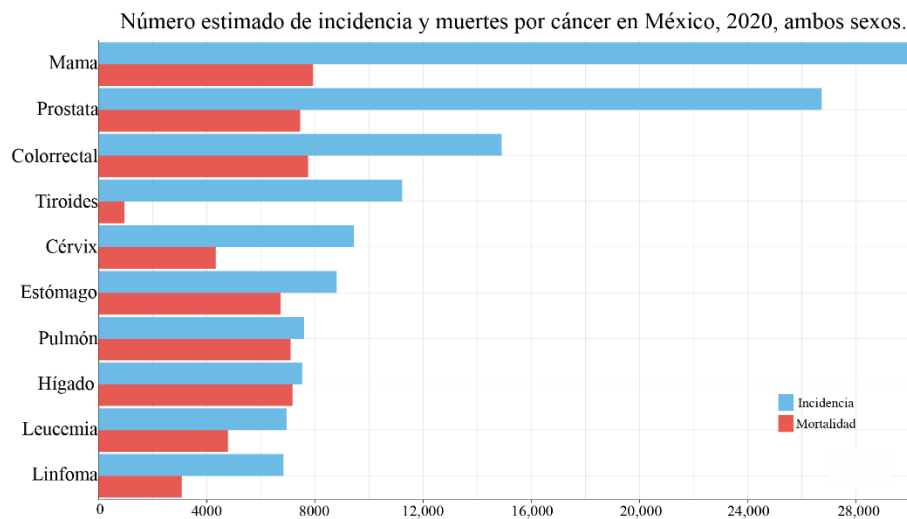


Figura 3 Tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad de ambos sexos en México (GLOBOCAN 2020).

1.2 Cáncer Colorrectal (CCR).

El cáncer colorrectal (CCR) es la segunda causa de muerte ocasionada por cáncer a nivel mundial. En 2020 se reportaron 1.9 millones de casos y 935,000 muertes asociadas a CCR a nivel mundial (Cruz-Mendoza et al., 2021. Sung et al., 2021). En México de igual manera, el CCR es la segunda causa de muerte por cáncer en ambos sexos, con 14,901 nuevos casos y 7,555 decesos, tan solo en 2020 (GLOBOCAN, 2020).

1.2.1 Etiología del CCR.

Factores ambientales y genéticos juegan un papel importante en la etiología del CCR. Se calcula que del 70 al 80% de los casos registrados son considerados como esporádicos, asociados a factores ambientales y al estilo de vida, sin antecedentes familiares directos. El resto de los casos se relaciona a historia familiar con CCR, siendo un 5% de estos de tipo hereditario, asociado a factores genéticos (Kupiers et al., 2015. Sawicki et al., 2021).

Factores genéticos: Existen diversos síndromes hereditarios asociados a CCR, sin embargo, los de mayor frecuencia se agrupan en los siguientes:

- *Poliposis adenomatosa familiar (FAP)*

Caracterizada por el desarrollo de cientos de pólipos adenomatosos (crecimiento anormal de tejido en el recubrimiento del intestino) debido a una mutación germinal en el gen supresor de tumores APC (adenomatous polyposis coli), heredada de manera autosómica dominante. Estos pólipos empiezan a desarrollarse en la adolescencia, y, de no ser detectados o reconocidos, casi el 100 por ciento de estos pacientes desarrollaran CCR entre los 35-40 años (Kolligs 2016).

- *Síndrome de Lynch:*

También conocido como cáncer colorrectal no polipósico hereditario. Este síndrome representa apenas al 3% por ciento de causa de CCR, y es considerado la mayor causa de CCR asociado a síndromes. El síndrome de Lynch es heredado igualmente de manera autosómica dominante, y consta de mutaciones germinales en los genes MLH1, MSH2, o PMS2, los cuales ocasionan la pérdida de proteínas involucradas en la maquinaria de reparación de apareamientos erróneos del ADN (mismatch repair MMR) y, en consecuencia, se permiten errores en microsatélites que ocurren durante la replicación de ADN, generando inestabilidad genómica y por lo tanto acumulación de mutaciones en células somáticas (Shegal et al. 2014, Boland y Goel, 2010).

- *Poliposis asociada a MUYTH (MAP).*

Similar a FAP, en este síndrome se presenta la formación de pólipos adenomatosos, que aumenta la probabilidad de desarrollar CCR en un 80 % en pacientes con edades avanzadas. Ocurre cuando existe una mutación en la proteína MUYTH, cuya función es eliminar bases nitrogenadas dañadas por estrés oxidativo al ADN, lo que ocasiona a su vez acumulación de errores en la replicación de ADN y mayor probabilidad de desarrollo de mutaciones (Gonzalez et al., 2017). A diferencia de los síndromes mencionados, MAP se hereda de manera recesiva y requiere de mutaciones con pérdida de función en los dos alelos para manifestarse (Nielsen et al., 2010).

Existen otros síndromes hereditarios con menor incidencia que los antes mencionados, en la que se empiezan a desarrollar pólipos de diferente tipo a los adenomas, denominados pólipos hamartomatosos. Estos pólipos generalmente son benignos, pero pueden originar displasia y carcinoma (Gonzalez et al., 2017). Síndrome de Peutz-jeghers, de Bannayan-Riley-Ruvalcaba y de Cowden son los

más representativos en esta categoría, y están asociados principalmente a una mutación autosómica dominante con pérdida de función en el gen PTEN, una proteína supresora de tumores involucrada como antagonista en diversas vías de señalización de crecimiento y de proliferación celular (Jeslig et al., 2014).

Factores ambientales:

Varios factores han sido asociados con el aumento en el riesgo de desarrollar CRC, dentro de los cuales destacan acciones involucradas en el estilo de vida de las personas. Factores como el consumo regular o elevado de alcohol y tabaco, la ingesta de carnes rojas y/o procesadas, y padecer de sobrepeso u obesidad. Estas acciones son modificables, y, acciones como mantener una dieta rica en verduras y frutas, granos, fibra y hacer ejercicio de manera rutinaria reducen la probabilidad de desarrollar CCR (Kupiers et al., 2015).

Otros factores reportados incluyen que en pacientes que presentan enfermedad inflamatoria intestinal, aumenta considerablemente la posibilidad de desarrollar CCR (Jess et al., 2012), así como haber tenido familiares directos con CCR o el padecer diabetes mellitus tipo 2 (Guraya, 2015.).

1.2.2 Mecanismos moleculares del CCR

Los factores genéticos y ambientales mencionados anteriormente contribuyen al desarrollo de CCR al promover la adquisición de los “hallmarks” del cáncer, debido a la acumulación de mutaciones genéticas y epigenéticas asociadas a la activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores (Hanahan y Weinberg, 2011), lo cual afecta a diversas vías de señalización de manera progresiva dentro de las células del epitelio del colon. Actualmente se tienen definidos diferentes mecanismos de progresión molecular por los cuales se puede desarrollar CCR.

- Vía de Inestabilidad Cromosómica (CIN)

Esta vía es la más estudiada en CCR, con cerca de un 60 % de casos asociados (Ahnen, 2011). El proceso de progresión tumoral involucra a proteínas reguladoras de puntos de control (*checkpoints*) de huso mitótico que a su vez afectan la estabilidad cromosómica durante la mitosis. Ocurre con una mutación inicial en el gen supresor de tumores APC (por sus siglas en inglés adenomatous polyposis coli), una proteína involucrada en la vía WNT/ β -catenina/TCF. La mutación inactiva a APC, resultando en una activación constante de la vía debido a que β -catenina deja de degradarse, ocasionando una traslocación en el núcleo acumulada haciendo que se transcriban genes de proliferación, diferenciación y migración (Figura 4) (Colussi et al., 2013). El gen K-ras se ve igualmente afectado en la vía de CIN, el cual transcribe para una proteína GTPasa (RAS) que se encarga de transducir y propagar señales extracelulares, principalmente a través de la vía de MAPK/ERK. Las mutaciones registradas en KRAS dentro de CCR conducen a un estado activo permanente de la misma, permitiendo a la célula evadir la apoptosis y sostener señales de crecimiento (Malumbres y Barbacid, 2003).

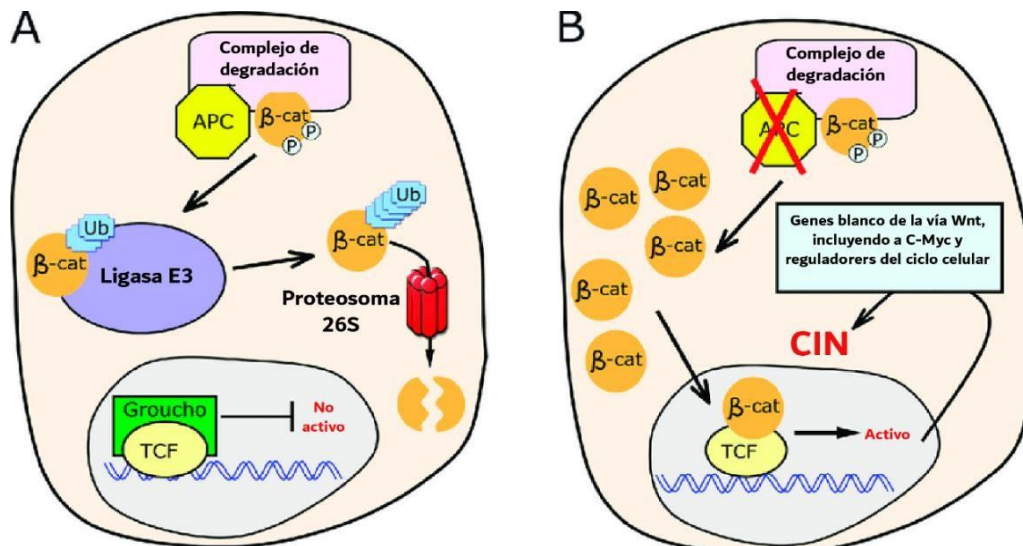


Figura 4 Función de APC dentro la vía WNT/ β -catenina/TCF. A) APC en su estado funcional involucrado en la fosforilación y degradación de β -catenina. B) La pérdida de APC dentro de CIN conlleva a la acumulación de β -catenina y la activación de sus genes diana (Tomada y modificada de Rusan y Peifer 2008).

- Vía de inestabilidad de Microsatélites (MSI)

La vía de MSI es considerada como la causante de aproximadamente 15% de casos esporádicos de CCR. Ocurre debido a la inactividad del sistema de reparación de apareamientos erróneos (MMR) del ADN, lo cual provoca un aumento de 100 veces la tasa de mutación en microsatélites (Secuencia corta de ADN, por lo general formada por 1 a 4 pares de bases que se repiten juntas en una hebra de la molécula de ADN) de las células de la mucosa colorrectal (Sinicrope et al., 2012). Esta inactivación, es la consecuencia de mutaciones que se dan en genes involucrados en la codificación de proteínas de la maquinaria del MMR, tales como MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 (Boland y Goel 2010), las cuales previenen la formación de secuencias erróneas de microsatélites (secuencias de ADN de 1 a 6 pares de bases que se repiten consecutivamente). Se ha reportado que mutaciones en microsatélites ocasionan operatividad deficiente en diversas vías de señalización, favoreciendo el crecimiento celular, inhibición de apoptosis y proliferación (Colussi et al., 2013)

- Vía de fenotipo metilador de islas CpG (CIMP)

Esta vía consiste en la hipermetilación aberrante de dinucleótidos CpG (Citosina seguido de Guanina) ubicadas en islas CpG que se encuentran en regiones promotoras de genes implicadas en procesos de regulación del ciclo celular, apoptosis, angiogénesis, invasión y adhesión. Dichas metilaciones, provocan el silenciamiento en la expresión de los genes (Ogino et al., 2006). También es conocida como la vía “serrated”, debido a que los pólipos que podrían desarrollar CCR son distintos a los adenomas tubulares, de un fenotipo sésil y “serrado”. Los principales genes involucrados son CDKN2A y THBS1, los cuales regulan procesos de ciclo celular e interacciones célula-célula respectivamente (Kupiers et al., 2015).

1.2.3 Terapia Actual

El tratamiento del CCR depende de la etapa en la que se encuentre éste. En las etapas I y II se lleva a cabo una cirugía de donde se extirpa la sección del colon que contiene el cáncer, junto con los ganglios linfáticos cercanos potencialmente invadidos. En algunos casos de etapa II se recurre a la quimioterapia adyuvante. Para los casos de etapas III y IV, se realiza cirugía seguida de quimioterapia adyuvante, y radioterapia en ciertos casos de etapa IV (Tabla 1) (American Cancer Society, 2018).

Etapas del CCR

Etapa 0	Cáncer <i>in situ</i> , restringido al revestimiento más interno del colon, en la mucosa.
Etapa I	Cáncer aún en el revestimiento interno, pero creció a través de la mucosa del colon e invadió la capa muscular.
Etapa II	Neoplasia que se expandió a través de la mucosa y la capa muscular del colon, y puede estar afectando a tejidos aledaños, pero aún no llega a nódulos linfáticos.
Etapa III	El cáncer invadió nódulos linfáticos cercanos al colon, así como tejidos aledaños al colon o recto.
Etapa IV	Las células malignas han migrado a otros órganos a través del sistema linfático (metástasis). Principalmente pulmones e hígado.

Tabla 1 Etapas clínicas del CCR (Colorectal cancer alliance, 2022)

La medicación dentro de la quimioterapia adyuvante consiste en diferentes combinaciones de fármacos, los principales usados dentro del CCR son FOLFOX, FOLFIRI y CAPOX (Tabla 2).

Fármacos Quimioterapia

FOLFOX	<ul style="list-style-type: none"> • 5-Fluoruracil • Leucovorina • Oxaliplatino
FOLFIRI	<ul style="list-style-type: none"> • 5-Fluoruracil • Leucovorina • Irinotecan
CAPOX	<ul style="list-style-type: none"> • Capecitabina • Oxaliplatino

Tabla 2 Combinaciones de fármacos quimioterapéuticos para el tratamiento de CCR (Argilés et al. Annals of Oncology 2020.)

Sin embargo, en promedio, entre un 30 y 50% de los pacientes CCR tratados con quimioterapia, recaerán y fallecerán por la enfermedad (Argilés et al., 2020), además se presentan efectos colaterales conocidos efectos secundarios de los fármacos (Hyeong-Joon et al., 2011, Schneider et al., 2007). Por lo que resulta de importancia la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento con mayor eficiencia y selectividad contra células malignas.

1.3 Productos Naturales.

De manera tradicional se han llamado productos naturales (PN) a los compuestos producidos por el metabolismo secundario de plantas, hongos, bacterias y otros seres vivos, y han sido probados a nivel experimental para el tratamiento de muchas enfermedades, incluyendo al cáncer (Dias, et al., 2012). Estos productos han sido la principal fuente de ingredientes activos de una gran variedad de fármacos que se usan actualmente, se estima que más 1800 nuevos medicamentos aprobados entre 1981 y 2019 provienen o tienen un origen de PN (Newman y Cragg, 2020; Harvey, 2008). Por lo que la investigación en éstos puede conducir al desarrollo de nuevos y diferentes alternativas de tratamiento.

1.4 *Annona macrophyllata* Donn.Sm., Annonaceae.

Annona macrophyllata, conocida popularmente como guanábana o ilama, es un árbol que forma parte de la familia Annonaceae, originaria de la zona subtropical y tropical de América, específicamente del sureste de México, Guatemala y el Salvador. El árbol alcanza una altura de hasta 8.5 metros de altura. El fruto es de forma ovalada, los especímenes más grandes llegan a pesar de 500 a 900 g, y cada árbol produce un promedio de 50 frutos (Figura 5) (Julián-Loeza et al., 2011).



Figura 5 Fruto y árbol de *A. macrophyllata* (Bahardwaj et al., 2019).

1.4.1 Usos en medicina tradicional

Se ha reportado que los frutos de diversas especies de *Annonas*, incluyendo *A. macrophyllata* son consumidos de manera regular, ya sea crudos, o en forma de jugos, yogurts, o purés de néctar. En México son típicamente usados para hacer bebidas frescas y postres refrescantes (Escobedo-López et al., 2018).

De manera general se menciona el uso extractos de las hojas, raíces, semillas, y cáscaras de especie para el tratamiento de los padecimientos: fiebre, diarrea, disentería, hematuria, asma, enfermedades parasitarias, tumores de piel y cáncer gástrico (Barbalho et al., 2012, Alonso-Castro et al., 2011).

Estas propiedades biológicas se le han atribuido a la presencia de diversos metabolitos secundarios producidos por *A. macrophyllata*, principalmente a compuestos fenólicos, flavonoides, ácidos grasos, alcaloides y acetogeninas (Anaya-Esparza et al., 2020).

1.5 Acetogeninas

Las acetogeninas (ACG) son compuestos característicos de la familia Annonaceae. Son metabolitos especializados derivados de la vía de síntesis de policétidos, presentan una cadena larga de carbonos derivada de ácidos grasos, constituidos por 34/37 átomos de carbono, con uno o varios anillos de tetrahydrofurano (THF), que forman un núcleo hidrofílico central y grupos hidroxilo en diferentes posiciones, una α , β lactona insaturada terminal y un espaciador de alquilo (Alali et al., 1999, Bermejo et al., 2005). Desde el descubrimiento de la uvaricina en 1982, la primera ACG aislada e identificada, numerosas ACGs han sido igualmente aisladas de diferentes especies de la familia, especialmente de las semillas (McLaughlin, 2008). Diversos estudios han reportado a las ACGs un amplio espectro de propiedades biológicas como antiparasitarias, neurotóxicas, inmunosupresoras, pesticidas citotóxicas y antineoplásicas (Coria-Télez et al., 2018). Las ACGs se clasifican de acuerdo con su estructura molecular, tomando en cuenta principalmente en el acomodo de los anillos de THF. La mayoría contienen 1 o 2, sin embargo, algunas ACGs pueden llegar a presentar 4. Se dividen en tres grandes grupos principales:

- a) Acetogeninas Mono THF: Presentan únicamente un anillo de THF. Son el tipo de ACGs más abundante presente en *Annonas*.

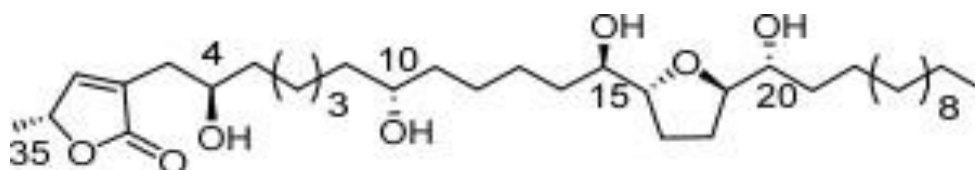


Figura 6 Estructura general de Acetogeninas Mono THF.

- b) Acetogeninas Bis-THF adyacentes: Presencia de dos anillos THF adyacentes, flanqueados por dos grupos hidroxilos.

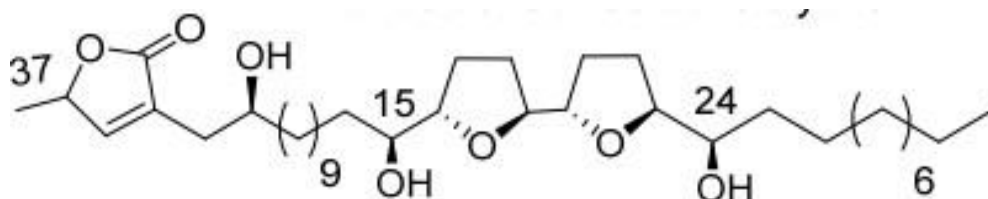


Figura 7 Estructura general de Acetogeninas Bis-THF adyacentes.

- c) Acetogeninas Bis-THF no adyacentes: El grupo con menor abundancia dentro de las ACGs, presentan dos anillos THF separados por una cadena alifática de 4 carbonos (Liaw et al., 2016., Durán, et al., 2021).

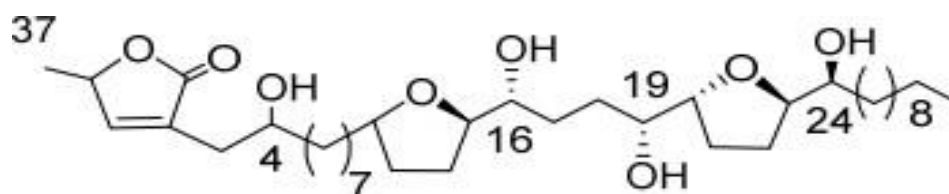


Figura 8 Estructura general de Acetogeninas Bis-THF no adyacentes.

Se ha observado que la actividad biológica (antiparasitaria, neurotóxica, inmunosupresora, citotóxica, antineoplásica) de las ACGs se debe a la presencia de dos dominios funcionales, que son la lactona terminal y en núcleo hidrofílico polar los anillos THF (McLaughlin, 2008).

1.5.1 Acetogeninas en cáncer

Se ha demostrado en múltiples investigaciones enfocadas a las ACGs, el efecto antitumoral que poseen sobre diversas líneas celulares neoplásicas *in vitro* e *in vivo*, así como los mecanismos de acción que presentan (Mangal et al., 2016.).

Las ACGs son potentes inhibidores de la cadena de respiración mitocondrial a nivel del complejo I NADH ubiquinona oxidoreductasa (Tundis et al., 2017). Los grupos THF presentes en las ACGs junto con los grupos hidroxilo permiten difusión lateral de la molécula a través de la membrana, debido a que cationes de Ca_{2+} se enlazan con los grupos hidroxilo y ocurre un cambio conformacional en donde las regiones periféricas hidrofóbicas de las ACGs rodean a este este nuevo dominio iónico. Este arreglo estructural permite la penetración de las ACGs sobre las membranas plasmáticas, ocasionando su interacción con el complejo I (Figura 9). Se ha reportado un modelo en donde el o los anillos de TDH y el de la lactona se acoplan simultáneamente en dos sitios diferentes del complejo I de la cadena con una distancia menor a 13 carbonos, específicamente en la subunidad ND1, impidiendo así el correcto funcionamiento de la cascada de protones (Gaviria et al., 2018, Tundis et al., 2017, Liaw et al., 2016). La presencia de un anillo de THF puede ser suficiente para ocasionar este bloqueo, pero en caso de que haya dos anillos presentes, la unión al complejo resultaría más estable (Abe et al., 2008).

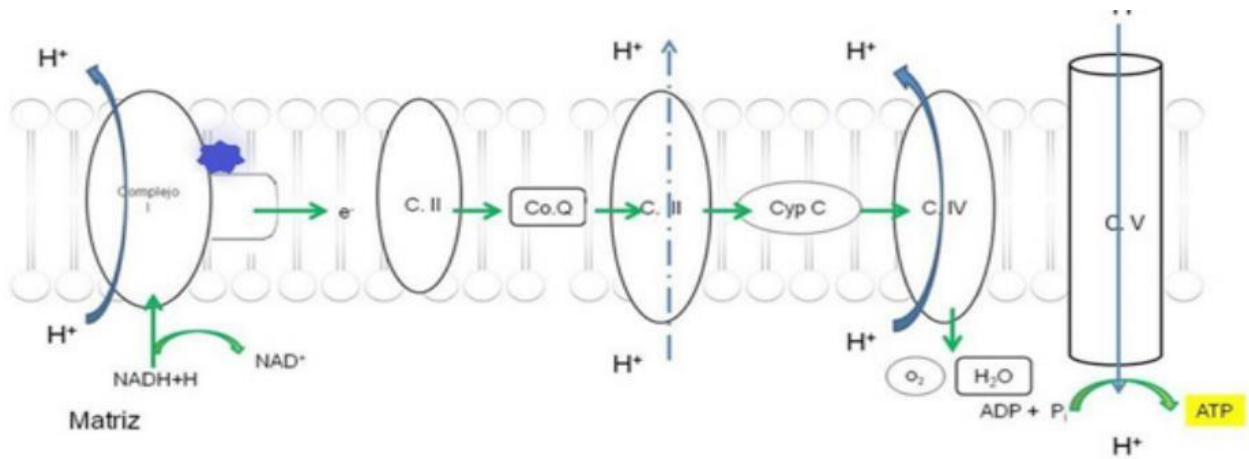


Figura 9 Representación de la cadena de respiración mitocondrial y el complejo NADH ubiquinona oxidoreductasa afectado por la interacción de las Acetogeninas \star . Tomado de Gaviria et al., 2018. C. I NADH ubiquinona oxidoreductasa, C. II Succinato-deshidrogenasa, C. III Citocromo C-reductasa, C. IV Citocromo C-oxidasa, C. V ATP-sintasa.

De igual manera se ha reportado la capacidad de las ACGs de inhibir la actividad de la NADH oxidasa (NOX), que se encuentra en la membrana plasmática de células tumorales (Tundis et al., 2017, Deep, et al., 2016). NOX es un complejo enzimático involucrado en la cadena de transporte de electrones, genera superóxido y especies reactivas de oxígeno (R.O.S) a partir de la oxidación del NADPH. La acción aberrante de NOX está correlacionada con la progresión del cáncer, ya que las R.O.S. actúan como mensajeros secundarios que favorecen a la sobreexpresión de oncogenes y a la activación de HIF1-alfa, ocasionando un incremento en la actividad metabólica de las células tumorales (Casse, 2018).

En conjunto, la inhibición de la actividad del complejo 1 de la respiración mitocondrial y NOX, favorecen a la inducción de muerte celular por apoptosis o autofagia (Jacobo-Herrera et al. 2019, Liaw et al., 2016).

1.6 Autofagia

La autofagia es un proceso conservado en células como mecanismo de reciclaje o limpieza en momentos de crisis. Las células guían a algunos de sus componentes citosólicos a los lisosomas para su degradación y reciclaje. Se clasifica en 3 tipos de procesos, macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. Por consenso en la literatura, de ahora en adelante, en este trabajo la macroautofagia será referida como “autofagia. (Glick, et al., 2010).

En la autofagia, ocurre la degradación proteolítica de diversas estructuras citosólicas (organelos deteriorados o en exceso, proteínas mal plegadas) con el fin de reciclar las macromoléculas resultantes. Los sustratos de la autofagia son envueltos en un organelo de doble membrana denominado autofagosoma, el cual posteriormente se fusiona con los lisosomas. El reciclaje de los componentes degradados en la autofagia se da en respuesta a la deprivación de nutrientes en la célula, por lo que tiene un rol importante en la homeostasis celular (Ichimiya et al., 2020, Mizushima et al., 2002).

1.6.1 Vía de señalización de la autofagia

El desarrollo de autofagia se divide en diferentes fases o etapas conocidas como inducción, nucleación, elongación, fusión, degradación y reciclaje (Figura 10). Se ha reportado que en levaduras el proceso está regulado por cerca de 40 diferentes genes que codifican “proteínas asociadas a autofagia (Atg)”, y la mayoría de estos, alrededor de 20, son genes conservados de igual manera en mamíferos, lo que indica que la autofagia es un proceso evolutivamente conservado (Oshumi, 2014. Mizushima et al., 2011. Klionsky et al., 2003.).

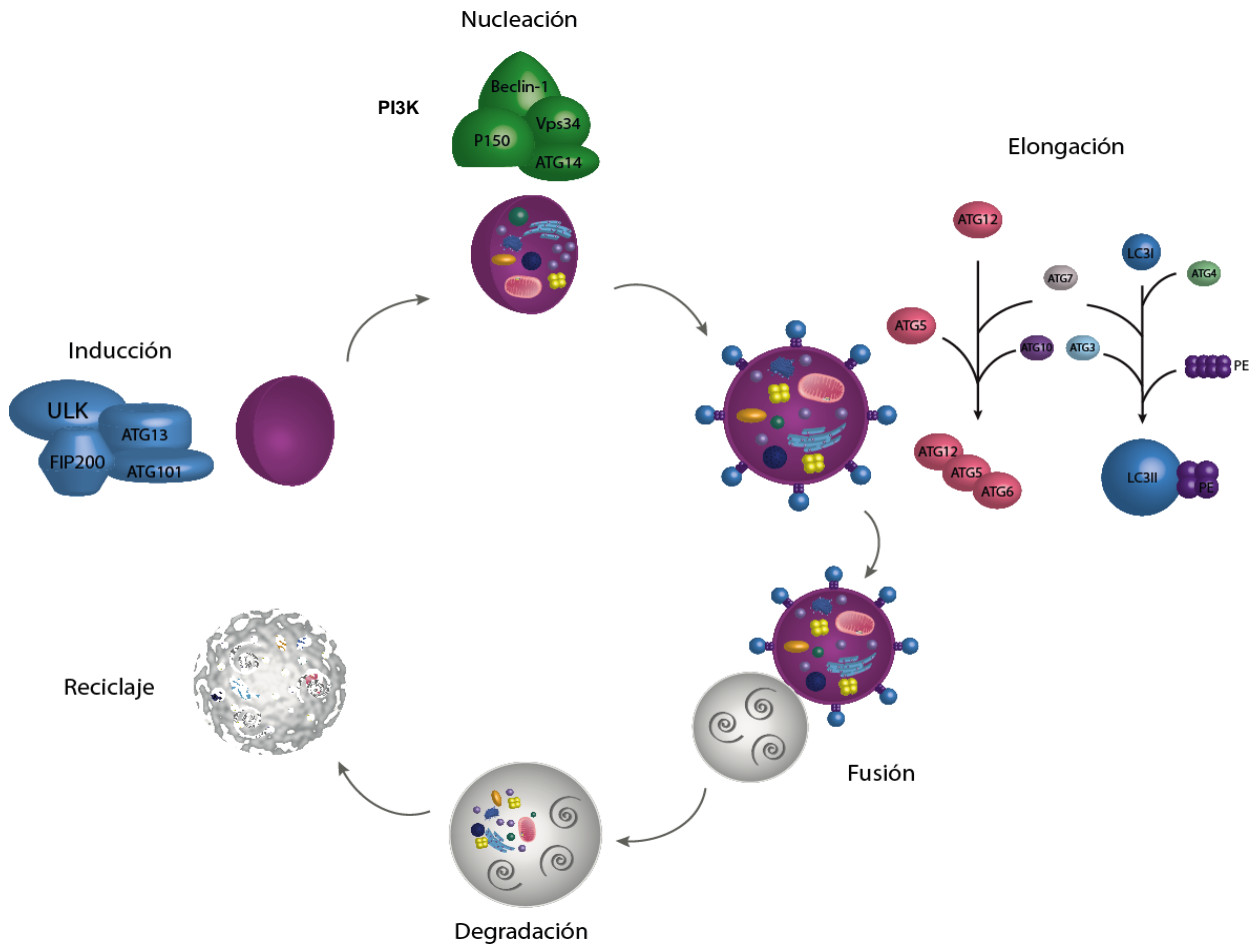


Figura 10 Proceso de regulación de autofagia. Formación del autofagosoma a través de diferentes complejos, llevando a la fusión y degradación de los componentes citoplasmáticos (Tomado de Delgado., 2016).

Inducción: La autofagia puede ser originada por diversos estímulos extra e intracelulares, incluyendo privación de nutrientes o estrés oxidativo, lo que ocasiona la activación del complejo ULK (ULK 1o2/Atg13/FIP200/ATG101). Bajo condiciones ricas en nutrientes, el complejo mTORC1 (blanco mamífero de rapamicina 1), interacciona con el complejo ULK, fosforilando a ULK1/2y a Atg13, inactivándolas. Sin embargo, bajo condiciones de falta de nutrientes, esta interacción entre MTORC1 y el complejo ULK se disocia, resultando en la desfosforilación de los sitios y la inducción de la autofagia al formar una estructura membranosa pre-autofagosómica proveniente del retículo endoplasmático denominada fagóforo (Hosokawa et al., 2009; Hayashi-Nishino et al., 2009).

Nucleación: La activación del complejo ULK causa el reclutamiento de otro complejo al sitio de formación del fagóforo, el complejo PI3K (fosfatidilinositol 3 cinasa), compuesto por Beclina-1/Vps34/P150/Atg14. La activación de éste genera fosfatidilinositol-3 fosfato (PIP3), necesario para la interacción de más Atgs con la formación del autofagosoma (He C y Klionski, 2009).

Elongación: Esta etapa está controlada por dos sistemas de conjugación regulados por proteínas similares a ubiquitina (UBL por sus siglas en inglés) que contribuyen a la expansión del fagóforo. El primero es el sistema Atg12-Atg5-Atg16. Este sistema se forma cuando la proteína UBL Atg12 se conjuga con Atg5 de una manera dependiente de Atg7 (enzima activadora tipo E1) y Atg 10 (enzima conjugadora tipo E2), permitiendo así la unión de Atg16. Este complejo se asocia con la membrana del fagóforo e induce una curvatura de esta para su posterior cierre y formación del autofagosoma (Glick et al, 2010. Kuma et al., 2002), El segundo sistema es el compuesto por LC3. La proteína LC3 (por sus siglas en inglés "light chain 3") se sintetiza como pro-LC3 (o LC3B), y es escindida por la cisteína proteasa Atg4, originando a LC3-I. Luego nuevamente Atg7 actúa, activando a LC3-I y la transfiere con Atg 3 (enzima conjugadora tipo E2), promoviendo así, la conjugación con fosfatidiletanolamina (PE), donde Atg12-Atg5-Atg16 funge como enzima ligasa tipo E3, facilitando la lipidación de LC3-I dando lugar a LC3-II. LC3-II se une de manera interna y externa a la membrana del fagóforo, donde juega un rol en el cierre del fagóforo para la formación del autofagosoma. De igual manera está involucrada en la selección de los sustratos que va a envolver, funcionando como un receptor que interactúa con proteínas como P62 que "marca" a los sustratos y los guía al autofagosoma para promover su degradación (Costas y Rubio 2017; Parzych y Klionsky, 2014).

Fusión: Una vez formado el autofagosoma, éste se mueve de manera dependiente de los microtúbulos para fusionarse con compartimientos lisosomales para formar al autolisosoma. Esto sucede gracias a la acción de diversas proteínas,

tales como VTIIB, UVRAG que activa a RAB7, Lamp 1 y Lamp2 (Parzych y Klionsky, 2014).

Degradación y reciclaje: Una vez completada la fusión, los sustratos citosólicos englobados son degradados por las hidrolasas lisosomales, y los productos obtenidos se liberan al citoplasma para su futura reutilización (Saha et al., 2018).

1.6.2 Autofagia en cáncer

Como se mencionó anteriormente, la autofagia tiene un papel considerable en la degradación de organelos en mal estado, proteínas mal plegadas y en el mantenimiento de la homeostasis celular. En el cáncer, se ha reportado que la autofagia tiene roles tanto como de supresor de tumores como de promotor, ya que puede contribuir a la proliferación celular (Yun y Lee, 2018).

Asimismo, la autofagia genera un efecto inhibitorio sobre el cáncer al remover células y organelos dañados, por lo que limita la proliferación celular e inestabilidad genómica. De igual manera se ha reportado al gen de Beclina-1 como supresor de tumor, ya que el locus del gen se encuentra suprimido en 50-70% de diferentes tipos de cáncer (Saha et al., 2018, Liang et al., 1999). Una inhibición o deficiencia de la autofagia causaría estrés oxidativo, por lo tanto, activación de la respuesta de daño al ADN e inestabilidad genómica (White, 2015). Se ha reportado también, que en ratones knockout de proteínas Atg5 y Atg7, se genera cáncer de hígado a partir de hepatocitos deficientes de autofagia, debido a daño mitocondrial y estrés oxidativo (Yun y Lee 2018).

En diversas y recientes investigaciones, la autofagia ha despertado interés como un mecanismo de muerte celular, asociada, dependiente o mediada por la misma. En estos casos se ha observado que la apoptosis puede actuar a la par que la autofagia o que la autofagia desencadene a la apoptosis (Jacobco-Herrera et al., 2019; Denton y Kumar, 2018), por lo que este mecanismo podría ser blanco de nuevas investigaciones para el desarrollo de tratamientos contra el cáncer.

1.7 Antecedentes

Syed y colaboradores (2016) observaron la capacidad antitumoral del extracto acuoso de las hojas de *Annona muricata* (Annonaceae) sobre diversas líneas celulares de cáncer de mama, teniendo un efecto mayor en la línea celular de cáncer de mama 4 T1, con una IC50 (Concentración inhibitoria media) de 250 µg/mL. En este trabajo se detectó inducción de actividad apoptótica *in vitro* y en un modelo *in vivo* de xenotrasplante en donde hubo una reducción de tamaño de tumores en ratones tratados con el extracto.

Laherradurina y Cherimilina-2, Acetogeninas aisladas de *A. macrophyllata* por Schlie-Guzmán y colaboradores, mostraron potencial inhibitorio de proliferación sobre una línea celular humana de cáncer de cérvix (HeLa) y de colon (SW480) *in vitro e in vivo*. Obteniendo una IC50 bajas en ambos compuestos, en especial para el caso de laherradurina. Así mismo, en un modelo de xenotrasplante con ambas líneas y tratados con las dos acetogeninas, se observó una reducción del crecimiento tumoral de manera significativa (Schlie-Guzmán et al., 2009). Los modelos de ratón son herramientas útiles para la comprensión de la biología del tumor, así como los factores implicados en el desarrollo tumoral, tales como hormonas, dieta, UV, radiación y químicos (Bazán et al., 2004).

El grupo de investigación de Haykal, probó que el extracto etanólico de la semilla de *A. cherimola* tenía un efecto antiproliferativo sobre líneas celulares de leucemia mieloide aguda (Mono-Mac-1, U937, KG-1). Los autores encontraron que el extracto induce la activación de las vías intrínseca y extrínseca de apoptosis en un mecanismo dependiente de p53 (Haykal, et al., 2019).

Por otra parte, un compuesto análogo de acetogeninas llamado AA005, mostró inhibición de la producción de ATP, bloqueando el complejo mTOR-2, induciendo en consecuencia autofagia y arresto del ciclo celular en la fase G1 sobre células de cáncer de colon, reduciendo así, la proliferación celular (Lui et al., 2012).

2. Justificación

Las terapias actuales contra el CCR tienen desventajas en su eficacia. La investigación sobre nuevas moléculas antitumorales sigue siendo prioritaria para el tratamiento del cáncer. Una oportunidad son las Acetogeninas por su citotoxicidad y efecto proapoptótico. En este trabajo estudiamos el extracto metanólico de *A. macrophyllata*, rico en acetogeninas, como inductor de muerte celular por en las células tumorales de cáncer de colon in vitro e in vivo como una opción terapéutica para el CCR.

3 Hipótesis

El extracto metanólico de *Annona macrophyllata* inhibirá la proliferación celular *in vitro* y el crecimiento tumoral en un modelo de xenotrasplante de células de CCR.

4 Objetivos

4.1 Objetivo General

- Determinar la actividad antitumoral que induce el extracto metanólico de semilla *Annona macrophyllata* (E.M.A) en ensayos *in vitro* y en un modelo *in vivo* de xenotrasplante de células tumorales de colon.

4.2 Objetivos particulares

- Identificar la presencia de acetogeninas en el extracto.
- Establecer la IC50 *in vitro* del extracto en la línea celular de CCR HCT116
- Determinar la capacidad extracto de inducir autofagia *in vitro*.
- Evaluar inhibición de crecimiento tumoral del extracto en un modelo *in vivo* de xenotrasplante.

5. Metodología

5.1 Obtención del extracto metanólico de *A. macrophyllata*.

El extracto metanólico de la semilla de *A. macrophyllata* fue proporcionado por la Dra. Alma Rosa Gonzalez Esquinca, de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH).

5.2 Cromatografía en capa fina

Para obtener una aproximación del perfil químico del extracto de *A. macrophyllata* y comprobar la presencia de acetogeninas, se realizaron cromatografías en placa fina en gel de sílice (MERK, milipore, 105729,) de 5 x 3 cm. Se disolvieron 20 mg del extracto metanólico de *A. macrophyllata*, 1 mg de la acetogenina annonacina (control positivo) en 1 mL de metanol, y se colocaron 5 µL de cada muestra con capilares sobre la placa de gel de sílice a 1.5 cm de distancia. Posteriormente se eluyó la placa con una solución cloroformo/metanol (9:1 V/V) para después ser rociadas, por una solución de ácido fosfomolibdico al 5% disuelto en metanol y calentadas en una placa calefactora para revelar los compuestos eluidos.

5.3 Cultivo Celular

Se empleó la línea celular de CCR HCT116 de la American Type Culture Collection (ATCC) proporcionada por el laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer (INCAN). Las células se mantuvieron en cajas de cultivo de 100x15 mm con medio RPMI-1640 (GIBCO, Invitrogen, 22400071), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% de la marca CORNING y mantenidas en una incubadora (Thermo Scientific) a 37°C con 5% de CO₂ en una atmósfera saturada de H₂O₂. Todos los ensayos *in vitro* fueron mantenidos bajo estas condiciones.

5.4 Concentración inhibitoria media (IC50)

Se usó la técnica de ensayo colorimétrico de sulforodamina B (SRB) para determinar la concentración inhibitoria media del extracto sobre la línea celular HCT116. En esta metodología, la SRB se adhiere a residuos básicos de aminoácidos bajo condiciones levemente acídicas y se disocia en condiciones básicas.

En placas de 96 de pozos, se sembraron las células HCT116 en 100 µL de medio RPMI-1640 suplementado al 10% con SFB con una densidad de 10,000 células por pozo. Posteriormente se incubaron por 24 h. para su adherencia. Una vez transcurridas las 24 h., se retiró el medio y se colocaron 200 µL de medio suplementado al 2% con SFB (para evitar la competencia entre el exceso de nutrientes y los tratamientos experimentales) con diferentes concentraciones del extracto metanólico de *A. macrophyllata* (E.M.A.) 100 µL/mL, 50 µL/mL, 25 µL/mL, 10 µL/mL, 1.5 µL/mL, 0.5 µL/mL y 0.1 µL/mL y como control células con medio suplementado al 2% con SFB.

Transcurridas 24 h. de exposición al extracto, se retiraron 100 μ L del medio y se añadieron 100 μ L de ácido tricloroacético (TCA) al 10% a cada pozo y se refrigeró la placa durante 1 hora para fijar las células. Después se lavaron las placas con agua y se tiñeron con SRB (MP BIOMEDICALS) durante 30 min. Luego, la placa fue lavada 4 veces con ácido acético al 1%; finalmente se dejaron secar a temperatura ambiente y se añadieron 200 μ l de Tris base 10 mM (Promega, USA) con pH 10.5 para solubilizar el colorante. El número de células viables es directamente proporcional a la cantidad de colorante disuelto, por lo que se determinó la supervivencia celular a través de la densidad óptica (DO) la cual se midió en un lector de microplacas (EPOCH, Biotek) a 510 nm. La IC50 se determinó a partir de una gráfica dosis-respuesta gradual con el software GraphPad Prism versión 8.0. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

5.5 Extracción de proteínas

Se realizaron diferentes extracciones para la obtención de proteínas. Para ello, la línea celular HCT116 se mantuvo en placas Petri (100x15mm) con una confluencia celular del 80% con las condiciones ya mencionadas y con 24 h. de adherencia. Posteriormente las células fueron expuestas a tratamiento usando la IC50 obtenida del E.M.A por 4, 8, 12 y 24 h. El control negativo fueron células sin tratamiento y el positivo de autofagia (Cloroquina).

La extracción se realizó bajo la técnica de buffer RIPPA adicionado con un coctel de proteasas Complete (Roche, #11697498001). Para todas las extracciones, destinadas se agregaron 100 μ l de buffer RIPPA, posteriormente las células fueron lisadas con ayuda de una espátula o “scraper”. El sobrenadante se recuperó en un tubo eppendorff de 600 μ l y fue agitado por 15 segundos cada 5 min. durante 30 min.

en un Vortex-Genie 2. A continuación, los conglomerados celulares fueron disgregados manualmente con la ayuda de una jeringa de 1ml. Para finalizar, el lisado celular fue centrifugado por 20 min. a 12,000 rpm a 4°C, el sobrenadante fue recuperado en otro tubo de 600 μ l y la cuantificación de proteínas se llevó a cabo con el método colorimétrico de Bradford (Sigma-Aldrich) en espectrofotómetro de microplacas (Epoch, Biotek) con una longitud de onda de 595 nm.

5.6 Western Blot

Para detectar y medir el nivel de expresión de las proteínas involucradas en la vía de señalización de autofagia, se utilizó la técnica de Western Blot. Se emplearon 30 μ g de proteínas, las cuales fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE utilizando el equipo Mini-PROTEAN Tetra System (BioRad) a 80 volts por 1 h. y 100 volts por 2-3 h. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PDVF) con un poro de 0.45 μ m mediante transferencia semi-seca en un equipo Trans-blot turbo (BioRad) a 20 volts por 30 min. Al terminar la transferencia, la membrana de PDVF fue bloqueada con una solución de leche libre de grasa al 5% en TBS-Tween 0.1 % (Tris 20mM, NaCl 150mM) por 2 h. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 10 min con TBS- Tween 0.1% y se incubó durante toda la noche con el anticuerpo (Ab) primario correspondiente a la proteína a detectar (Tabla 4). Una vez transcurrido el tiempo de incubación del Ab primario, se realizaron tres lavados con TBS-Tween 0.1% y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, acoplado a peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase, HRP) por 2 horas. Después de 3 lavados con TBS-Tween 0.1% de 10 min y un lavado de TBS (Tris 20mM, NaCl 150Mm), se utilizó el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Femto Maximun Sensitivity Substrate (#34095, Thermo Scientific). La detección de los inmunocomplejos se realizó a través del digitalizador C-Digit Blot Scanner (Li-COR) empleando el software ImageStudio.

Anticuerpo	No. catálogo	Ab secundario
LC3	2775s	Anti-rabbit
Beclin-1	3738s	Anti-rabbit
SQSTM1/P62	5114s	Anti-rabbit
ATG3	sc-130968	Anti-rabbit
Beta Actina	sc-47778	Anti-mouse
Anti-mouse IgG-HRP	7076s	
Anti-rabbit IgG-HRP	7074s	

Tabla 3 Listado de anticuerpos utilizados para Western Blot para la detección de proteínas involucradas en la vía de señalización de autofagia.

5.7 Modelo In vivo

Para determinar si el E.M.A era capaz de afectar el crecimiento tumoral en un modelo *in vivo*, se realizó en primera instancia un ensayo para obtener la dosis letal media (DL50) del extracto para establecer las dosis experimentales a administrar para el ensayo de xenotrasplante de células HCT116.

i. Dosis Letal Media (DL50)

Se determinó la dosis letal 50 (DL50) del compuesto con base al criterio 425 de la OECD (2008). Se utilizaron ratones macho de la cepa Fox1^{nu}/Fox1^{nu}, de 6 a 8 semanas de edad y con un peso promedio de 20 a 22 gramos, los cuales fueron obtenidos y almacenados por el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubiran (INCMNSZ). Los ratones se mantuvieron en las siguientes condiciones:

- Ciclos de luz y oscuridad (12/12h).
- Temperatura de 23 ± 2 °C.
- Agua y alimento Ad libitum.
- Alojamiento en jaulas de polipropileno

El ensayo consistió en la administración de dosis en una concentración progresiva: 1.75, 5.5, 17.5, 55, 175, 550 y 2000 mg/kg de peso del ratón, de

acuerdo con los lineamientos de la OECD. Siguiendo dichos lineamientos, se administró E.M.A diluido en solución inyectable por vía intraperitoneal a grupos de 3 ratones por dosis, y fueron observados con especial cuidado durante las primeras 4 horas post administración y cada 24 h. en un total de 14 días. Se registró el número de muertes por cada dosis y en el caso de los animales moribundos fueron sacrificados y registrado como muertes dentro del experimento. Por otro lado, se observó si los individuos presentaron pérdida de peso corporal, cambios de comportamiento o apariencia física, tales como temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargia, ojos cerrados, sangrado entre otras. Se dio por concluido el ensayo cuando tres animales sobrevivieron de manera consecutiva a una dosis empleada. La DL50 fue calculada de acuerdo con el criterio de Chinedu y colaboradores (2013), donde se utilizan las dosis establecidas por la OECD en la siguiente formula:

$$LD_{50} = \frac{[M_0 + M_1]}{2}$$

Donde M_0 = la dosis más alta de sustancia de prueba que no dio mortalidad,

M_1 = dosis más baja de sustancia de prueba que dio mortalidad.

ii. Xenotrasplante con línea Celular HCT116

Para la inducción de los xenotrasplantes, los animales fueron inoculados vía subcutánea en el flanco derecho de cada ratón con 1.5 millones de células HCT116 (Figura 11), las cuales fueron contadas en cámara de Neubauer, empleando como vehículo 200µL de medio RPMI al 10% de SFB. Los ratones inoculados fueron monitoreados diariamente hasta que la aparición de la masa tumoral alcanzara un volumen no mayor a 25 mm³. La medición de la masa tumoral se realizó con un vernier digital y una vez alcanzado el volumen esperado se inició con la administración del E.M.A vía intraperitoneal de acuerdo con los grupos experimentales de la tabla 5, con 5 ratones por tratamiento. Los ratones fueron mantenidos bajo las mismas condiciones que el ensayo de dosis letal media (DL50).

Grupos	Tratamientos	Dosis
1	Dosis Media	3.5 mg/kg E.M.A 1 vez x semana
2	Dosis Alta	7.75 mg/kg E.M.A 1 vez x semana
3	Control	Sin tratamiento
4	Control positivo	Cis platino 2 mg/kg

Tabla 4 Tratamientos empleados para el modelo in vivo de xenotrasplante. Las dosis fueron seleccionadas con base en el ensayo de dosis letal media (DL50).

La masa tumoral fue medida cada segundo día durante 21 días usando la fórmula: $V = \pi/6 \times (\text{diámetro mayor} \times [\text{diámetro menor}]^2)$. Una vez terminado el tratamiento los ratones fueron sacrificados en cámara de CO₂ para después obtener la masa tumoral, medirla y pesarla. Finalmente fue seccionada y preservada en solución de formalina.



Figura 11 Inoculación de células HCT116 para el modelo in vivo de xenotrasplante y medición del crecimiento de la masa tumoral con vernier digital

6. Resultados

6.1 Detección de acetogeninas en el extracto metanólico de *A. macrophyllata*

Para obtener una aproximación perfil químico del extracto y determinar la presencia de acetogeninas en el extracto, se comparó la elución del E.M.A con una acetogenina, la annonacina. Como se puede observar en la figura 12, se aprecian bandas con un mismo factor de retención (RF) en el control como en el E.M.A sugiriendo la presencia de annonacina en el extracto o de compuestos con estructura molecular similar.

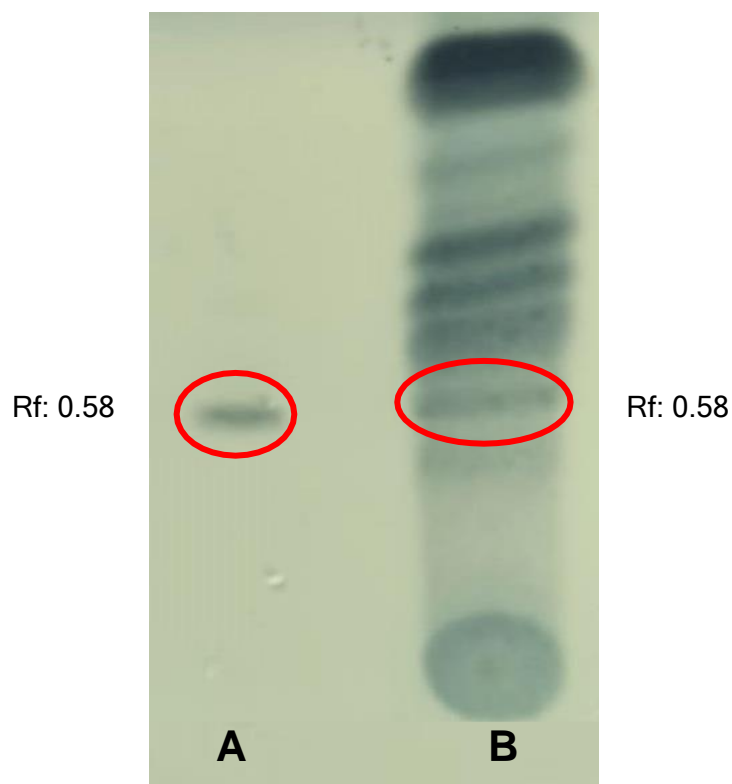


Figura 12 CCF de E.M.A con annonacina Fase móvil: Cloroformo-metanol (9:1). Reactivo revelador ácido fosfomolibdico al 5% en Metanol. A) Annonacina B) E.M.A

6.2 Concentración inhibitoria 50 (IC50) del extracto sobre una línea celular de CCR HCT116

Con respecto a la citotoxicidad del extracto sobre una línea celular de CCR, se observaron los valores de la absorbancia obtenida del colorante SRB adherido a las células vivas. Se puede apreciar que éstas disminuyeron en función del incremento de la concentración del extracto y el tiempo de exposición. Como se aprecia en la figura 13, se obtuvo una IC50 de 28.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cuando las células fueron expuestas durante 24 h. y de 14.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 48 h.

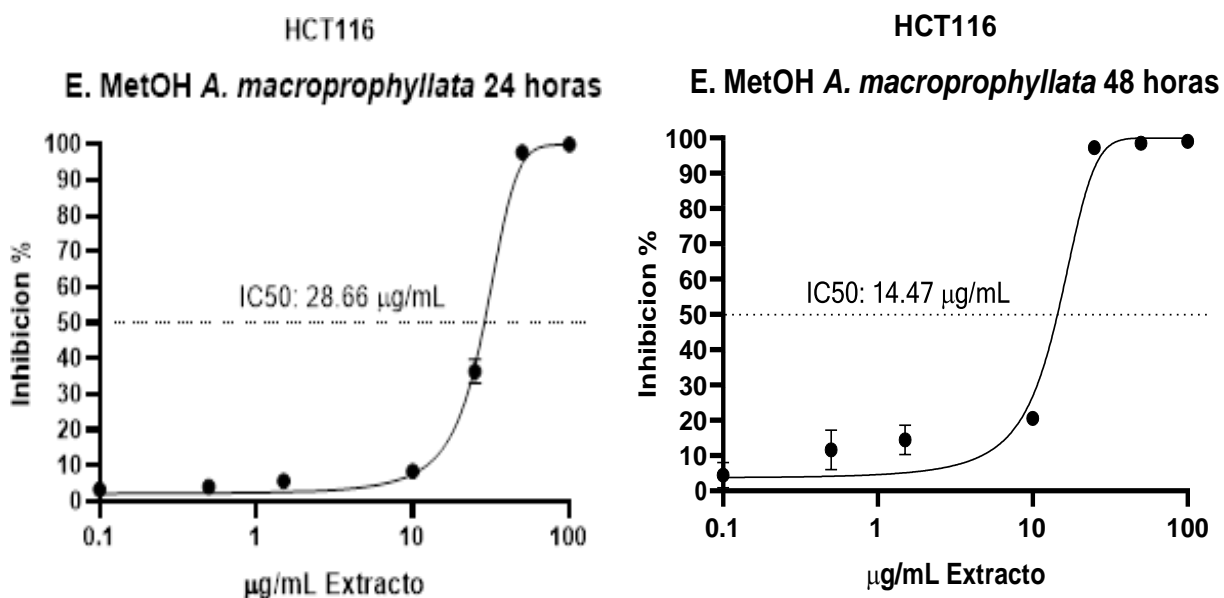


Figura 13 Concentración inhibitoria media del E.M.A sobre línea celular HCT116

Los resultados obtenidos demuestran que el E.M.A promueve la inhibición de la proliferación celular y es dosis/tiempo dependiente. Se empleó una concentración de 30 microgramos por mililitro de E.M.A para los estímulos de la extracción proteica.

6.3 El extracto metanólico induce autofagia sobre la línea celular HCT116 *in vitro*

En la autofagia existen proteínas esenciales que participan en la inducción y en las diferentes etapas del desarrollo del proceso de formación del autofagosoma y el reciclaje de biomoléculas. Tales proteínas incluyen a: Beclina-1, Atg 3, P62, LC3 I y LC3 II, por lo que se consideró de relevancia conocer su nivel de expresión a nivel de proteína.

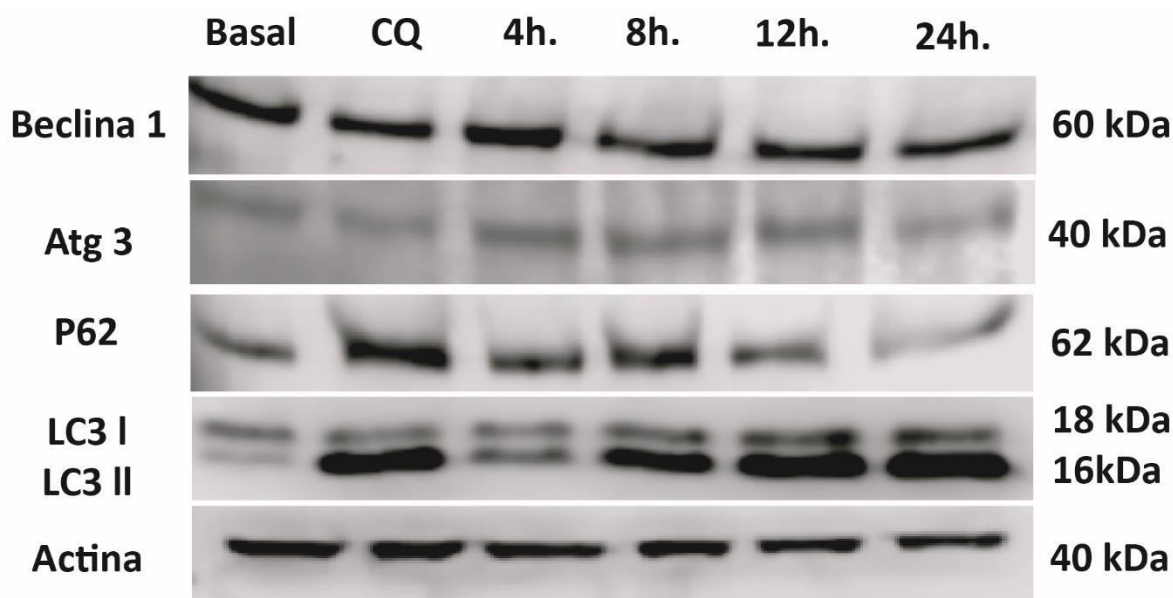


Figura 14 Detección de las proteínas en la línea celular HCT116 involucradas en la vía molecular de autofagia mediante Western Blot, a 4, 8, 12 y 24 horas de exposición al E.M.A.

En la figura 14 se observa en las células HCT116 estimuladas con el extracto metanólico, la hiperlipidificación de LC3I a LC3II a partir de las 8 horas (banda inferior con mayor detección) de exposición. El papel de LC3 es promover la formación y cierre del autofagosoma, lo que indica mayor actividad de flujo autofágico. Con respecto a las demás proteínas detectadas no se aprecia diferencia notable frente a la exposición a E.M.A, salvo en el caso de P62, en donde se observa disminución a las 24h, lo que estaría en concordancia con el aumento de LC3 II, ya que, a mayor actividad de autofagia, menor cantidad de P62 en el citoplasma, pues está involucrada en la selección de material que va a ser degradado dentro del autofagolisosoma.

Los Western blots de las proteínas a detectar, fueron realizados por triplicado, y se determinó la densitometría óptica relativa usando el programa Image J. En la figura 15 se observa que únicamente se encontraron diferencias significativas en la detección de LC3 II a las 8, 12 y 24 horas de exposición del E.M.A. Sin embargo, se puede notar que en el caso de p62, se aprecia la ligera disminución a las 24 horas de exposición obtenida en los blots.

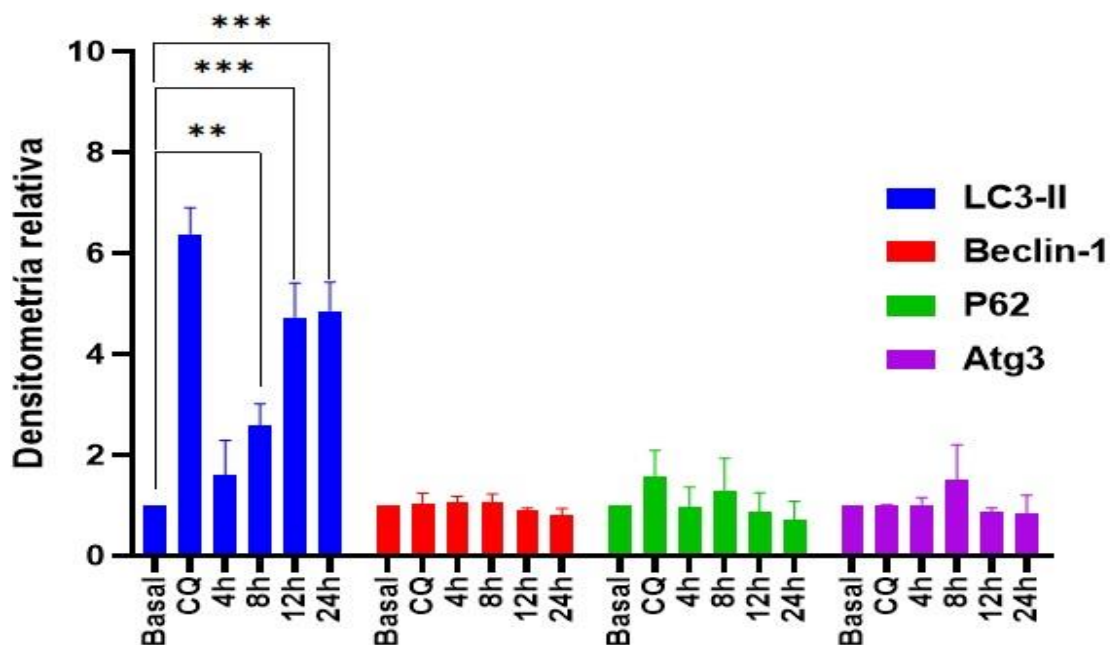


Figura 15 Densitometría relativa de la detección de proteínas seleccionadas de la vía de señalización de autofagia en la línea celular HCT116 expuestas al E.M.A. Los valores de P fueron determinados por test de ANOVA, *** $P \leq 0.0001$, ** $P \leq 0.0005$.

6.4 El extracto reduce el crecimiento de tumores *in vivo*.

Con el objetivo de determinar el efecto del E.M.A. sobre condiciones *in vivo*, se realizó un modelo murino de xenotrasplante para evaluar el efecto antitumoral en un organismo, el cual revisado y aceptado por el comité de bioética del CICUAL INCMNSZ, No. CINVA#1932-19-21-1.



















Dosis	N. De ratones	N. De muertos		
175 mg/kg	3			
55 mg/kg	3			
17.5 mg/kg	3			
10 mg/kg	3			
5.5 mg/kg	3			
1.75 mg/kg	3			

Figura 16 Dosis letal Media (DL50) del E.M.A sobre los ratones $Fox1^{nu}/Fox1^{nu}$. Las cruces rojas indican aquellos ejemplares que fallecieron por la administración del extracto

Para esto, se determinó en primera instancia la toxicidad del E.M.A en ratones de la cepa $Fox1^{nu}/Fox1^{nu}$, para poder delimitar los tratamientos experimentales del extracto. En la figura 16 se describen las dosis utilizadas para la obtención de la dosis letal media. A partir de la dosis de 5.5 kg/mg todos los animales sobrevivieron. Usando la fórmula de Chinedu y colaboradores del 2013, se determinó que la dosis letal media del E.M.A de 7.75 mg/kg.

Obtenida la dosis letal media, se definieron los tratamientos, 7.75 kg/mg como dosis alta, con una administración semanal, y 3.5 mg/kg como dosis media, con un grupo experimental de una administración por semana. Posteriormente, ya establecidos

los grupos experimentales, se procedió con el modelo de xenotrasplante. Se inocularon 1.5 millones de células HCT116 resuspendidas en 200 microlitros de medio RPMI de manera subdérmica en el flanco derecho de los ratones.

El volumen tumoral fue medido cada segundo día y una vez que alcanzaron un volumen de entre 25 y 30 mm³, empezaron a ser tratados con el E.M.A disuelto en solución inyectable.

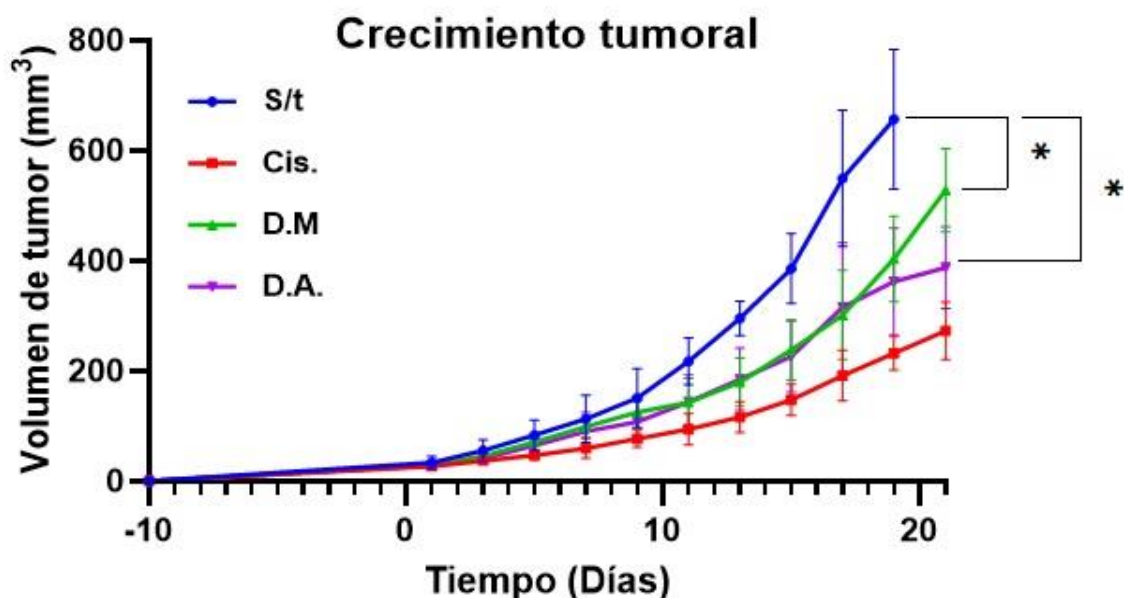


Figura 17 Volumen del crecimiento tumoral en el modelo de xenotrasplante de la línea celular HCT116. S/t sin tratamiento, Cis. Cis-platino 2mg/kg, D.M Dosis media 3.5 mg/kg, D.A Dosis alta 7.75 mg/kg. Los valores de P fueron determinados por test de ANOVA de dos factores *P≤0.04

En la figura 17 se pueden observar las progresiones de crecimiento para los diferentes grupos experimentales. Se aprecia que las dos dosis administradas de E.M.A disminuyeron de manera significativa el volumen de los tumores al cabo de los 21 días en comparación con el grupo que no tuvo ningún tratamiento, siendo administración semanal de la dosis alta, el grupo en donde hubo menor crecimiento, por debajo de los tratados con la dosis media una vez por semana. Sin embargo, el grupo tratado con Cis-platino (medicamento de referencia), fue el que presentó la mayor inhibición de crecimiento.

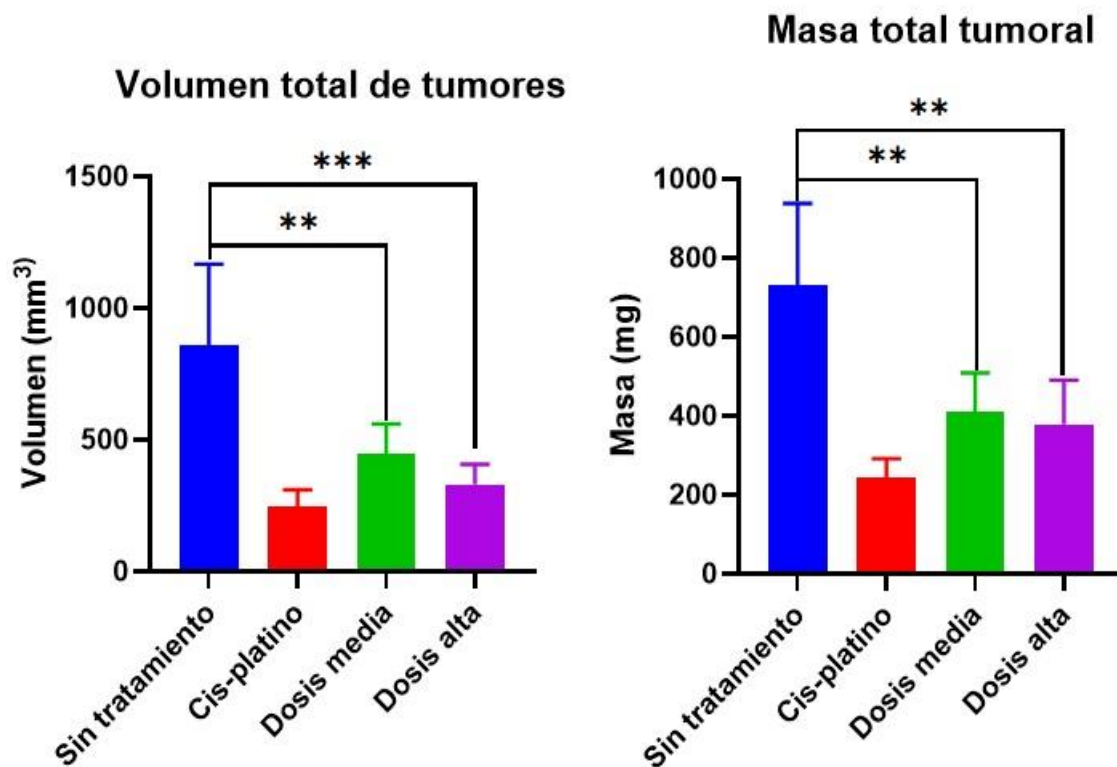


Figura 18 Volumen y masa total final de los tumores extirpadas de los ratones al finalizar el tratamiento. Los valores de P fueron determinados por test de ANOVA, *** $P \leq 0.0006$, ** $P \leq 0.0045$.

De igual manera ese patrón observado en los crecimientos de los tumores se aprecia en los volúmenes y pesos finales de éstos (Figura 18), tras ser extirpados de los ratones. Se observan diferencias significativas entre el grupo sin tratamiento y los grupos tratados con E.M.A, siendo el grupo con una dosis alta de administración, semanal, en donde hubo una menor masa tumoral, tanto en volumen como en peso. Cabe resaltar que no se observó ningún signo de toxicidad del extracto sobre los ratones, ni pérdida de peso.

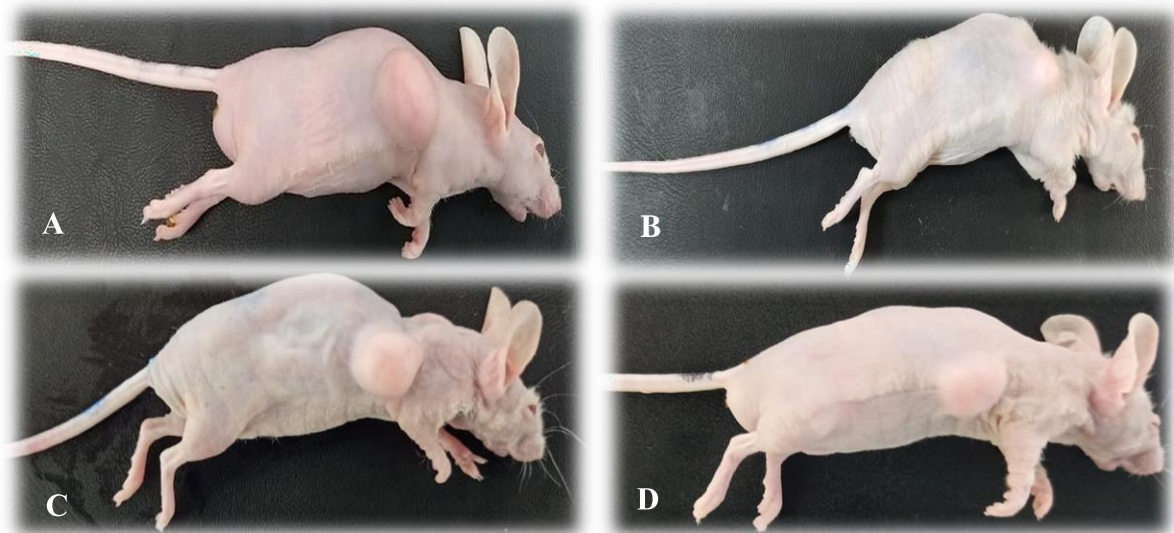


Figura 19 Imágenes representativas de los grupos experimentales de ratones del ensayo de xenotrasplante. A) Sin tratamiento, B) Cis-Platino, C) Dosis Media, D) Dosis alta.

En la figura 19 se pueden apreciar a ratones representativos de los grupos experimentales del xenotrasplante. En las fotografías se observa la reducción de crecimiento en la masa tumoral en aquellos organismos tratados con el E.M.A en sus diferentes concentraciones en comparación con el grupo que no tuvo ningún tratamiento. No obstante, el grupo que presentó mayor reducción fue en donde se administró Cis-Platino.

7. Discusión.

La pérdida de señales de inducción de muerte celular es una de las características distintivas en el desarrollo del cáncer colorrectal (Mármol et al., 2017, Kolligs et al., 2016, Kupiers et al., 2015,). Diversas investigaciones realizadas se han enfocado a la búsqueda de productos naturales obtenidos de plantas de la familia Annonaceae como alternativas para el tratamiento del cáncer colorrectal debido a la eficiencia de un 50% los tratamientos actuales (Argilés et al., 2020, Syed et al., 2019, Haykal et al., 2019, Pumiputavon et al., 2019, Elhawari et al., 2013). En este proyecto se evaluó la capacidad de un extracto metanólico de *Annona macrophyllata* de inhibir la progresión tumoral de una línea celular de CCR *in vitro* e *in vivo*, al estimular el proceso de autofagia e inducir muerte celular.

Las plantas pertenecientes a la familia Annonaceae se caracterizan por contar con la presencia de Acetogeninas (metabolitos especializados derivados del metabolismo secundario de la planta), a las cuales se les han atribuido propiedades anti proliferativas sobre diferentes líneas celulares de cáncer (Serijeyagowri et al., 2019, Mangal et al., 2016, Sun et al., 2014, McLaughlin, 2008, Oberlies et al., 1995). En el presente trabajo utilizamos al metanol para extracción de acetogeninas, debido a su alto rendimiento y garantizar la presencia de acetogeninas (Aguilar-Hernández et al., 2022, Krisanti, et al., 2021, Castro et al., 2010). En la cromatografía de capa fina realizada del E.M.A, se muestra contenido de Acetogeninas o compuestos con estructura química similar.

El extracto presentó actividad anti proliferativa, teniendo una concentración inhibitoria media de 28.66 µg/mL y 14.47 µg/mL a las 24 y 48 horas de exposición respectivamente, demostrando una inhibición dosis-tiempo dependiente, lo cual contrasta con lo obtenido por Elhawary y colaboradores en 2013, quienes reportaron la capacidad antitumoral de extracto etanólico de 4 diferentes especies de annonas,

sobre 3 líneas celulares de carcinoma de mama, carcinoma de hígado y carcinoma de colon respectivamente, obteniendo valores de IC50 entre 8 y 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tras 24 horas de exposición. De igual manera, Anatole et al., en el 2014, reportaron la actividad anti proliferativa del extracto etanólico de las raíces y hojas *Annona muricata*, sobre una línea celular de leucemia, causando inhibición con una IC50 con un rango de 9 a 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 48 horas de exposición, lo cual es similar a la concentración obtenida con el E.M.A. En ambas investigaciones, los autores atribuyen esta inhibición a la inducción de muerte celular por apoptosis, principalmente por la actividad que presentan las Acetogeninas sobre la cadena de transporte de electrones a nivel mitocondrial, sin embargo, estudios recientes plantean la capacidad de las acetogeninas de promover el proceso de autofagia y conducir al arresto y/o muerte celular (Han et al., 2015, Liu et al., 2012.).

La autofagia es un proceso celular inducido principalmente por falta de nutrientes a disponibilidad de la célula, regulado por diversas proteínas que se encargan de la síntesis *de novo* de vesículas intracelulares (autofagosomas) que secuestran material citoplasmático para su degradación y/o reciclaje lisosomal (Parzych y Klionsky, 2014, Yang y Klionsky, 2010, Itakura y Mizushima 2010). La LC3-II (forma conjugada con PE de LC3) juega un papel central para el cierre y maduración del autofagolisosoma y es considerado como un marcador de actividad de autofagia (Tanida, 2011, Kabeya et al., 2000). Adicionalmente se ha descrito que p62 está involucrado en el transporte de las biomoléculas hacia los autofagosomas de una manera similar a la ubiquitinización, por lo que se le considera como un reportero de actividad autofágica cuando ésta se encuentra en menor cantidad en el citoplasma (Liu et al., 2016, Korolchuk et al., 2009).

En este trabajo, se analizó un perfil de proteínas que forman parte de la cascada de señalización para el desarrollo de la autofagia en la línea celular HCT116 de CCR, y se observó, que a partir de 8 horas de exposición frente al E.M.A, aumenta la detección de LC3-II de manera considerable, así como una apreciable disminución

para p62 a las 24 horas, lo cual indica un aumento de actividad de autofagia a pesar de que no se observan cambios en la detección de las demás proteínas evaluadas.

No se encontró literatura en donde se reportara la capacidad de inducir autofagia de extractos de ejemplares de la familia de Annonaceae, sin embargo, el equipo de investigación de Liu, en 2012, sintetizó una molécula mimética de Acetogeninas denominada AA005, que presentó la facultad de inhibir la actividad de mTOR, y en consecuencia causar autofagia en células de CCR, determinado por un aumento en la detección de LC3-II por western blot, lo cual concuerda con el resultado obtenido con la misma proteína en el presente trabajo. De igual manera Han y colaboradores en 2015, mostraron que AA005 induce muerte celular por apoptosis en CCR, actividad previamente establecida por varios autores con acetogeninas convencionales (Jacob-Herrera et al., 2019, Gaviria-Calle et al., 2018, Mangal et al., 2016, Sun et al., 2014 Abe et al., 2008, Bermejo et al., 2005.), por lo que posiblemente el E.M.A tenga capacidad anti proliferativa al inducir muerte celular asociada a autofagia y apoptosis.

El cáncer es una enfermedad compleja, en la que se ven involucradas interacciones entre células transformadas con mutaciones oncogénicas y constituyentes celulares aledaños, por lo que, en cultivos celulares, procesos tumorigénicos, tales como angiogénesis, metástasis o desregulación energética son imposibles evaluar (Frese y Tuveson, 2007). No obstante, el desarrollo de modelos de xenotrasplante permitió la valoración *in vivo* de tejido tumoral y líneas celulares en ratones inmunocomprometidos (Kendall et al., 2006).

Por tales motivos, se realizó un modelo *in vivo* de xenotrasplante con la línea celular de CCR de HCT116 en ratones, donde se observó que el crecimiento de la masa tumoral disminuyó en aquellos grupos experimentales tratados con el E.M.A, con un comportamiento dosis dependiente, siendo la concentración de 7.75 mg/kg la que tuvo mayor reducción del tamaño de los tumores en comparación de los ejemplares del grupo sin tratamiento durante los 21 días de duración del modelo. Sin embargo,

el grupo experimental de los organismos que fueron tratados con un compuesto quimioterapéutico, el cis-platino fue el que presentó la mayor inhibición de crecimiento de la masa tumoral. Este patrón se mantuvo en los resultados adquiridos en cuanto al peso y el volumen finales de los tumores extirpados de los organismos una vez sacrificados tras el término del modelo. Siendo el grupo tratado con cis-platino los que presentaron el menor crecimiento y volumen, seguido de la dosis alta y la media de tratamiento con E.M.A.

Hamizah y colegas, en el 2012, probaron el efecto antitumoral del extracto etanólico de *A. muricata*, sobre un modelo in vivo de cáncer de piel, demostrando su capacidad quimio-protectora e inhibitoria al evitar la formación y el crecimiento de tumores de manera significativa en los grupos tratados con su extracto desde una concentración de 30mg/kg, aplicado de manera tópica. Los autores atribuyen el efecto principalmente a la presencia de acetogeninas en el extracto, incluyendo a la annonacina, la cual se ha reportado que se encuentra presente en diversas especies de anonas (Durán et al., 2021, Jacobo-Herrera et al., 2019), y que aparentemente se encuentra en el E.M.A como se observa en los resultados obtenidos en la CCF realizada en el presente trabajo. Así mismo, en una investigación realizada por Dai y colaboradores en 2011, se demostró la capacidad inhibitoria de un extracto del fruto de *A. muricata* sobre el crecimiento tumoral de un modelo de xenotrasplante de cáncer de mama, reduciendo el peso tumoral en un 32% durante 5 semanas de tratamiento. Resultados que contrastan con la inhibición del crecimiento de la masa de tumoral por parte del E.M.A en el trabajo aquí expuesto.

También, nuevamente con un extracto de *A. muricata*, Torres y colaboradores en 2012, obtuvieron que la aplicación de éste, sobre un modelo in vivo de cáncer de páncreas, disminuía su capacidad metastásica al inhibir el metabolismo celular.

En conjunto, los autores antes mencionados, concuerdan en el posible mecanismo de acción sugerido por el cual se esté presentando tal inhibición de crecimiento

tumoral *in vivo*. Donde debido a la citotoxicidad que presentan los compuestos encontrados en las Annonas, incluyendo a las acetogeninas, actúa inhibiendo diversas vías de señalización involucradas en la regulación de metabolismo, metástasis, arresto de ciclo celular e inducción de muerte celular. Propiedades biológicas que probablemente tenga el E.M.A., y, que, debido a los resultados obtenidos, podría estar dándose el caso de inducción de muerte celular relacionada asociada a la autofagia.

Con base en lo publicado por Denton y Kumar, en 2019, la manera en que la autofagia se relaciona con la muerte celular puede ser por muerte celular asociada, donde la inducción de la autofagia coincide con la inducción de muerte por apoptosis, sin tener un rol activo sobre esta; muerte celular mediada, cuando la inducción de autofagia desencadena a la apoptosis, y muerte celular dependiente de autofagia, la cual que se da de manera independiente a la acción de la apoptosis necrosis. Sin embargo, a pesar del vasto entendimiento existente con respecto a la regulación del proceso de autofagia y su involucramiento en diferentes procesos intracelulares, el rol y la mecánica molecular envuelta en la muerte celular dependiente de autofagia han sido pobremente determinados.

Actualmente, el papel que juega o podría jugar la autofagia dentro del desarrollo del cáncer, es un tema de discusión constante, debido a los roles contradictorios en la iniciación y progresión tumoral demostrados en diversas investigaciones.

Se ha reportado que la inactivación de proteínas involucradas en el proceso autofágico como Atg17, Atg5 y Atg7, inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* de cáncer de mama y previene la progresión maligna de carcinoma de hígado en hepatoma respectivamente (Wei et al., 2011, Takamura et al., 2011), lo que sugiere que la autofagia puede estar promoviendo la progresión tumoral.

De igual manera, se ha descrito que las células cancerígenas se apoyan en la autofagia en diversas situaciones para poder subsistir. En condiciones de hipoxia,

la autofagia es sobre estimulada para que las células tumorales puedan sobrevivir (Degenhardt et al., 2006), y se ha observado que la autofagia funciona como un mecanismo de resistencia frente a distintas terapias anticancerígenas (Amaravadi, 2009, Xie et al., 2013, Dorr, et al., 2013) como lo reportado por Bary y colaboradores (2012), los altos niveles de autofagia basal para sobrevivir a la inhibición de mTOR sobre células de carcinoma renal.

Sin embargo, también existen diferentes estudios que apoyan a el rol de la autofagia como un proceso supresor de tumores. Se ha reportado que la inhibición alélica en ratones de Beclina-1, reduce considerablemente la actividad autofágica, y, en consecuencia, los hace más susceptibles al desarrollo de tumores espontáneos, tales como linfomas, carcinomas de pulmón, carcinomas hepatocelulares y lesiones mamarias precancerosas (Lin y Baehrecke, 2015). De igual manera se ha demostrado que el gen de Beclina-1 se encontraba suprimido en un rango de 40% a 75% de líneas celulares tumorales de próstata, mama y ovario (Choi et al., 2013), y se ha corroborado que la deficiencia en autofagia ocasiona estrés oxidativo, lo cual activa respuesta de daño al DNA e inestabilidad genómica causa bien documentada de iniciación y progresión del cáncer (White, 2015).

A la fecha no se ha definido el papel de la autofagia en el cáncer, y se ha planteado que puede tener efecto supresor o promotor tumoral dependiendo del momento o la etapa de la progresión tumoral que esté ocurriendo. En los resultados obtenidos en esta investigación, encontramos que el E.M.A es capaz de inhibir la proliferación en la línea celular de cáncer de colon HCT116. Probablemente, esta inhibición de proliferación sea atribuible a la capacidad de inducción de autofagia que igualmente presentó el extracto, ocasionando muerte celular dependiente de autofagia o asociada al estar ocurriendo a la par que se da el mecanismo de apoptosis o que ésta misma este induciendo a la apoptosis.

Así mismo el extracto demostró tener la capacidad de inhibir el crecimiento de masa tumoral en un modelo in vivo, donde posiblemente se esté presentando un efecto, sin embargo, sería recomendable evaluar si la apoptosis se está llevando a cabo

tanto *in vitro* como *in vivo* tras la exposición o administración del E.M.A, lo cual tendría concordancia con las publicaciones enfocadas a la toxicidad de los compuestos presentes en las especies de la familia Annonaceae, principalmente las acetogeninas. No obstante, dilucidar el perfil químico del resto de compuestos del extracto con posible actividad biológica sobre el cáncer sería adecuado.

Este trabajo sienta las bases de la propiedad antitumoral del extracto metanólico *A. muricata*, especie poco reportada en la literatura científica, teniendo potencial para nuevas investigaciones en la búsqueda de alternativas más eficientes al cáncer colorrectal.

8. Conclusiones

- La cromatografía de capa fina junto con antecedentes bibliográficos sugiere la presencia de acetogeninas en el extracto metanólico de semilla *Annona macrophyllata*.
- Se determinó que el E.M.A inhibe la proliferación celular sobre la línea de cáncer colorrectal HCT116.
- Se comprobó que el extracto induce el proceso de autofagia in vitro al aumentar considerablemente la detección de la proteína marcadora de autofagia LC3-II y reducir la de P62.
- El extracto reduce el crecimiento de la masa tumoral en un modelo in vivo de xenotrasplante con la línea celular HCT116

9. Referencias bibliográficas.

- . Bray, K., Mathew, R., Lau A., Kamphorst, J.J., Fan, J., Chen, J., Chen, H.Y., Ghavami, A. 2012. Autophagy suppresses RIP kinasedependent necrosis enabling survival to mTOR inhibition. PLoS One.7(7).
- Abe M, Kubo A, Yamamoto S, Hatoh Y, Murai M, et al. 2008. Dynamic function of the spacer region of acetogenins in the inhibition of bovine mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). Biochemistry (Mosc). 47(23):6260- 6266.
- Aguilar-Hernández, G., Zepeda-Vallejo, L.G., García-Magaña, M.L., López-García, U.M., Aguilera-Aguirre, S., Montalvo-González, E. 2022. Contenido de acetogeninas a partir de semillas del fruto de guanábana (*Annona muricata* L.): Evaluación de diferentes condiciones de extracción. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. 24(2):12-19.
- Ahnen, DJ. 2011. The American College of Gastroenterology Emily Couric Lecture- the adenoma-carcinoma sequence revisited: ¿has the era of genetic tailoring finally arrived? Am J Gastroenterol. 106:190-8
- Alali F.Q., Liu X.X., McLaughlin J.L. 1999. Annonaceous acetogenins: recent progress. Jounazof Natural Products. 62(3):504-540.
- Alonso-Castro, A. J., Villarreal, M. L., Salazar-Olivo, L. A., Gómez-Sánchez, M., Domínguez, F., García-Carrancá, A. 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. J. Ethnopharmacol. 133, 945-972.
- Amaravadi R. 2009. Autophagy can contribute to cell death when combining targeted therapy. Cancer Biol Ther. 8(21):130-133.
- American Cancer Society. 2018. Tratamiento del cáncer de colon según la etapa. Tomado de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/tratamiento/por-etapas-colon.html>.
- Anaya-Esparza, L.M., García-Magaña, M.L., Dominguez-ávila, J.A., Yahia, M.E., et al. 2020. Annonas: Underutilized species as a potential source of bioactive compounds. Food research international. 138.

- Argilés, G., Tabernero, Labianca, R., Hochhauser, D., Salazar, R., Iveson, T., et al. 2020. Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow up. *Annals of Oncology*. 31(10):1291-1305.
- Barbalho, M.S., Goulart, A.R., Vasques, M.F., Soares, S.M., et al. 2012. *Annona* sp: Plants with Multiple Applications as Alternative Medicine - A Review, *Current Bioactive Compounds* 8(3).
- Bazan, M., Gonzáles, N., Delgado, L. 2004. Xenotransplante: Estado actual, limitantes y expectativas. *Revista Cubana de Cirugía* 43(2)
- Bermejo, A., Figadère, B., Zafra-Polo, M.-C., Barrachina, I., Estornell, E., Cortes, D., 2005. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat. Prod. Rep.* 22, 269-303.
- Bhardwaj, R., Pareek, S., Sagar, N.A., Vyas, N. 2019. Bioactive Compounds of *Annona*. En: Murthy, H., Bapat, V. (eds) *Bioactive Compounds in Underutilized Fruits and Nuts*. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham.
- Boland, C.R, Goel A. 2010. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 138:2073-8
- Casse, C. 2018. Molecular mechanisms of *Annona muricata* anti-proliferative/anti-cancer properties. *Biomedical Genetics and Genomics*. 4(1):1-4.
- Castro, L., Alzate, M., Guerrero, E. 2010. Estudio preliminar de la bioactividad de extractos de semillas de *Annona cherimolia* de la familia Annonaceae. *Scientia et Technica*. 1(44):5.
- Choi, A.M., Ryter, S.W., Levine, B. 2013. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med*. 368(7):651-662
- Colussi, D., Brandi, G., Bazzoli, F., Ricciardiello, L. 2013. Molecular Pathways Involved in Colorectal Cancer: Implications for Disease Behavior and Prevention. *Int. J. Mol. Sci.* 14:16365-16385.
- Coria-Téllez, A.V., Montalvo-González, E., Yahia, E.M., Obledo-Vázquez, E.N. 2018 *Annona muricata*: A comprehensive review of its traditional

medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*. 11(5):662-691.

- Costas, M.A., Rubio, M.F. 2017. Autofagia, una estrategia de supervivencia celular. *Medicina de Buenos Aires*. 77:4.
- Cruz-Mendoza, Y.A., Hernández-Agüero M, Quiroga-Meriño LE, Estrada-Brizuela Y, Gómez-Agüero E. Características clínicas y epidemiológicas de pacientes no geriátricos con cáncer de colon. *Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta*. 2021; 46(1).
- Dai, Y., Hogan, S., Schmelz, E.M., Ju, Y.H., Canning, C., Zhou, K. 2011. Selective Growth Inhibition of Human Breast Cancer Cells by Graviola Fruit Extract In Vitro and In Vivo Involving Downregulation of EGFR Expression. *Nutrition and Cancer*. 63(5):795-801.
- Deep, G., Kumar R, Jain AK, et al. 2016 Graviola inhibits hypoxia-induced NADPH oxidase activity in prostate cancer cells reducing their proliferation and clonogenicity. *Sci Rep* 6: 23135
- Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gélinas, C., et al. 2006 Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*.10(1):51-64.
- Denton, D., Kumar, S. 2019. Autophagy-dependent cell death. *Cell Death and Differentiation*. 26:605-616.
- Dias, A., Urban, S. y Roessner, U. 2012. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. 2(2):303-336.
- Dorr J.R., et al. 2013 Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature*.501(7467):421-425.
- Elhawary, S.S., Tantawy, E.E., Rabeh, M.A., Fawaz, N.E. 2013. DNA Fingerprinting, Chemical Composition, Antitumor and Antimicrobial Activities of the Essential Oils and Extractives of four *Annona* Species from Egypt. *Journal of Natural Sciences Research*. 3(13):59-68
- Escobedo-López, D., Campos-Rojas, E., Rubén Rodríguez-Núñez, J. et al. 2019. Priority areas to collect germplasm of *Annona* (Annonaceae) in Mexico

based on diversity and species richness indices. *Genet Resour Crop Evol* 66: 401-413

- Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D.M., Piñeros, M., Znaor, A., Bray, F. 2021. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*: 1-12.
- Frese, K.K., Tuvesosn, D.A. 2007. Maximizing mouse cancer models .*Nature Reviews: Cancer*. 7:645-658.
- Gaviria-Calle MM, Posada-Arias S, Mira-Hernández J. 2018. Acetogeninas, alternativa en el tratamiento de cáncer en caninos. *Rev. CES Med. Zootec.* 13(2): 157-172.
- Glick, D., Barth, S. and Macleod, K.F. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.*, 221: 3-12
- Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 71: 209- 249.
- Gonzalez, R.S., Washington, K., Shi, C. 2017. Current applications of molecular pathology in colorectal carcinoma. *Applied Cancer Research.* 37:13.
- Guraya, S. Y. Association of type 2 diabetes mellitus and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis and systematic review. *World J. Gastroenterol.* 21, 6026-6031 (2015).
- Han, B., Wang, T.D., Shen, S.M., Yu, Y., Mao, C., Yao, Z.J., Wang, L.S., 2015. Annonaceous acetogenin mimic AA005 induces cancer cell death via apoptosis inducing factor through a caspase-3-independent mechanism. *BMC Cancer.* 15:139.
- Hanahan, D. 2022. Hallmarks of Cancer: New dimensions. *Cancer discoverey* 12: 31-46.
- Harvey, A.L. 2008. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today.* 13: 894-901.

- Hassanpour, H., Dehgani, M. 2017. Review of cancer from the perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*. 4: 127-129.
- Haykal, T., Nasr, P., Hodroj, M.H., Taleb, R.I., Sarkis, R., et al. 2019. *Annona cherimola*, Seed Extract Activates Extrinsic and Intrinsic Apoptotic Pathways in Leukemic Cells. *Toxins*. 11(9):506.
- He C and Klionsky DJ. 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 43: 67- 93.
- Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan J-L, Oshiro N, and Mizushima N. 2009. Nutrientdependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13- FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* 20: 1981-1991.
- Hyeong-Joon, J., Jin-Hee, W., Hak-Yoon, L., Ki Jae, P., Hong-Jo, C. 2011. Adjuvant Chemotherapy Using the FOLFOX Regimen in Colon Cancer. *Journal of the Korean Society of Coloproctology* 27(3):140-146
- Itakura E and Mizushima N. 2010. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy*. 6:764-776.
- Jacobo-Herrera N, Pérez-Plasencia C, Castro-Torres VA, Martínez-Vázquez M, González-Esquinca AR, Zentella-Dehesa A. 2019. Selective Acetogenins and Their Potential as Anticancer Agents. *Front Pharmacol*. 10:783.
- Jeslig, A.M, Qvist, N., Brusgaard, K., Nielsen, C.B., Hansen, T.P., Ousager, L.B. 2014. Hamartomatous polyposis syndromes: A review. *Orphanet Journal of Rare diseases*. 9:101.
- Jess, T. et al. Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years. *Gastroenterology* 143, 375-381.e1 (2012)
- Julián-Loeza, A.P., Santos-Sánchez, N.M., Valadez-Blanco, R., Sánchez-Guzmán, B.S., Salas-Coronado, R. 2011. Chemical composition, color, and antioxidant activity of three varieties of *Annona diversifolia* Safford fruits. *Industrial Crops and Products*. 34 (2):1262-1268.

- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako T., Noda T, Kominami, E., Ohsumi, Y., Yoshimori, T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19:5720-28.
- Kendall, S.D., Adam, S.J., Counter, C.M. 2006. Genetically engineered human cancer models utilizing mammalian transgene expression. *Cell Cycle* 5:1074-1079.
- Kolligs, F.T. Diagnostics and Epidemiology of Colorectal Cancer. *Visc. Med.* 2016, 32, 158-164
- Korolchuk, V.I., Mansilla, A., Menzies, F.M., Rubinsztein, D.C. 2009 Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Molecular Cell.* 33:517-527.
- Krisanti, E., Fauzia, F., Mulia, K. 2021. Chitosan Microparticles for In vitro Release of Acetogenins Extracted from *Annona Muricata* L. Leaves. *AIP Conference Proceedings* 2370, 020011.
- Kuma A, Mizushima N, Ishihara N, and Ohsumi Y. 2002. Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem* 277: 18619- 18625.
- Kupiers, J.E., Grady, W.M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J.J., Boelens, P.G., Van de Velde, C.J., Watanabe, T. 2015. Colorectal cancer. *Nature reviews.* 1: 1-25.
- Liaw, CC., Liou, JR., Wu, TY., Chang, FR., Wu, YC. (2016). Acetogenins from Annonaceae. In: Kinghorn, A., Falk, H., Gibbons, S., Kobayashi, J. (eds) *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 101. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, vol 101.
- Lin, L., Baehrecke, E.H. 2015. Autophagy, cell death, and cancer, *Molecular & Cellular Oncology*, 2,(3): e985913.
- Liu, W.E., Ye, L., Huang, W.F., Guo, L.J., Xu, Z.G., Wu, H.L., Yang, C., Liu, H.F. 2016. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome

system upon ubiquitinated protein degradation. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 21:29.

- Malumbres, M.; Barbacid, M. 2003. RAS oncogenes: The first 30 years. *Nat. Rev. Cancer*. 3:459-465.
- Mangal, M., Mhod, I.K., Subhash, M.A.2016. Acetogenins as Potencial Anticancer Agents. *Anticancer agents in Medicinal Chemistry*. 16(2):138-159.
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., & Rodriguez Yoldi, M. J. (2017). Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 197.
- McLaughlin, J. L. 2008. Paw Paw and Cancer: Annonaceous Acetogenins from Discovery to Commercial Products. *Journal of Natural Products*, 71(7): 1311–1321.
- McLaughlin, J.L., 2008. Paw Paw and cancer: annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. *J. Nat. Prod.* 71, 1311-1321.
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 27:107-32.
- Mizushima, N.; Ohsumi, Y.; Yoshimori, T. 2002. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.* 27:421-429
- Newman, J., Cragg, M. 2020. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*. 83(3): 770-803.
- Nielsen, M., Morreau, H., Vasen, H.F.A., Hes, F.J. 2011. MUYTH associated polyposis (MAP). *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 79:1-16.
- Oberlies, N.H., Jones, J.L., Corbett, T.H., Fotopoulos, S.S., McLaughlin, J.L. 1995. Tumor cell growth inhibition by several Annonaceous acetogenins in an in vitro disk diffusion assay. *Cancer Letters*. 96(1):55-62.
- Ogino, S.; Odze, R.D.; Kawasaki, T.; Brahmandam, M.; Kirkner, G.J.; Laird, P.W.; Loda, M.; Fuchs, C.S. 2006. Correlation of pathologic features with CpG island methylator phenotype (CIMP) by quantitative DNA methylation analysis in colorectal carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 30, 1175-1183

- Parzych, K.R., Klionsky, D.J. 2014 An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxidants and Redox Signaling*. 20(3):460-473.
- Pieme, A.P., Guru, S.K., Sylbiane, D.M., Moukette, B.M., et al. 2014. Antiproliferative activity and induction of apoptosis by *Annona muricata* (Annonaceae) extract on human cancer cells. *Complementary and Alternative Medicine*. 14:516
- Pumiputavon, K., Chaowasku, T., Saenjum, C., Osathanunkul, M., Wungsintaweeikul, B., Chawansuntati, K., Wipasa, J. 2019. Cytotoxic and cytostatic effects of four Annonaceae plants on human cancer cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 55(9):723-732.
- Rusan N.M., Peifer, M. 2008. Original CIN: reviewing roles for APC in chromosome instability. *J Cell Biol* 181: 719-726
- Saha, S., Panigrahi, D.P., Patil, S., Bhutia S.k. 2018. Autophagy in health and disease: A comprehensive review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 104:485-495.
- Sawicki, T.; Ruszkowska, M.; Danielewicz, A.; Niedźwiedzka, E.; Arłukowicz, T.; Przybyłowicz, K.E. A 2021. Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers* ., 13, 2025
- Schile-Guzmán, M.A., García-Carrancá, A., González-Esquinca, A.R. 2009. In Vitro and In Vivo Antiproliferative Activity of Laherradurin and Cherimolin-2 of *Annona diversifolia* Saff. *Phytotherapy Research*. 23:1128-1133.
- Schneider, E.C., Malin, J.L., Kahn, L.K., Ko, C.Y., Adams, J., Epstein, A.M. 2007. Surviving colorectal cancer: patient-reported symptoms 4 years after diagnosis. *Cancer*. 110:2075-2082.
- Sehgal, R.; Sheahan, K.; O'Connell, P.R.; Hanly, A.M.; Martin, S.T.; Winter, D.C. 2014 Lynch Syndrome: An Updated Review. *Genes* 5:497-507.
- Serijeyagowri, M.P., Shanmugaraj, P., Manoharan, J.P., Vidyakakshmi, S. 2021. A network pharmacological approach to reveal the multidrug resistance

reversal and associated mechanisms of acetogenins against colorectal cancer. *Journal of Biomolecular Structure and dynamics*.

- Sinicrope, F.A.; Sargent, D.J. 2012. Molecular pathways: Microsatellite instability in colorectal cancer, prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin. Cancer Res.* 18, 1506-1512.
- Sun, S., Liu, J., Kadouh, H. Sun, X., Zhou, K. 2014. Three new anti-proliferative Annonaceous acetogenins with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona muricata*). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 24(12):2773-2776.
- Sung, H, Ferlay, J, Siegel, RL, Laversanne, M, Soerjomataram, I, Jemal, A, Bray, F. 2021.
- Syed Najmuddin, S.U.F., Romli, M.F., Hamid, M. *et al.* 2016. Anti-cancer effect of *Annona Muricata* Linn Leaves Crude Extract (AMCE) on breast cancer cell line. *BMC Complement Altern Med* 16, 311.
- Tadashi, I., Yamakawa, T., Hirano, T., Yokoyama, Y., Hayashi, Y., Hirayama, D., Wagatsuma, K., Itoi, T., Nakase, H. 2020. Autophagy and Autophagy-Related diseases: A Review. *Int. J. Mol. Sciences*. 21:8974.
- Takamura, A., Komatsu, M., Hará, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S., Eishi, Y., Hino, O., Tanaka, K., Mizushima, N. 2011. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev*. 25:795-800
- Tanida, I. 2011. Autophagy basics. *Microbiology and Immunology*. 55:1-11-
- Torres, M.P., Satyanarayana, R., Purhoit, V., Pandey, P., Joshi, S., Moore, E.D., et al. 2012. Graviola: A novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo through altering cell metabolism. *Cancer Letters*. 321(1):29-40
- Tundis, R., Xiao, J., Loizzo, M.R. 2017. Annina species (Annonaceae): a rich source of potential antitumor agents?. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 40:1-7-
- Wei, H., Wei, S., Gan, B., Peng, X., Zou, W., Guan, J.L. 2011. Suppression of autophagy by FIP200 deletion inhibits mammary tumorigenesis. *Genes Dev*; 25:1510- 1527.
- White, E. 2015. The role of autophagy in Cancer. *J Clin Invest*. 125(1):42-46.

- X.H. Liang, S. Jackson, M. Seaman, K. Brown, B. Kempkes, H. Hibshoosh, et al. 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1, Nature 402:672-676.
- Xie, X., White, E.P., Mehnert, J.M. 2013. Coordinate autophagy and mTOR pathway inhibition enhances cell death in melanoma. PLoS One.8(1).
- Yun, W.Y., Lee, S.H. 2018. The roles of Autophagy in Cancer. Int. J. Mol. Sci.19:3466.

¿Final? No, el viaje no

termina aquí.....