



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OPCIÓN INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

TESIS

**“Citotoxicidad inducida por un extracto lipídico de la semilla de aguacate
nativo mexicano (*Persea americana var. drymifolia*) en células
D-17 de osteosarcoma canino”**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

QUE PRESENTA:

M.C. SALVADOR PADILLA ARELLANES

DIRECTOR:

DR. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

CO-DIRECTOR:

DR. JOEL EDMUNDO LÓPEZ MEZA

MORELIA, MICHOACÁN, JUNIO DE 2022



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas y el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la dirección del Dr. Rafael Salgado Garciglia y la co-dirección del Dr. Joel Edmundo López Meza. Para su realización se contó con el apoyo de la beca con goce de sueldo otorgada por la UMSNH, los proyectos CIC 2.10, CIC 14.1 y CIC 14.5 de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH y proyecto de CONACyT (CB-2016-287210).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por el apoyo otorgado para la realización de mis estudios de doctorado.

También agradezco profundamente todo el apoyo otorgado por mis asesores, el Doctor Joel y el Doctor Rafael, ya que sin la confianza que me tuvieron, no hubiera podido realizar mis estudios de doctorado. Merece mención especial la Doctora Alejandra Ochoa, que siempre estuvo apoyándome y aportando información valiosa en mis avances y culminación de mis estudios. También agradezco a mi comité de sinodales, el Doctor Alfredo y el Doctor Jorge, por todas sus aportaciones para que este trabajo saliera lo mejor posible.

Agradezco a la Doctora Alejandra Hernández del laboratorio de Biotecnología Vegetal del IIQB-UMSNH, por su apoyo en mi estancia en el laboratorio y todos los compañeros con los que me tocó compartir espacios y conocimientos.

Un agradecimiento especial a la Dra. Marisol por su amistad y apoyo en mis estudios, sabes que te estimo mucho y eres un ejemplo para mí y muchos alumnos del posgrado. También quiero agradecer a mis compañeros del M3 por aguantarme, pero sobre todo por sus aportes y enseñanzas en este largo camino.

Agradezco de manera especial a mi amada esposa Leslie Garate por ser siempre un gran apoyo y por transmitirme la fuerza que necesitaba para culminar mis estudios. Y no menos importante a mi mamá y todos mis hermanos que siempre me han apoyado en todo lo que hago.

ÍNDICE

Página

ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1.- INTRODUCCIÓN	9
1.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER	9
1.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS CANCEROSAS	10
1.2.1 Proliferación celular	11
1.2.2 Evasión de señales anti-proliferativas: proteínas supresoras de tumores	12
1.2.3 Evasión de la apoptosis	12
1.3 OSTEOSARCOMA CANINO	15
1.4 LAS PLANTAS COMO FUENTES DE COMPONENTES ANTICANCEROSOS	18
1.4.1 Propiedades del aguacate	19
1.4.2 Componentes bioactivos de la semilla de aguacate	20
1.4.3 Efectos citotóxicos de los lípidos de aguacate	22
2.- ANTECEDENTES	23
3.- JUSTIFICACIÓN	25
4.- HIPÓTESIS	26
5.- OBJETIVO GENERAL	27
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
6.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
7.- RESULTADOS	29
7.1 Capítulo 1. “Cytotoxicity of a Lipid-Rich Extract from Native Mexican Avocado Seed (Persea americana var. drymifolia) on Canine Osteosarcoma D-17 Cells and Synergistic Activity with Cytostatic Drugs”	30
7.1.1 Complementary results	46
7.2 Capítulo 2. “Mi perro, ¿Podría tener cáncer?”	48
8.- DISCUSIÓN	53
9.- CONCLUSIÓN	59
10.- REFERENCIAS	61

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Características del cáncer.	11
Figura 2. Vías de la apoptosis o muerte celular programada.	15
Figura S1. Effect of LEAS on MDCK cell line viability.	46
Figura 3. D-17 cell line morphology after different treatments at 48 h.	46
Figura 4. Effect of LEAS on cell cycle progression.	47
Figura 5. Modelo propuesto de los mecanismos de citotoxicidad de LEAS.	59

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Componentes de un extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano.	21
Tabla 2. Ejemplos de moléculas lipídicas de la semilla de aguacate en diferentes modelos de cáncer.	23
Tabla 3. Drug interaction effects of LEAS with cytostatic drugs.	47

RESUMEN

El osteosarcoma es el tumor óseo maligno más común en niños y en perros. Es un cáncer muy agresivo y metastásico, con pobre pronóstico a largo plazo. La terapia no ha mejorado significativamente desde la inclusión de la quimioterapia adyuvante en las estrategias de tratamiento de esta enfermedad, por lo que la búsqueda de nuevos medicamentos anticancerígenos con menos efectos adversos se ha convertido en un reto esencial para la quimioterapia contra el cáncer. En este sentido, los compuestos bioactivos del aguacate han probado su eficacia como moléculas citotóxicas. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto citotóxico y anti-proliferativo de un extracto rico en lípidos (LEAS) de la semilla del aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) sobre la línea celular D-17 de osteosarcoma canino, así como evaluar la actividad combinada con medicamentos citostáticos (cisplatino, carboplatino y doxorubicina). LEAS fue citotóxico sobre las células D-17 de una manera dependiente de la concentración con una IC₅₀ de 15.5 µg/mL a las 48 h. Además, LEAS indujo la apoptosis celular dependiente de caspasas por la activación de las vías extrínseca e intrínseca. También LEAS provocó de manera significativa la pérdida del potencial de membrana mitocondrial e incrementó la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondriales. Por otro lado, LEAS indujo la detención del ciclo celular de las células D-17 en la fase G₀/G₁, y mejoró la actividad citotóxica del cisplatino, el carboplatino y en menor grado de la doxorubicina contra la línea celular de osteosarcoma canino a través de un efecto sinérgico. En conclusión, los LEAS de la semilla de aguacate nativo mexicano mostraron actividad citotóxica en las células D-17 de osteosarcoma canino, lo que sugiere su potencial como agente antitumoral en el tratamiento del cáncer de hueso.

Palabras clave: *Persea americana*; osteosarcoma; aguacate, canino; cáncer, sinergismo.

ABSTRACT

Osteosarcoma is the most common malignant bone tumor in both children and dogs. It is an aggressive and metastatic cancer with a poor prognosis for long-term survival. Therapy has not improved significantly since the inclusion of adjuvant chemotherapy into disease treatment strategies, and the search for new anti-cancer drugs with fewer side effects has become an essential goal for cancer chemotherapy. In this sense, the bioactive compounds from avocado have proved their efficacy as cytotoxic molecules. Therefore, the objective of this study was to determine the cytotoxic and antiproliferative effect of a lipid-rich extract (LEAS) from Mexican native avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) on canine osteosarcoma D-17 cell line, and to evaluate the combined activity with cytostatic drugs (cisplatin, carboplatin and doxorubicin). LEAS was cytotoxic to D-17 cells in a concentration-dependent manner with an $IC_{50} = 15.5 \mu\text{g/mL}$ at 48 h. Besides, LEAS induced caspase-dependent cell apoptosis by the activation of extrinsic and intrinsic pathways. Moreover, LEAS induced a significant loss of mitochondrial membrane potential and increased production of mitochondrial reactive oxygen species. Also, LEAS induced the arrest of the cell cycle in the G0/G1 phase of D-17 cells and improved the cytotoxic activity of cisplatin, carboplatin, and in less extension, doxorubicin against the canine osteosarcoma cell line through a synergistic effect. In conclusion, LEAS from Mexican native avocado seed showed cytotoxic activity on D-17 cells from canine osteosarcoma, suggesting a potential as anti-tumoral agent in the treatment of bone cancer.

Keywords: *Persea americana*; osteosarcoma; avocado; canine; cancer; synergism

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER

El cáncer es un término que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier tejido del organismo, y se caracteriza por la multiplicación acelerada de células anormales que se extienden más allá de los límites habituales y pueden invadir tejidos adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, un proceso conocido como metástasis, siendo ésta la principal causa de muerte en el cáncer (WHO, 2021). En 2020, a nivel mundial se estimaron 19.3 millones de nuevos casos de cáncer en los seres humanos y casi 10 millones de muertes por dicha enfermedad (Ferlay *et al.*, 2021; Sung *et al.*, 2021). En el caso de los animales de compañía, en particular los perros domésticos, el cáncer representa hasta el 30% de todas las causas de muertes; sin embargo, en perros adultos y geriatras, esta cifra llega a ser de hasta el 50% (Gustafson *et al.*, 2018).

El cáncer se produce por la transformación de células normales en células tumorales en un proceso de varias etapas que suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estas alteraciones son el resultado de la interacción de diversos factores genéticos del paciente y tres categorías externas: a) carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioleta e ionizantes; b) carcinógenos químicos como los componentes del humo de tabaco, aflatoxinas y el arsénico entre otros; c) carcinógenos biológicos como algunos virus, bacterias y parásitos. En cuanto a los cambios genéticos que contribuyen al cáncer, se ven afectados tres tipos principales de genes (proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN). La función de los proto-oncogenes es regular el crecimiento y la división celular normal; sin embargo, cuando hay alteración de estos genes o su expresión es más activa de lo normal pueden causar cáncer (oncogenes), permitiendo que las células crezcan y sobrevivan cuando no deberían. Los genes supresores de tumores también participan en el control del crecimiento y la división celular, y cuando éstos se encuentran alterados pueden favorecer el desarrollo del cáncer. Los genes reparadores del ADN están involucrados en la reparación del ADN dañado por

diferentes causas. Sin embargo, al verse sobrepasados o al acumularse un mayor número de mutaciones se favorece esta enfermedad (Lodish *et al.*, 2013; Wilk *et al.*, 2021). Así mismo, se ha estimado que cerca del 85-90% de los casos de cáncer están influenciados por las condiciones bajo las que se encuentra el individuo, mientras que en el 5-10% de los casos, los factores genéticos tienen un papel importante (Anand *et al.*, 2008).

En el caso de los animales de compañía, el convivir con los seres humanos los predispone a los mismos carcinógenos, por lo que se ha postulado una relación directa con la presentación de cáncer, así que el intercambio de conocimientos entre investigadores en el campo de medicina humana y medicina veterinaria está siendo más común y ha dado muchos frutos. Los tumores malignos constituyen uno de los principales problemas de salud tanto en medicina humana como en medicina veterinaria. Varios estudios sugieren que las neoplasias caninas pueden ser informativas y de gran utilidad en el estudio de las neoplasias en humanos (Vail, 2000; Davis y Ostrander, 2014; Wilk, 2021).

1.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS CANCEROSAS

Las células cancerosas presentan diversos distintivos o sellos característicos que favorecen su desarrollo y diseminación en el organismo (Figura 1). En el año 2000, Hanahan y Weinberg propusieron agrupar, bajo el término sellos del cáncer, seis características de las células neoplásicas que aseguran la progresión tumoral en interacción con el microambiente tumoral. Estos sellos incluyen: a) señales proliferativas constitutivas, b) potencial replicativo sostenido, c) inhibición de señales anti-proliferativas, d) resistencia a la apoptosis, e) inducción de neoangiogénesis y f) capacidad metastásica. En el año 2011, actualizaron estos sellos, al incluir la reprogramación metabólica y la evasión a la vigilancia del sistema inmune. Asimismo, la inflamación crónica se incluyó junto a la inestabilidad genética como cualidades habilitantes. Para el año 2022 se agregaron otros 2 sellos distintivos del cáncer, los cuales incluyeron el desbloqueo de la plasticidad fenotípica y la reprogramación epigenética no mutacional, y se agregaron dos cualidades habilitantes más a las ya existentes, la senescencia celular y los microbiomas polimórficos (Hanahan, 2022).

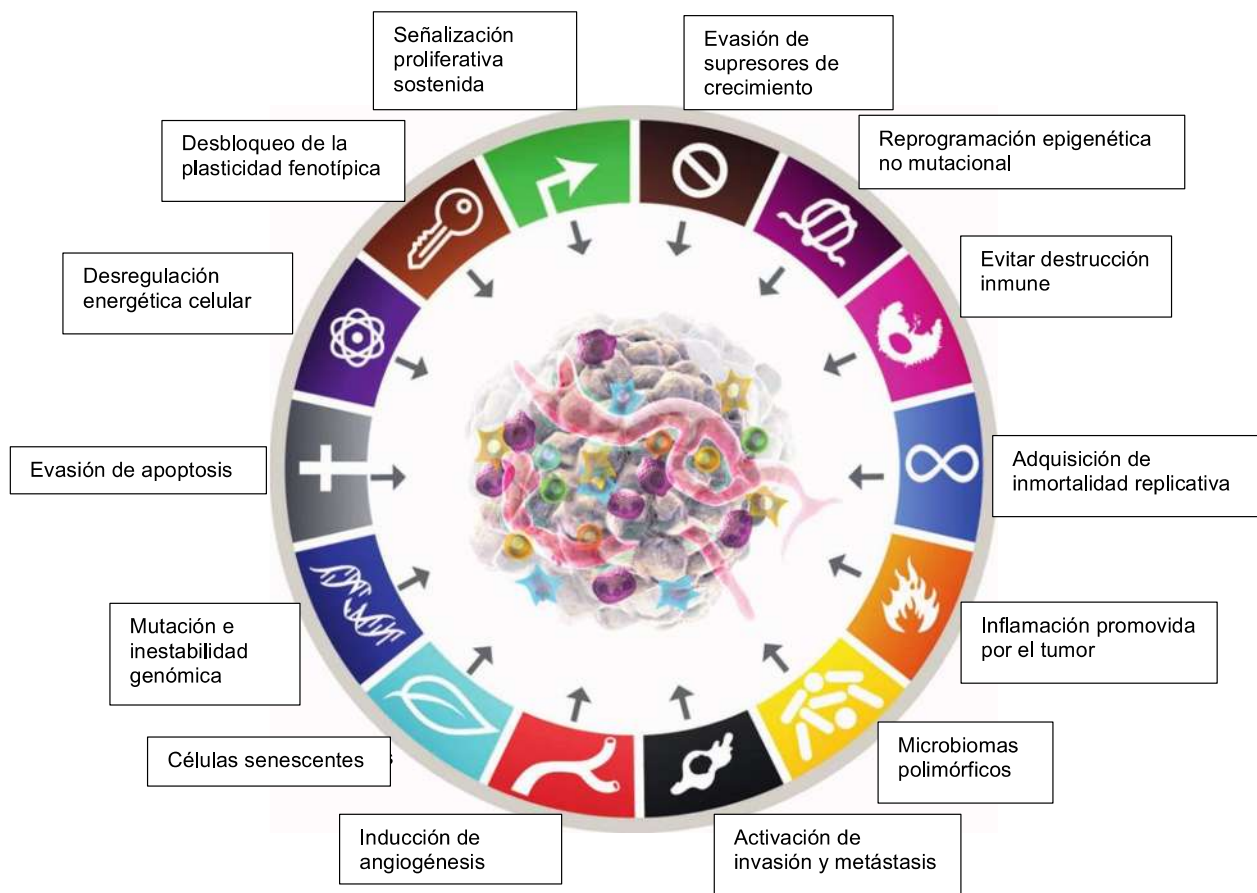


Figura 1. Características del cáncer (Hanahan, 2022).

1.2.1 Proliferación celular

En el cáncer, las células adquieren la capacidad de proliferar independientemente de las señales que regulan la activación del ciclo celular. Normalmente, las células son estimuladas por señales externas de proliferación, principalmente factores de crecimiento como las interleucinas, el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$), el factor de crecimiento transformante beta ($TGF-\beta$) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) entre otros, los cuales activan receptores presentes en la superficie celular, los que contienen típicamente dominios de tirosina quinasa intracelular. Este evento permite la activación consecutiva de vías de señalización intracelular como la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK, del

inglés Mitogen-Activated Protein Kinases), la vía de la quinasa de Janus (JAK-STAT), así como vías de señalización involucrando integrinas e interferones, y muchas otras vías más que regulan la progresión a través del ciclo celular, el crecimiento de la célula, favoreciendo la supervivencia celular (Hanahan y Weinberg, 2011). En las células tumorales se observan mutaciones en los genes involucrados en estas vías de señalización (en general oncogenes), que mantienen activa la proliferación de manera anormal por uno o varios mecanismos. Entre las oncoproteínas con mayor relevancia para la progresión de diversos tipos de tumores se incluyen Src, Abl, c-Kit, c-Myc; así como intermediarios de señalización de la ruta de MAPK, como RAS y RAF, PI3K (Lodish *et al.*, 2013).

1.2.2 Evasión de señales anti-proliferativas: proteínas supresoras de tumores

La tasa de proliferación aumentada de las células tumorales también se encuentra favorecida por la evasión de los mecanismos de regulación negativa de la división celular, controlados por los genes supresores de tumor. Estos genes actúan a distintos niveles, limitando el crecimiento tumoral y la proliferación, dos genes han sido ampliamente estudiados ya que sus mutaciones son comunes a varios tipos de tumores: *RB* (asociada a retinoblastoma) y *TP53* (Kasthuber, 2017). La proteína RB integra señales externas e internas de proliferación, decidiendo si la célula está en condiciones de progresar en el ciclo celular, en particular en la transición G1/S. Por otra parte, p53 sensa distintas formas de estrés intracelular (por ejemplo, daño en el ADN, cantidad de nutrientes), activando dos vías de respuesta principales: arresto en el ciclo celular en la transición G1/S para permitir la reparación del ADN o la apoptosis cuando el daño es demasiado o irreparable. La relevancia de *P53* en el cáncer es notoria, ya que se encuentra mutado en alrededor del 50% de los tumores humanos. (Elmore, 2007).

1.2.3 Evasión de la apoptosis

El crecimiento de los tumores no sólo depende de cuanto se dividen las células que lo componen, sino que también está condicionado por la tasa de muerte celular.

La disminución del número de células ocurre principalmente por apoptosis, un mecanismo normal que mantiene la homeostasis tisular. La apoptosis se lleva a cabo por diversos estímulos, los que confluyen en vías moleculares comunes y que culminan con la activación de un grupo de cisteínas proteasas llamadas “caspasas”, las que llevan a cabo la degradación celular hasta formar pequeños corpúsculos (cuerpos apoptóticos) que son fagocitados por otras células vecinas. En la célula se presentan 2 distintas vías apoptóticas (Rehmat, 2019):

- **La vía extrínseca del receptor de muerte**, como su nombre lo indica, comienza cuando los ligandos de muerte se unen a un receptor de muerte. Aunque se han descrito varios de estos receptores, los más conocidos son TNF tipo 1 (TNFR1), y una proteína relacionada llamada Fas (CD95) y sus ligandos, TNF y Fas ligando (FasL), respectivamente. Estos receptores de muerte tienen un dominio de muerte intracelular que recluta a proteínas adaptadoras tales como el dominio de muerte asociado al receptor TNF (TRADD) y al dominio de muerte asociado a Fas (FADD), así como a cisteína-proteasas como las caspasas. La unión de un ligando de muerte a un receptor de muerte, resulta en la formación de un sitio de unión para una proteína adaptadora y el complejo completo de ligando-receptor-adaptador, conocido como DISC (complejo de señalización que induce muerte). El DISC entonces, inicia el ensamblaje y activación de la pro-caspasa 8. La forma activada de la enzima, la caspasa 8, es una caspasa iniciadora, que comienza la apoptosis escindiendo otras caspasas ejecutoras o corriente abajo (Rehmat, 2019).
- **La vía intrínseca o mitocondrial**, una gran parte de estímulos apoptóticos (estrés celular, medicamentos, radiaciones, agentes oxidantes, etc.) inducen una segunda ruta de señalización que se conoce como la vía mitocondrial o intrínseca, que está regulada por proteínas de la familia Bcl-2, conformada por proteínas que inhiben la apoptosis (anti-apoptóticas) y otras que la promueven (pro-apoptóticas), y su balance permite la supervivencia o la muerte celular ante estímulos apoptóticos. Aunque existe una gran variedad de estímulos, todos ellos convergen en la mitocondria como centro de control. En las membranas

mitocondriales se concentran tanto señales pro-apoptóticas como señales anti-apoptóticas, de forma que, si son las primeras las que predominan, se produce la permeabilización de éstas. La permeabilización de la membrana externa de la mitocondria, tiene lugar como consecuencia del poro formado por los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, Bax y Bak. Es entonces cuando el potencial de la membrana ($\Delta\Psi_m$) mitocondrial se disipa, se paraliza la síntesis de ATP y se liberan proteínas del espacio intermembrana al citosol, como el citocromo c (CYTC), AIF (apoptosis inducing factor), la endonucleasa G (ENDO G), DIABLO/SMAC (direct IAP-binding protein with low pI / second mitochondria-derived activator of caspases) y HTRA2 (high temperature requirement protein A2) (D'Arcy, 2019).

Además, la cadena respiratoria es inhibida, provocando la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que dan lugar a un circuito de retroalimentación de señales pro-apoptóticas. La apoptosis intrínseca provoca una catástrofe bioenergética y metabólica resultante de múltiples mecanismos. De forma paralela, el citocromo c participa junto con APAF1 (apoptosis protease-activating factor-1) y dATP en la formación del apoptosoma, lo que provoca la activación de la caspasa-9, que, a su vez, activa a la caspasa-3 a través de una cascada proteolítica. AIF y ENDOG se traslocan al núcleo, donde median la fragmentación del ADN de forma independiente de las caspasas, y SMAC/DIABLO y HTRA2 inhiben la función anti-apoptótica de distintos miembros de la familia de las IAP (inhibitors of apoptosis) contrarrestando la inhibición de las caspasas (D'Arcy, 2019).

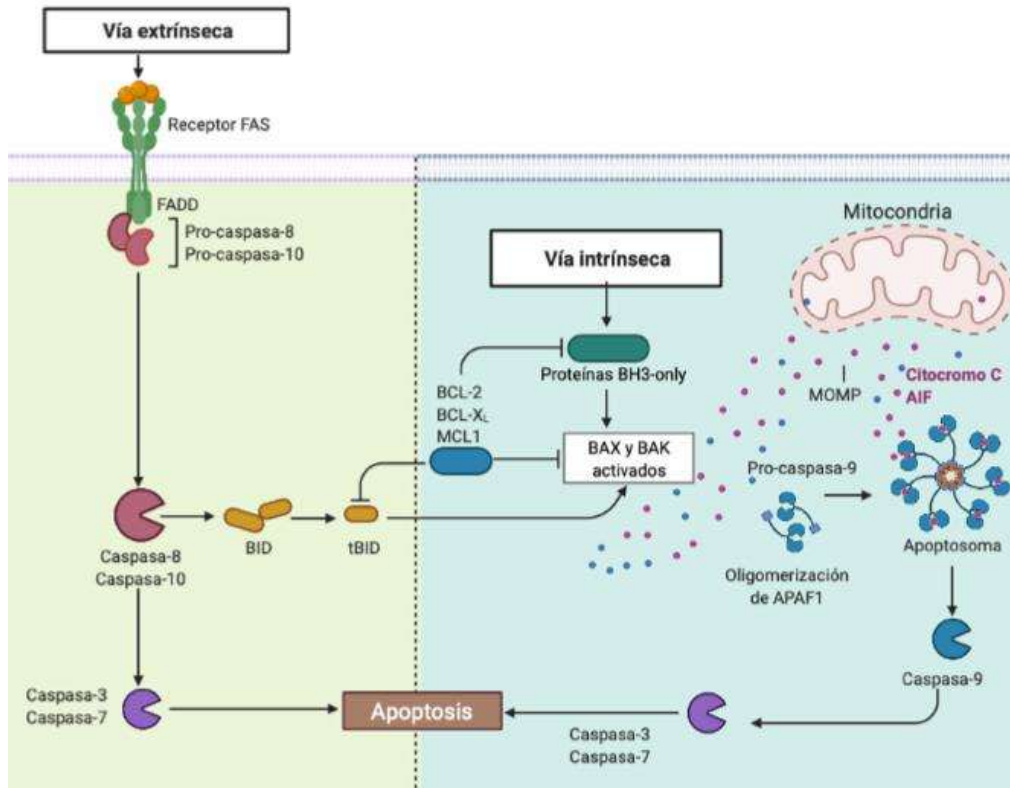


Figura 2. Vías de la apoptosis o muerte celular programada. (Creado en BioRender.com)

En las células cancerosas, este proceso de muerte puede alterarse en algún punto de la vía de señalización, obteniendo la capacidad de evitar la muerte celular y lograr así su objetivo de proliferar de manera anormal. Las células tumorales desarrollan mecanismos que les permiten evadir la apoptosis como: a) Alteración en el balance de proteínas pro y anti-apoptóticas; b) Disminución de la actividad de las caspasas; y c) Falla en la señalización del receptor de muerte (Wong, 2011).

1.3 OSTEOSARCOMA CANINO

El osteosarcoma canino es un tumor primario que se origina en los huesos, es muy agresivo, presenta alto grado de metástasis a sitios distales y está asociado con altos índices de mortalidad. Sin embargo, los mecanismos fisiopatológicos del osteosarcoma canino no han sido bien caracterizados. Además, el desarrollo de factores pronósticos y nuevos medicamentos son necesarios para tratar eficientemente

este tipo de cáncer en los perros (Park *et al.*, 2018; Ehrhart *et al.*, 2021). En comparación con los humanos, el osteosarcoma canino es el tumor de hueso más comúnmente diagnosticado, pero a diferencia de los seres humanos, afecta principalmente a perros de edad media a adulta (Adams, 2010; Dobson, 2013). Se estima que aproximadamente 75,000 perros al año son diagnosticados con osteosarcoma en los Estados Unidos de América, siendo los perros de talla grande los de mayor riesgo a desarrollar este tipo de cáncer, entre ellas las razas con mayor presentación son el Rottweiler, Doberman, Gigante de los Pirineos, Bull mastiff, Lobero irlandés y Labrador (Egenvall, 2007; Schiffman y Breen, 2015; Edmunds *et al.*, 2021). Además, este tipo de cáncer se presenta con mayor frecuencia en los perros que en los humanos, siendo hasta 10 veces más común (Ru *et al.*, 1998; Sultan y Ganaie, 2018).

En el caso de humanos, el osteosarcoma es el tumor más común en el hueso en adolescentes, se presenta principalmente en los huesos largos, en zonas caracterizadas por células en proliferación y crecimiento óseo activo (Mueller, 2007; Alfranca *et al.*, 2015). El osteosarcoma está clasificado histológicamente en diferentes subtipos (osteoblástico, fibroblástico y condroblástico), lo cual no tiene relevancia en el tratamiento y pronóstico (Rosenberg, 2013). A pesar de su baja incidencia, presenta altos índices de mortalidad.

El tratamiento de estos tumores es muy complejo y depende de varios factores como la localización del tumor y los sitios de metástasis, la presencia de micrometástasis no detectables (en el 80% de los casos), la extensión del tumor y la dificultad para la completa resección quirúrgica (Selvarajah, 2010; Kansara *et al.*, 2014). La quimioterapia para osteosarcoma incluye al metotrexato, doxorubicina, carboplatino y cisplatino (Pasic, 2017). El 50% de los pacientes con osteosarcoma localizado y tratados con cisplatino alcanzan hasta 5 años de supervivencia; sin embargo, esto no ha mejorado en la última década (Dernell, 2001; Cavalcanti, 2004; Jaffe, 2013). Hasta el 30% de los pacientes al ser diagnosticados con osteosarcoma por primera vez ya presentan micrometástasis, principalmente a los pulmones, lo cual hace muy difícil el tratamiento además de disminuir hasta un 20% la supervivencia a 5 años (Messerschmitt *et al.*, 2009). Ningún quimioterapéutico nuevo ha demostrado efectividad en pacientes

con osteosarcomas resistentes o con relapso ya que la metástasis pulmonar sucede hasta en el 30% de los pacientes, por lo cual no existen estrategias disponibles de segunda línea.

El osteosarcoma al ser poco común en las personas dificulta el progreso de los estudios clínicos en seres humanos (Mirabello *et al.*, 2009; Ostrander, 2019). Sin embargo, la mayor incidencia de osteosarcomas en los perros y el interés de los propietarios para tomar parte en los estudios clínicos representa una gran oportunidad para avanzar en estos estudios tanto en humanos como en los propios perros. Los seres humanos desarrollan el osteosarcoma en localizaciones similares a los perros, además tienen similitudes histopatológicas y respuesta a los quimioterapéuticos (Withrow y Wilkins, 2010). Por lo tanto, un perro puede servir como un modelo biológico del osteosarcoma humano. Incluso, los perros han sido utilizados en estudios clínicos para desarrollar técnicas quirúrgicas que evitan la amputación completa de alguna extremidad, las cuales son utilizadas actualmente en los seres humanos (LaRue *et al.*, 1989; Sultan y Ganaie, 2018).

Un gran número de líneas celulares de osteosarcoma humano son comercialmente disponibles (U-2 OS DRGFP, SJSA-1, HOS, KHOS/NP, entre otras). Sin embargo, solo existe la línea celular D-17 de osteosarcoma canino disponible comercialmente, la cual es muy utilizada a nivel mundial para realizar investigaciones sobre osteosarcoma canino; no obstante, en muchas instituciones de investigación también se trabaja con otras líneas celulares pero no comerciales (Abrahams, Moresco, D-22, OSA-1, etc.), por lo que la línea celular D-17 es la más utilizada para estudiar el osteosarcoma canino (Meyer y Walter, 2016).

Por lo anterior, es imperativo investigar los mecanismos celulares/moleculares del osteosarcoma canino, tanto en líneas celulares como en el modelo *in vivo*, además de innovar en tratamientos más específicos y seguros para el paciente. El pronóstico en el caso de osteosarcoma canino es muy pobre, con tasas de supervivencia después del diagnóstico y tratamiento hasta 1 año en el 45% de los perros. De estos que sobreviven más de un año, el 54% desarrollará metástasis y tienen un tiempo de supervivencia de aproximadamente 243 días, en perros con evidencia de metástasis al momento del

diagnóstico el tiempo medio de supervivencia es de sólo 76 días (Simpson, 2017; 2020).

1.4 LAS PLANTAS COMO FUENTES DE COMPONENTES ANTICANCEROSOS

Es conocido que los constituyentes de las plantas poseen efectos benéficos en la prevención y tratamiento del cáncer (Johnson, 2007; Güclü, 2020). Los principales protagonistas son los denominados fitoquímicos o metabolitos secundarios de plantas, moléculas orgánicas producto del metabolismo secundario que, aunque no poseen una función directa en procesos fisiológicos implicados en el crecimiento y desarrollo de las plantas, participan en funciones ecológicas como en la interacción con otros organismos, competencia, comunicación, defensa y tolerancia a estrés abiótico, entre otras. Además, están restringidos a grupos taxonómicos y suelen presentar una limitación espacial y temporal (Seigler, 2002). Por ejemplo, los efectos de dos extractos, uno de la hoja de romero y otro de la raíz de la cúrcuma, tuvieron efectos citotóxicos en tres líneas celulares de perro (C2 de mastocitoma, CMT-12 de carcinoma mamario y D-17 de osteosarcoma canino) (Levine, 2017).

Aunque las plantas producen una gran cantidad de metabolitos secundarios y de diversa naturaleza química (polifenoles, terpenoides, o alcaloides), en particular un grupo de moléculas que ha llamado la atención por sus propiedades citotóxicas son compuestos derivados de ácidos grasos, como las acetogeninas, las cuales son un subgrupo de policétidos o moléculas lipídicas de cadena larga restringidos a las familias Lauraceae y Annonaceae (Qayed *et al.*, 2005). Una de las aplicaciones más relevantes que se les ha demostrado, es su capacidad para inducir la muerte celular en diferentes modelos cancerosos relacionados con humanos (cáncer de colon, hígado, vejiga y glioblastoma), lo cual involucra la detención del ciclo celular y la inducción de la apoptosis (Yuan *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2011). El árbol de aguacate (*Persea americana* Mill.) pertenece a la familia Lauracea y en su fruto han sido reportados diversos tipos de metabolitos, de los cuales los derivados de ácidos grasos, principalmente los encontrados en las semillas, poseen actividad anticancerígena (Bora *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2007, Báez-Magaña *et al.*, 2019; Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2021).

1.4.1 Propiedades del aguacate

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es una especie integrante de la familia de las Lauráceas, originario de México y América Central. Existen más de 20 variedades conocidas de este frutal, las cuales se adaptan fácilmente a las regiones tropicales y subtropicales. México es el principal productor a nivel mundial del cultivar Hass, y actualmente se cultiva en diversas regiones del mundo como Brasil, Australia, Chile, Sudáfrica y España (Di Stefano *et al.*, 2017; Bhuyan 2019). El consumo de sus frutos es considerado saludable, debido a la gran cantidad de nutrientes que contiene, como los ácidos grasos, proteínas, minerales y vitaminas del complejo B y C (Abdel-Moneim *et al.*, 2017). Estos frutos tienen un alto contenido y variedad de ácidos grasos (AG) y derivados de ácidos grasos (DAG) como las acetogeninas alifáticas (Bora *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2007, Báez-Magaña *et al.*, 2019).

Entre las variedades y cultivares de aguacate destaca especialmente el aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*), debido a que posee un porcentaje mayor de aceites (20-30%) en comparación con la variedad americana (*P. americana* var. *americana*) (5-15%) y la variedad guatemalteca (*P. americana* var. *guatemaltensis*) (15-20%) (Baraona y Sancho, 2000; Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2021). En estudios recientes, se ha demostrado que el consumo de aguacate puede mejorar las condiciones de hipercolesterolemia y ser muy útil en el tratamiento de la hipertensión, diabetes mellitus tipo I y II, dislipidemias y en la salud cardiovascular (Yasir *et al.*, 2010; Ortiz-Avila *et al.*, 2013; Weschenfelder *et al.*, 2015; Márquez-Ramírez *et al.*, 2018). Por otro lado, son realmente interesantes las propiedades citotóxicas e inmunomoduladoras de un péptido antimicrobiano de la fruta del aguacate nativo mexicano, reportados en nuestro grupo de trabajo y nombrado defensina PaDef (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2013). Su actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *E. coli* fue demostrada en la línea celular BVE-E6E7 de endotelio bovino, mientras que sus efectos citotóxicos fueron probados en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama y la línea celular K562 de leucemia mielógena crónica (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016 y Flores-Alvarez *et al.*, 2018).

1.4.2 Componentes bioactivos de la semilla de aguacate

Los frutos de aguacate se caracterizan por contener solo una semilla, la cual generalmente representa el 16% de su peso total y mayormente es un producto de desecho, por lo que es una fuente subutilizada (Dabas *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2017), a pesar de tener un rico perfil de fitoquímicos. Más de una cuarta parte del peso total del fruto del aguacate nativo mexicano corresponde a la semilla (Ramos-Jerez, 2007), la cual tiene diversas propiedades medicinales como actividad antiinflamatoria, antidiabética, antihipertensiva, antimicrobiana, insecticida y anticancerosa (Dabas *et al.*, 2013).

La semilla de aguacate de la mayoría de los cultivares tiene un alto contenido de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante y una mayor cantidad de protoantocianinas, comparado con la pulpa (mesocarpo) y la cáscara (exocarpo) (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2021). Algunos ejemplos de moléculas bioactivas de la semilla de aguacate son la mannoheptulosa y su forma de polirol, el perseitol, los cuales inhibieron la internalización de *Malassezia furfur* en queratinocitos humanos e indujo la expresión del péptido antimicrobiano HBD-2 (Donnarumma *et al.*, 2007). Además, la semilla de aguacate es una fuente de AG y DAG con actividades inmunomoduladoras y citotóxicas. Su potencial anticanceroso se ha asociado con los diferentes componentes bioactivos, aunque principalmente con los AG, sus derivados y las acetogeninas, que se han encontrado en extractos lipofílicos de las semillas. Además de ser citotóxicas, han demostrado poseer efectos antiinflamatorios, inmunomoduladores y modifican la tasa metabólica (Ding *et al.*, 2007; Rosenblat *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2015; Báez-Magaña *et al.*, 2019). También se han realizado estudios evaluando los efectos sinérgicos de los ácidos grasos en combinación con quimioterapéuticos convencionales en el tratamiento del cáncer, por ejemplo, la avocatina B, como inhibidor de la oxidación de ácidos grasos, ha demostrado efectos sinérgicos con los agentes terapéuticos anti-cancerosos convencionales, ya que combinada con la citarabina provocó altos efectos sinérgicos por un incremento en la

producción de ROS y apoptosis en las células de leucemia mielógena aguda combinadas con adipocitos de médula ósea (Tabe *et al.*, 2020).

Así mismo, en los extractos de la semilla de aguacate nativo mexicano se han identificado diversos AG y acetogeninas, siendo los más abundantes los ácidos saturados hexadecanoico (C16:0), pentadecanoico (C15:0), heptadecanoico (C17:0) y octadecanoico (C18:0); aunque también contiene AG insaturados como los ácidos 9-octadecenoico (C18:1), 11-eicosenoico (C20:1), 9-hexadecenoico (C16:1); y AG poliinsaturados como los ácidos 9,12-octadecadienoico (C18:2), 9,12,15-octadecatrienoico (C18:3), entre otros (Bora *et al.*, 2001; Báez-Magaña *et al.*, 2019). En el siguiente cuadro se presenta la composición de moléculas lipídicas de cadena larga de la semilla de aguacate nativo mexicano (LEAS) (Tabla 1).

Tabla 1. Componentes de un extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano (LEAS).

Grupo	Compuesto	µg/g de extracto
Derivados de AG (acetogeninas alifáticas)	Avocatinas	32.28
	Perseninas	10.12
	Pahuatinas	4.26
	Ácidos grasos polihidroxilados	24.26
Ácidos grasos de cadena larga	Ácido tetradecanoico (ác. Mirístico)	2.49
	Ácido hexadecanoico (ác. Palmítico)	7.10
	Ácido 9,12-octadecadienoico (ác. Linoleico)	4.06
	Ácido 9-octadecenoico (ác. Oleico)	5.32
	Ácido octadecanoico (ác. Esteárico)	5.06
	Ácido eicosanoico (ác. Araquídico)	2.39
	Ácido 13-docosenoico (ác. Erúcico)	2.44
	Ácido docosanoico (ác. Behénico)	3.63
	Ácido 15-tetracosenoico (ác. Nervónico)	2.88
	Ácido tetracosanoico	4.29

Modificado de Báez-Magaña *et al.*, 2019.

1.4.3 Efectos citotóxicos de los lípidos de aguacate

Se han evaluado las propiedades citotóxicas del aguacate contra diferentes tipos de cáncer, estos estudios *in vitro* e *in vivo* no solo han explorado la pulpa, la parte comestible del aguacate, sino también las hojas y cáscara, además, los lípidos de la semilla han sido estudiados ampliamente. Los mecanismos moleculares en varias líneas celulares de cáncer han reportado la regulación de diferentes vías de señalización, especialmente la apoptosis mediada por caspasas y el involucramiento del arresto en diferentes etapas del ciclo celular. Por ejemplo, los ácidos palmítico y esteárico inducen apoptosis en células ováricas granulosa humanas de manera concentración-dependiente, mediante la inducción de la vía intrínseca de la apoptosis por una disminución de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y el aumento de la proteína pro-apoptótica Bax (Mu *et al.*, 2001). Un mecanismo similar se ha observado en hepatocitos de rata tratados con estos ácidos grasos, además de la detención del ciclo celular (Ji *et al.*, 2005).

Así mismo, el ácido palmítico induce apoptosis en células productoras de insulina RINm5F de ratón mediante estrés oxidante y el daño al ADN generado por la peroxidación de estas moléculas (Beeharry *et al.*, 2003). Dabas y col. (2019) encontraron efectos citotóxicos en células de cáncer de próstata con metástasis a nódulo linfático (LNCaP), con un extracto metanólico de la semilla de aguacate, el cual indujo apoptosis mediada por caspasa 3, rompimiento de PARP y arresto del ciclo celular en la etapa G0/G1, además de reducir la translocación nuclear de NFκB y la disminución de ciclinas D1 y E1. Por otro lado, se ha observado que la persina, inhibe la proliferación de distintas líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231 y T-47D), específicamente induciendo la detención del ciclo celular en la fase G2-M debido a una disminución en la expresión de las ciclinas A, D1 y B1 (que participan en la promoción del ciclo celular), y por el aumento en la expresión de p21 y p27, moléculas que participan en la detención del ciclo celular inhibiendo las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), además de la inducción de la apoptosis como respuesta al daño a los microtúbulos (Butt *et al.*, 2006).

En otro estudio, dos acetogeninas alifáticas (17 C) obtenidas a partir de un

extracto clorofórmico del mesocarpo de aguacate cultivar Hass, se demostró que actúan de forma sinérgica en la inhibición de la proliferación de células de cáncer oral 83-01-82CA mediante la afectación de la vía EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK1/2, disminuyendo la expresión y fosforilación de sus componentes (D'Ambrosio *et al.*, 2011). Previamente se había reportado que esta misma mezcla de acetogeninas C17 favorecía la inducción de apoptosis de manera selectiva en células de cáncer oral, y no en células sanas, mediante la activación de las dos vías de inducción (intrínseca y extrínseca), como respuesta a la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) de la mitocondria (Ding *et al.*, 2009). De manera similar, posteriormente se reportó que la mezcla de dos acetogeninas de 17 carbonos, denominada avocatina B, afecta de manera específica la viabilidad de células de leucemia mieloide aguda mediante apoptosis intrínseca inducida por ROS (Lee *et al.*, 2015) (Tabla 2).

Tabla 2. Ejemplos de moléculas lipídicas de la semilla de aguacate en diferentes modelos de cáncer.

Tipos de Cáncer	Extracto/Compuestos	Efecto principal	Autores
Próstata, MCF-7, colon y páncreas	Extracto metanólico	Disminuye proliferación	Oberlis <i>et al.</i> , 1998
Caco-2 y HT-29	Ácido oleico y linolénico	Apoptosis	Llor <i>et al.</i> , 2003
MCF-7	Persina	Detiene ciclo celular en G2/M, por disminución de Ciclina A, D1 y B1; aumento de P21 y P27	Butt <i>et al.</i> , 2006
Oral	Acetogeninas de extracto clorofórmico	Apoptosis por vía intrínseca y extrínseca	Ding <i>et al.</i> , 2009
Oral	Acetogeninas de extracto clorofórmico	Disminuye la fosforilación de proteínas de las vías señalización EGFR/MEK/ERK 1 Y 2	D'Ambrossio <i>et al.</i> , 2011
LMA	Avocatina B	Apoptosis por vía intrínseca, inhibición FAO	Lee <i>et al.</i> , 2015

2.- ANTECEDENTES

En nuestro grupo de trabajo se evalúa el potencial terapéutico de diferentes moléculas de origen vegetal en células de cáncer, como los péptidos antimicrobianos y ácidos grasos o derivados de la semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*). En estudios previos se observó que un extracto lipídico de la semilla de esta variedad de aguacate (LEAS), con un alto contenido de AG y acetogéninas, tiene un efecto sobre la disminución de la viabilidad y proliferación (~80%) de tres líneas celulares cancerosas (HeLa, Caco-2 y MCF-7) y una línea celular normal de células de epitelio mamario bovino (CEMB). Este efecto se asoció con la inducción de apoptosis en las células Caco-2 y CEMB (Lara-Márquez, 2015).

Además, en otro estudio, se estableció la ruta mediante el cual LEAS ejerce su efecto citotóxico en células Caco-2, se encontró que detiene el ciclo celular en la etapa G0/G1 e induce la apoptosis dependiente de caspasas e incrementa las ROS, además estas moléculas modularon la expresión de citocinas relacionadas a la respuesta inflamatoria (Lara-Márquez *et al.*, 2020). Adicionalmente, se ha observado que, en las CEMB, estas moléculas disminuyen la expresión de genes de la respuesta proinflamatoria (citocinas y quimiocinas), además de favorecer el aumento en la expresión de la citocina IL-10, por lo que se les atribuye una actividad antiinflamatoria en un modelo de interacción hospedero-patógeno (Báez-Magaña *et al.*, 2019).

3.- JUSTIFICACIÓN

Los estudios clínicos veterinarios tienen el potencial de ser integrados en los estudios clínicos en medicina humana en un acercamiento comparativo, lo cual puede mejorar el desarrollo de nuevos medicamentos. Los tratamientos convencionales suelen ser efectivos contra células cancerosas; sin embargo, debido a que no eliminan todas las células cancerosas, la enfermedad puede resurgir. Por esta razón, se ha incrementado la importancia del estudio de nuevas alternativas que resulten más agresivas y selectivas para las células cancerosas y a su vez menos dañinas para las células sanas.

Los perros con cáncer han sido reconocidos como un modelo de alto valor para estudiar la fisiopatología, farmacología y potencial terapéutico de los nuevos medicamentos anticancerígenos. El uso de los perros como modelo biológico en osteosarcoma es de gran valor, ya que en esta especie se desarrolla espontáneamente, es localmente invasivo y hace metástasis hacia los pulmones, al igual que en los seres humanos. Además, se han obtenido algunas líneas celulares de osteosarcoma canino espontáneo, particularmente la línea D-17 que se originó de un osteosarcoma metastásico pulmonar en un perro, y esta línea ha servido para una gran variedad de estudios clínicos.

Por otro lado, México es el principal productor y consumidor de aguacate, donde Michoacán ocupa el primer lugar como productor, por lo que el estudio del aguacate y sus propiedades tienen gran relevancia. De manera especial, las semillas del aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*), tienen un alto contenido de moléculas lipídicas y en la búsqueda de biomoléculas que dañen a las células cancerosas se ha documentado que algunos de estos lípidos, como los LEAS, suelen afectar la proliferación y viabilidad celular.

4.- HIPÓTESIS

El extracto lipídico (LEAS) de la semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) es citotóxico para células de osteosarcoma canino mediante la inducción de apoptosis y la detención del ciclo celular, además de presentar sinergia con los quimioterapéuticos utilizados comúnmente contra el osteosarcoma canino.

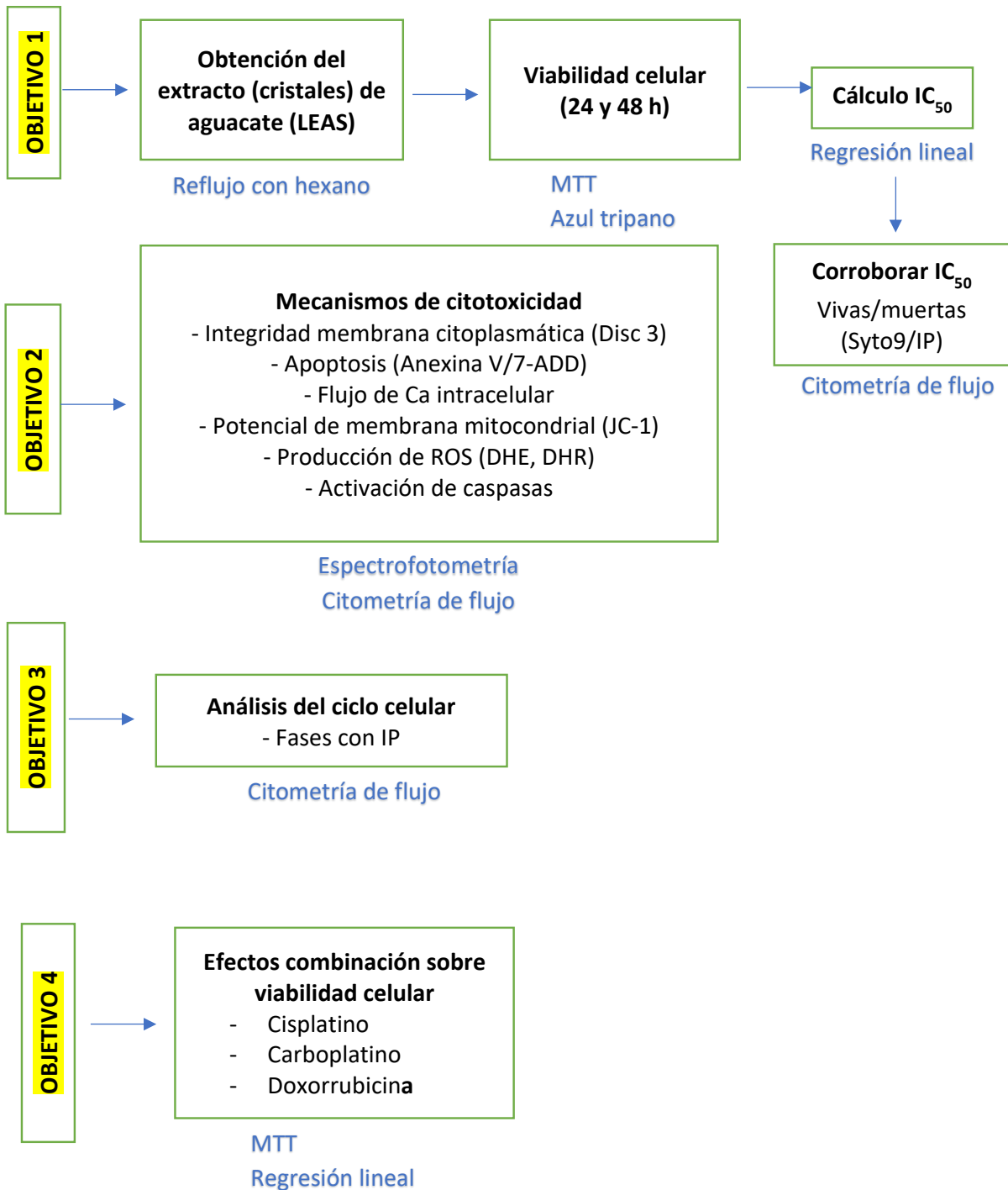
5.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto citotóxico de un extracto lipídico (LEAS) de la semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*), sobre el ciclo celular y la inducción de apoptosis en la línea celular D-17 de osteosarcoma canino, así como sus efectos citotóxicos al interactuar con diferentes quimioterapéuticos utilizados convencionalmente.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Evaluar la citotoxicidad del extracto lipídico de la semilla de aguacate sobre la línea celular D-17 de osteosarcoma canino.
- II. Analizar los efectos del extracto lipídico de la semilla de aguacate sobre la activación de mecanismos de muerte celular en la línea celular D-17 de osteosarcoma canino.
- III. Determinar el efecto del extracto lipídico de la semilla de aguacate sobre la proliferación y el ciclo celular, en la línea celular D-17 de osteosarcoma canino.
- IV. Evaluar la interacción tóxica de algunos quimioterapéuticos y el extracto lipídico de la semilla de aguacate sobre la línea celular D-17 de osteosarcoma canino.

6.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7.- RESULTADOS

Los resultados del presente trabajo se presentan en dos capítulos.

Capítulo 1. Corresponde al artículo de investigación titulado:

Padilla-Arellanes S, Salgado-Garciglia R, Báez-Magaña M, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE. **Cytotoxicity of a Lipid-Rich Extract from Native Mexican Avocado Seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) on Canine Osteosarcoma D-17 Cells and Synergistic Activity with Cytostatic Drugs.** *Molecules*. 2021 Jul 9;26(14):4178. [doi:10.3390/molecules26144178](https://doi.org/10.3390/molecules26144178). (Factor de impacto 2020, 4.411).

Capítulo 2. Corresponde al artículo de divulgación titulado:

“Mi perro, ¿Podría tener cáncer?”. Publicado en la revista de divulgación *Saber Más*. No. 54 (2020) ISSN: 2007-7041.

7.1 Capítulo 1. “Cytotoxicity of a Lipid-Rich Extract from Native Mexican Avocado Seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) on Canine Osteosarcoma D-17 Cells and Synergistic Activity with Cytostatic Drugs”

Article

Cytotoxicity of a Lipid-Rich Extract from Native Mexican Avocado Seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) on Canine Osteosarcoma D-17 Cells and Synergistic Activity with Cytostatic Drugs

Salvador Padilla-Arellanes ^{1,2}, Rafael Salgado-Garciglia ² , Marisol Báez-Magaña ¹, Alejandra Ochoa-Zarzosa ¹  and Joel Edmundo López-Meza ^{1,*} 

¹ Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-FMVZ, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Posta Veterinaria, Morelia 58893, Mexico; salvador.padilla@umich.mx (S.P.-A.); solbaez2@gmail.com (M.B.-M.); ochoaz@umich.mx (A.O.-Z.)

² Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia 58030, Mexico; rafael.salgado@umich.mx

* Correspondence: elmeza@umich.mx



Citation: Padilla-Arellanes, S.; Salgado-Garciglia, R.; Báez-Magaña, M.; Ochoa-Zarzosa, A.; López-Meza, J.E. Cytotoxicity of a Lipid-Rich Extract from Native Mexican Avocado Seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) on Canine Osteosarcoma D-17 Cells and Synergistic Activity with Cytostatic Drugs. *Molecules* **2021**, *26*, 4178. <https://doi.org/10.3390/molecules26144178>

Academic Editors: Zhe-Sheng (Jason) Chen and Dong-Hua Yang

Received: 19 June 2021

Accepted: 6 July 2021

Published: 9 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Osteosarcoma is the most common malignant bone tumor in both children and dogs. It is an aggressive and metastatic cancer with a poor prognosis for long-term survival. The search for new anti-cancer drugs with fewer side effects has become an essential goal for cancer chemotherapy; in this sense, the bioactive compounds from avocado have proved their efficacy as cytotoxic molecules. The objective of this study was to determine the cytotoxic and antiproliferative effect of a lipid-rich extract (LEAS) from Mexican native avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) on canine osteosarcoma D-17 cell line. Also, the combined activity with cytostatic drugs was evaluated. LEAS was cytotoxic to D-17 cells in a concentration-dependent manner with an $IC_{50} = 15.5 \mu\text{g/mL}$. Besides, LEAS induced caspase-dependent cell apoptosis by the extrinsic and intrinsic pathways. Moreover, LEAS induced a significant loss of mitochondrial membrane potential and increased superoxide anion production and mitochondrial ROS. Also, LEAS induced the arrest of the cell cycle in the G0/G1 phase. Finally, LEAS improved the cytotoxic activity of cisplatin, carboplatin, and in less extension, doxorubicin against the canine osteosarcoma cell line through a synergistic effect. In conclusion, avocado could be a potential source of bioactive molecules in the searching treatments for osteosarcoma.

Keywords: *Persea americana*; osteosarcoma; apoptosis; avocado; canine; synergism

1. Introduction

Cancer represents a serious human health worldwide problem; recently data of GLOBOCAN indicate that the number of new cases in 2020 has risen to 19.3 million. Besides, cancer is the leading cause of disease-associated death in dogs and it is estimated that 50% of dogs >10 years old develop some type of cancer [1–3]. Osteosarcoma (OSA) is the most common malignant bone tumor in both humans and dogs, although the incidence in dogs is ten times higher [4,5]. OSA is more common in larger and giant breeds of dogs, such as the Rottweiler and Great Pyrenees, among others [6,7]. OSA is an aggressive and highly metastatic cancer, with significant morbidity and a poor prognosis for long-term survival and occurs spontaneously in diverse skeletal locations, such as the appendicular skeleton, axial skeleton, and extraskeletal sites [8]. In dogs, despite appropriate surgical and chemotherapeutic protocols only approximately 50% of affected dogs survive the first year, and fewer (~20%) survive more than two years after diagnosis [9]. Also, research in both canine and human OSA has demonstrated that both species share similar genetic abnormalities [8]. For the above mentioned, and given the high frequency of OSA in

canines, the dog is considered an attractive model to study and learn about the origin of this cancer, as well as to evaluate new drugs or treatments that may have potential use in humans too [3,10,11].

The OSA treatment includes conventional approaches such as chemotherapy. Diverse studies have demonstrated the efficiency of cytostatic drugs such as carboplatin, cisplatin, and doxorubicin; however, these still have a low therapeutic index and severe side effects [12]. One strategy to solve these problems is the use of combination therapy, which may reduce the negative side effects. These treatment limitations have led to the search for new cytotoxic compounds which are more selective and aggressive towards cancer cells. In this sense, plant constituents have beneficial effects in the prevention and treatment of cancer, which are attributable essentially to the phytochemicals or secondary metabolites [13]. Recently, the cytotoxicity and the antiproliferative effects of pure artemisinin and a hydroalcoholic extract obtained from *Artemisia annua* on the D-17 canine osteosarcoma cell line were reported [14]. Also, the effects of two extracts (turmeric root and rosemary leaf extract) on three different canine cell lines (C2 mastocytoma, and CMT-12 mammary carcinoma, D-17 osteosarcoma cell line) were assessed [15]. These reports highlight the potential of plant extracts in the search for new alternatives for OSA treatment.

The avocado tree (*Persea americana* Mill.) has been used to treat various health conditions in humans [16]. In particular, avocado anti-cancer activities have been associated with more than 20 groups of bioactive compounds present in the tree and the fruit [17,18], highlighting the long-chain lipid molecules contained in the fruit, such as the long-chain fatty acids and their derivatives (avocatsins, pahuatins, persenins, and the polyhydroxylated fatty alcohols) [18–22]. The native Mexican avocado fruit (*P. americana* var. *drymifolia*) represents a source of bioactive molecules with anti-cancer and anti-inflammatory properties [23]. Recently, we reported that a lipid-rich extract from native Mexican avocado seed (LEAS, 1–200 ng/mL) reduces *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells and regulates innate immune response [24]. Also, LEAS has shown cytotoxic activity on colorectal cancer Caco-2 cells ($IC_{50} = 28 \mu\text{g/mL}$) inducing apoptosis. Besides, LEAS inhibited fatty acid oxidation and increased the superoxide production and mitochondrial ROS; also, it stimulated secretion of cytokines IL-6, IL-8, and IL-10; whereas IL-1 β secretion was inhibited (~50%) [22]. However, the effect of LEAS on OSA is unknown. For the above mentioned, the present study aimed to evaluate the cytotoxic and antiproliferative effects of LEAS (*P. americana* var. *drymifolia*) on canine osteosarcoma cell line D-17. Also, the combined activity of LEAS with cytostatic drugs was analyzed.

2. Results

2.1. LEAS Is Cytotoxic for D-17 Cells

The canine OSA D-17 cell line was treated with increasing concentrations of LEAS (1 to 100 $\mu\text{g/mL}$) for 24 and 48 h, and effects on cell viability were assessed. LEAS showed concentration-dependent cytotoxic effects on D-17 cells. The results showed that after 24 h of incubation, D-17 cell viability decreased when cells were treated with LEAS 20 $\mu\text{g/mL}$ (29%) (Figure 1A). However, cytotoxicity was increased after 48 h at 10 $\mu\text{g/mL}$ (31%) and 20 $\mu\text{g/mL}$ (70%) (Figure 1B). The half-maximal inhibitory concentration at 48 h was calculated as $IC_{50} = 15.5 \mu\text{g/mL}$, which was corroborated by flow cytometry (Figure 1C,D); this concentration was used in the rest of the experiments. Also, LEAS did not exhibit hemolytic action at any concentration used, suggesting that these molecules do not have a cytotoxic effect on normal blood cells. On the other hand, LEAS was significantly less cytotoxic on MDCK cells with an $IC_{50} = 50 \mu\text{g/mL}$, which was three times higher than that showed on the osteosarcoma cell line (Figure S1). According to these results, further experiments were performed with the LEAS IC_{50} on D-17 cells to establish the dead mechanism activated.

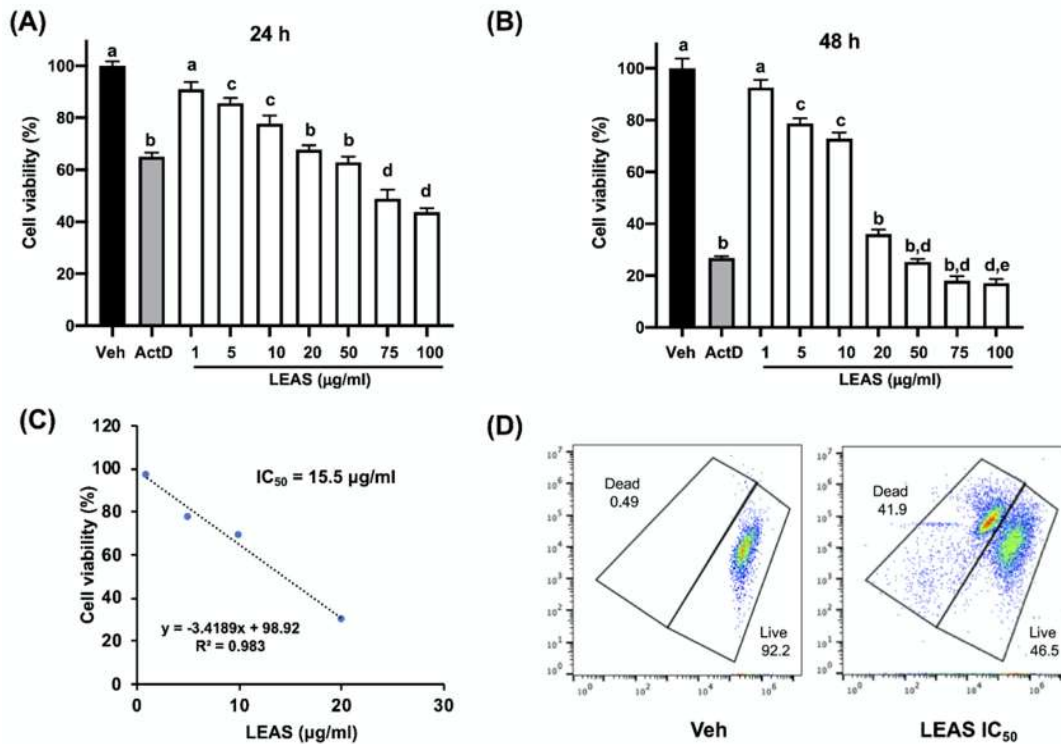


Figure 1. Effect of LEAS on canine osteosarcoma D-17 cell line viability. Cells were treated with LEAS (1, 5, 10, 20, 50, 75, and 100 μg/mL) and cell viability was evaluated by MTT assays at 24 h (A) and 48 h (B). Cell viability is shown with respect to cells treated with vehicle (DMSO 0.1%). Actinomycin D (ActD) was used as a positive control (80 μg/mL). Data represent the mean of three independent experiments performed in triplicate. Different letters denote significant differences within the treatments (one-way ANOVA and Tukey's pairwise comparison, $p < 0.05$). (C) Linear regression analysis of the concentration-response to calculate the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of LEAS on the D-17 cell line at 48 h. (D) In vitro assessment of LEAS IC₅₀ (15.5 μg/mL) by flow cytometry at 48 h using SYTO™ 9 green-fluorescent nucleic acid stain and propidium iodide. Representative plots of different treatments are shown.

2.2. LEAS Does Not Affect the Cell Membrane of D-17 Cells

We evaluate the calcium efflux and membrane electrical potential to determine if LEAS cytotoxicity on D-17 cells was associated with cell membrane damage. The results indicated that cytotoxicity induced by LEAS was not a result of cell membrane compromise as both calcium efflux and membrane electrical potential were not altered (Figure 2).

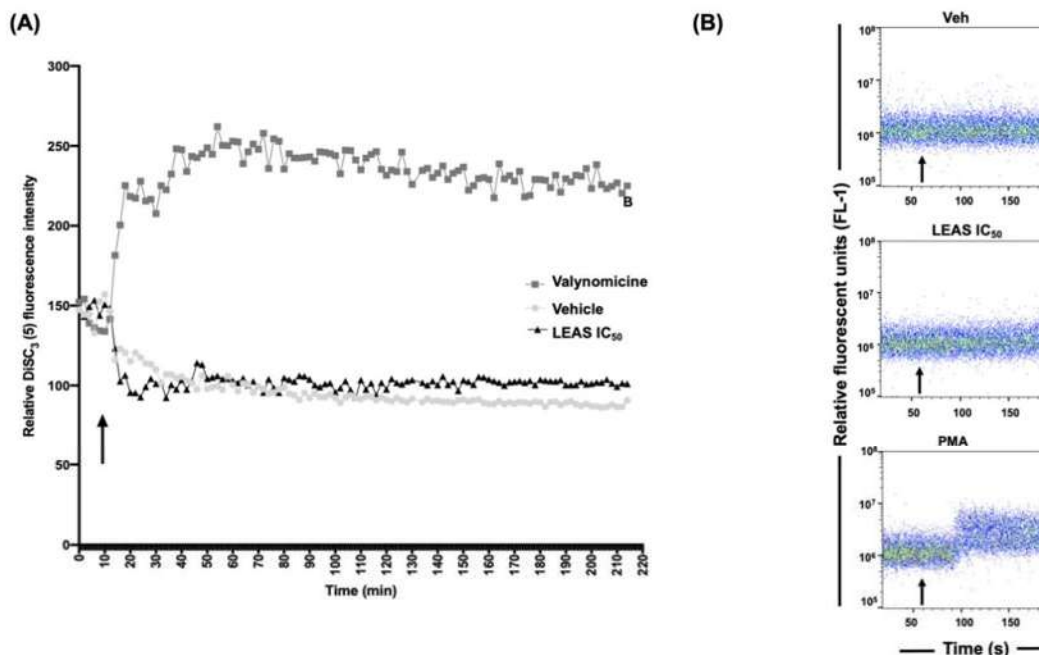


Figure 2. LEAS does not affect the cytoplasmic membrane integrity in D-17 cells. **(A)** Changes in the cytoplasmic membrane potential of D-17 cells were evaluated using membrane potential-sensitive dye. Cells were previously incubated with 200 μ M of the dye DiSC₃(5) for 30 min at 37 °C and then treated with LEAS IC₅₀ (15.5 μ g/mL). Valinomycin (0.2 mM) was used as a positive control. **(B)** The efflux of cytosolic calcium was analyzed by flow cytometry. Measurements were assayed by 3 min, and at minute one the cells were treated with LEAS IC₅₀ (15.5 μ g/mL), vehicle, or PMA 3 μ M (acetate phorbol myristate) as a positive control. Representative plots are shown. Arrows indicate the time at which the treatments were added. Vehicle = DMSO (0.1%).

2.3. LEAS Cytotoxicity on D-17 Cells Is Related to Apoptosis Induction

To evaluate the death mechanism activated by LEAS on D-17 cells, the apoptosis rate was assessed by flow cytometry. Cells were treated with the LEAS IC₅₀ (15.5 μ g/mL) for 24 and 48 h, and apoptosis was evaluated (Figure 3A). LEAS IC₅₀ induced apoptosis in D-17 cells in a time-dependent manner, and the apoptosis rate was similar (>37%) to that exhibited by actinomycin D at 48 h (Figure 3B). Also, the results showed that necrosis did not increase significantly in cells treated with LEAS. Besides, the activity of caspase-8 and caspase-9 was measured, which are characteristic of the extrinsic and intrinsic pathways, respectively. At 24 h of treatment, the activation of both caspases was not increased significantly. However, at 48 h the activation of both caspases was detected (caspase-8, 22% and caspase-9, 37%); indicating that both pathways were activated (Figure 4).

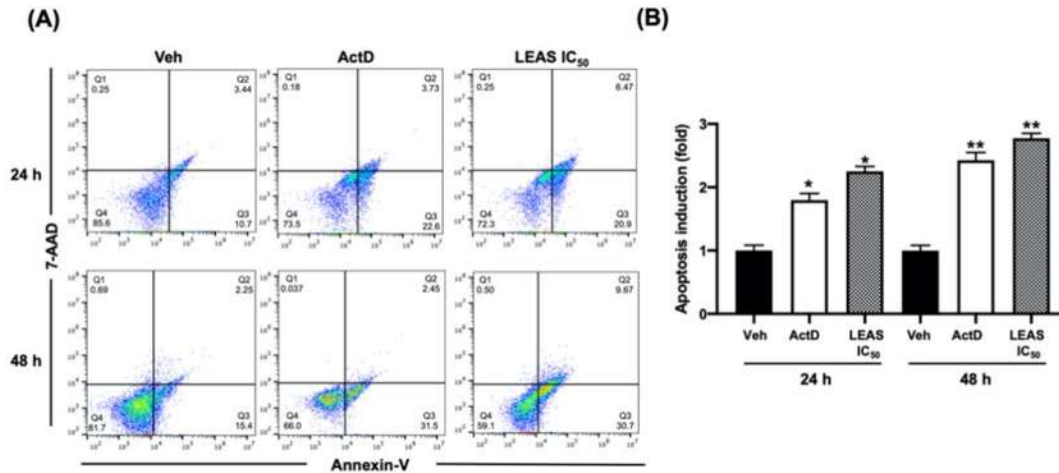


Figure 3. Apoptosis induced by LEAS in D-17 cells. (A) Cells treated with LEAS IC₅₀ (15.5 µg/mL) for 24 h and 48 h were analyzed by flow cytometry using Annexin-V and /AAD staining to establish the apoptotic rate. Cells sorted into quadrants Q1, Q2, Q3 and, Q4 represent necrotic, late apoptotic, early apoptotic, and viable (live) populations, respectively. Representative plots are shown. (B) The graphic shows the apoptosis fold-change in the treatments at times evaluated. Each bar shows the mean of triplicates ± SE. A minimum of 10,000 events per sample was collected. * and ** indicate statistically significant differences with respect to vehicles ($p < 0.05$) at the different times evaluated. ActD = Actinomycin D (80 µg/mL). Veh = vehicle (DMSO 0.1%).

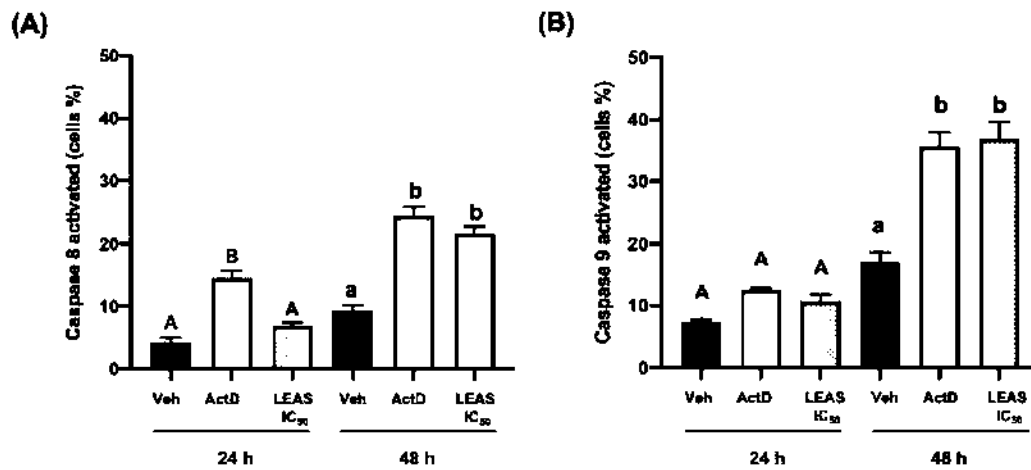


Figure 4. Caspase-8 and caspase-9 activation by LEAS in D-17 cells. Cells treated with LEAS IC₅₀ (15.5 µg/mL) for 24 h and 48 h were analyzed by flow cytometry to caspase-8 (A) and caspase-9 activation (B). Representative plots are shown. The graphic shows percentage of cells with caspase-activated for each time of treatment. Each bar shows the mean of triplicates ± SE of two independent experiments. Different letters denote significant differences within the treatments at the time evaluated (one-way ANOVA and Tukey’s pairwise comparison, $p < 0.05$). ActD = Actinomycin D (80 µg/mL). Veh = vehicle (DMSO 0.1%).

2.4. LEAS Cytotoxicity Is Associated with Loss of Mitochondrial Membrane Potential and ROS Production in D-17 Cells

Mitochondrial membrane potential was assessed using the dye JC-1 by flow cytometry. Under normal conditions, the electrochemical gradient of intact mitochondria results in aggregation of the dye, which fluoresces red. In contrast, fluorescent dye escapes from the depolarized mitochondria of apoptotic cells, and the non-aggregated dye fluoresces green. We demonstrated that LEAS caused a loss of mitochondrial membrane potential in D-17 cells treated with LEAS at 12 and 24 h (Figure 5), increasing cells fluorescing green (>39%) when compared with cells treated only with vehicle (<18%) (Figure 5B). Because the induction of apoptosis is usually correlated with the activity of ROS disrupting mitochondrial membrane potential, we measured the generation of O_2^- and ROS by flow cytometry. We showed that the addition of LEAS treatment significantly increased the production of O_2^- (65%) and ROS (72%) in D-17 cells compared with vehicle (Figure 6). Taken together, these results indicated that LEAS induced production of O_2^- and ROS and, consequently, loss of mitochondrial membrane potential favoring apoptosis by intrinsic pathway.

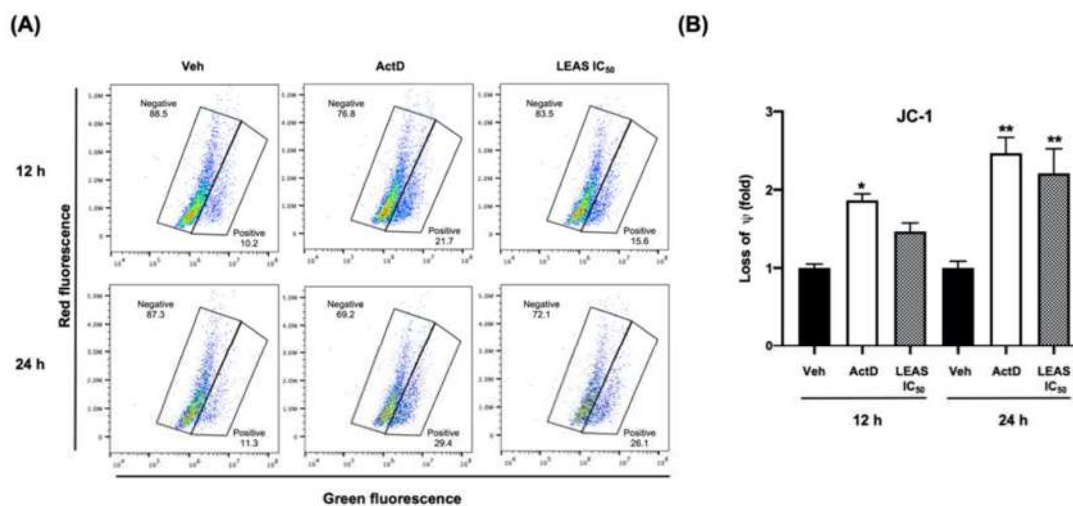


Figure 5. LEAS generates the loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in D-17 cells. (A) The mitochondrial membrane potential was evaluated by flow cytometry using the JC-1 dye. Cells were treated for 12 h and 24 h with LEAS IC₅₀ (15.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), vehicle, or Act D. Representative plots are shown. (B) The graphic shows fold-change values for each time of treatment. Each bar shows the mean of triplicates \pm SE of two independent experiments. “*” and “**” indicates statistically significant differences with relation to the vehicle at the time evaluated ($p < 0.05$). ActD = Actinomycin D (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Veh = vehicle (DMSO 0.1%).

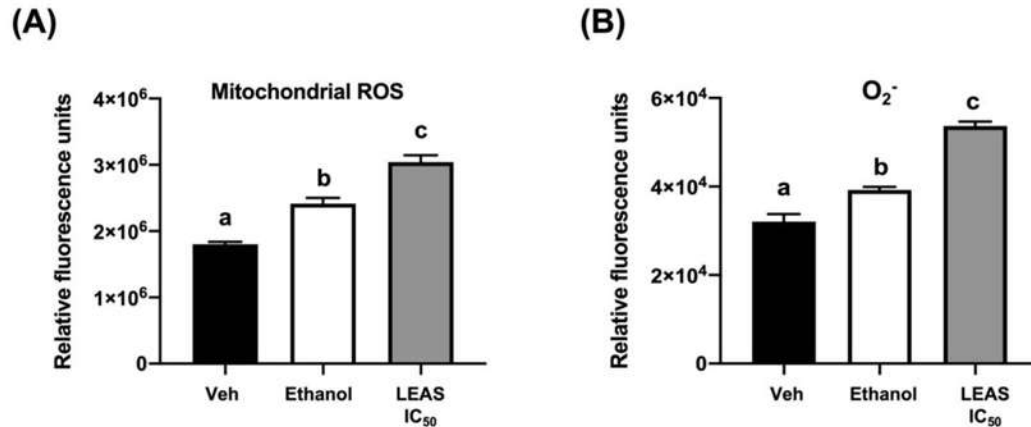


Figure 6. LEAS increased the production of ROS in D-17 cells. The production of mitochondrial ROS (A) and superoxide anion (B) were assessed by flow cytometry using the dyes DHE (5 μ M) and DHR (10 μ M), respectively. Cells were treated for 48 h with LEAS IC₅₀ (15.5 μ g/mL), vehicle (DMSO 0.1%), or ethanol (12%) as a positive control. The graphic shows fold-change values for each treatment. Each bar shows the mean of triplicates \pm SE of two independent experiments. Different letters indicate statistically significant differences in relation to the vehicle ($p < 0.05$).

2.5. LEAS Induces Cell Cycle Arrest in D-17 Cells

To investigate the effect of LEAS treatment on cell cycle progression in D-17 cells, these were incubated with IC₅₀, and then flow cytometry was used to assay the DNA content per cell. LEAS increased significantly the proportion of cells in G0/G1 phase at 48 h (82%) with relation to control cells (66%), which was correlated with a decrease in the proportion of cells in G2/M phase at 48 h (10%) with relation to control (19%) (Figure 7).

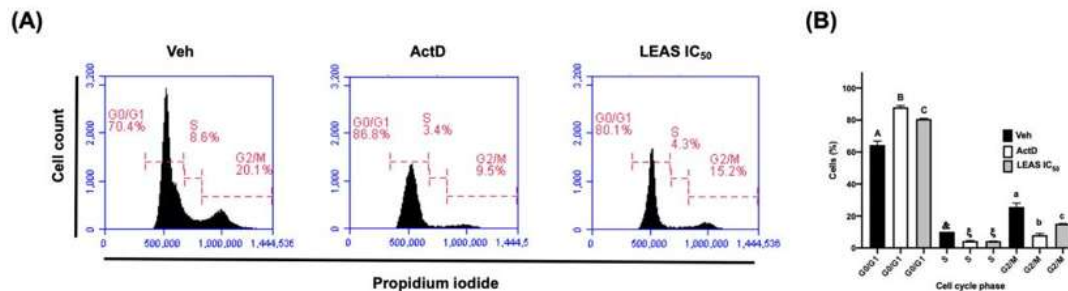


Figure 7. Effect of LEAS on cell cycle progression. (A) The cell cycle phases were determined by flow cytometry using propidium iodide. Cells were treated for 48 h with LEAS IC₅₀ (15.5 μ g/mL), vehicle (DMSO 0.1%), or ActD (actinomycin D, 80 μ g/mL). (B) The graphic shows the percentage of cells in the different cell cycle phases. Each bar shows the mean of triplicates \pm SE. For each sample, 20,000-gated events were acquired. Statistically significant differences of each phase of the cell cycle between the treatments are indicated ($p < 0.05$). ActD = Actinomycin D (80 μ g/mL). Veh = vehicle (DMSO 0.1%).

2.6. LEAS Shows a Synergistic Effect with Cytotoxic Drugs in D-17 Cells

Lastly, we evaluated the cytotoxic effect of LEAS in combination with cytostatic anticancer drugs cisplatin, carboplatin, and doxorubicin on osteosarcoma D-17 cells. Cell viability analysis showed an IC₅₀ = 44.76 μ M for cisplatin (Figure 8A); notably, the cyto-

toxicity was increased by LEAS through synergistic action, highlighting the combination of LEAS (5 µg/mL) and cisplatin (3.34 µM) which decreased cell viability by 60% when compared to vehicle-treated cells. Likewise, LEAS improved the carboplatin cytotoxicity by synergistic action. Carboplatin showed an $IC_{50} = 143.9 \mu\text{M}$ on osteosarcoma cells (Figure 8B); however, in combination with LEAS, we observed a significant decrease in cell viability, even the lowest concentration of both showed a synergistic effect with a reduction in cell viability (48%). Finally, only three doxorubicin combinations (Figure 8C) showed a synergistic effect (LEAS 10 µg/mL and doxorubicin 375 nM; LEAS 20 µg/mL and doxorubicin 93.75 or 187.5 nM). These results indicate that LEAS has a synergistic effect with cisplatin, carboplatin, and to a lesser extent with doxorubicin, improving its cytotoxicity on D-17 cells.

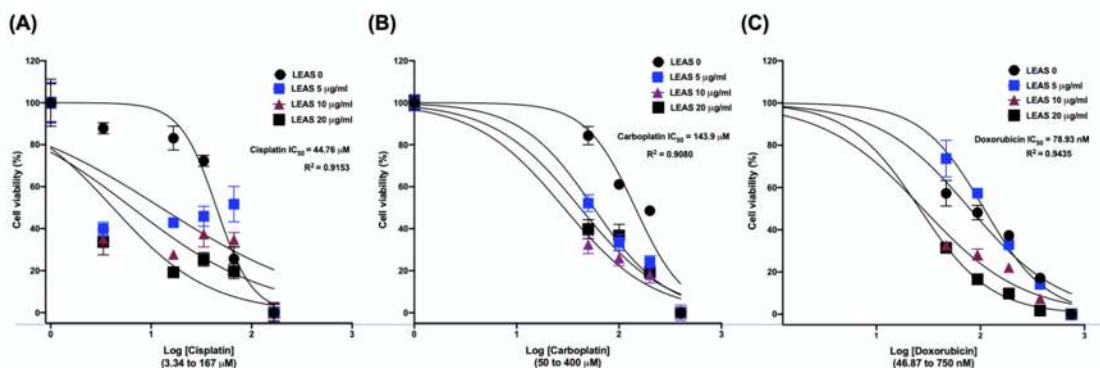


Figure 8. Synergistic effect of LEAS with cytostatic drugs on cell viability of D-17 cells. (A) Cisplatin, (B) Carboplatin, and (C) Doxorubicin. D-17 cells were subjected to the simultaneous treatment with LEAS (5, 10, 20, 50 µg/mL), cisplatin (3.34, 16.7, 33.4, 66.8 µM), carboplatin (50, 100, 200, 400 µM) or doxorubicin (46.8, 97.7, 187, 350 nM) and incubated for 72 h. The viable cells were determined by MTT assay and the IC_{50} was estimated. Controls consisting of cells treated with the individual compounds were included. All treatments were evaluated in two independent experiments performed by triplicate.

3. Discussion

Avocado fruit is rich in lipids and diverse studies have shown their anticancer activities, which vary with the composition and the chemical nature of the molecules [20,21]. The lipid proportions vary among the varieties of avocado, but we focused on the Mexican native variety (*P. americana* var. *drymifolia*) which shows the higher oil content (20–30%) [25]. The pulp lipids of the native Mexican avocado fruit have attracted attention due to their properties; however, the nutraceutical properties of seed lipids have been poorly studied. In this study, the cytotoxic effects of a lipid-rich extract from avocado Mexican native seeds (LEAS) on the D-17 osteosarcoma cell line were evaluated. LEAS decreased D-17 cell viability through apoptosis induction, which was related to ROS production and depolarization of the mitochondrial membrane. Also, LEAS favors the arrest of the cell cycle in the G0/G1 phase. Besides, the LEAS improved the cytotoxicity of different cytostatic drugs and could have potential use in combined treatment for OSA control.

The side effects and toxicity of chemotherapy in patients with cancer remain a major problem; therefore, the search for safer alternatives such as natural products to be used as mono or adjunct therapy with the standard drugs is a priority in anti-cancer research [10,13]. Numerous studies have evaluated the cytotoxic properties of avocado compounds against different types of cell lines from leukemia, colon, oral, and prostate cancer [17,18,22,26]. However, to our knowledge, avocado lipids have not been evaluated on bone tumors, such as osteosarcomas, which are the most prevalent bone neoplasm in humans and

dogs. In this work, LEAS exhibited cytotoxic effects on D-17 canine osteosarcoma cells ($IC_{50} = 15.5 \mu\text{g/mL}$) in a concentration-dependent manner (Figure 1). Similar results to LEAS on D-17 cells have been reported with other plant extracts. Isani et al. [14] reported the cytotoxic effects of an extract from sweet absinthe and artemisinin with an IC_{50} of $65 \mu\text{M}$ for the hydroalcoholic extract and $548 \mu\text{M}$ for the pure standard. Also, the cytotoxicity of baicalein (a flavonoid) was evaluated on three osteosarcoma cells (HMPOS, D-17, and OS 2.4) with cytotoxic concentrations from 1 to $25 \mu\text{M}$ [27]. Concerning the cytotoxic activity of avocado seed extracts on cancer cells, Alkhalf et al. [28] evaluated a lipid seed extract that exhibited anti-cancer activities in a concentration-dependent manner on the HCT116 (colon cancer) and the HePG2 (liver cancer) human cell lines. Likewise, chloroform extract from avocado seed showed strong cytotoxic activity against the MCF-7 cell line with an $IC_{50} = 94.87 \mu\text{g/mL}$ [29]. On the other hand, some non-steroidal anti-inflammatory drugs, such as carprofen and tolafenamic acid were cytotoxic for D-17 cells [30]. Earlier, we reported the anti-inflammatory effects of LEAS on mammary epithelial cells [24]. In further studies it will be necessary to evaluate this activity on D-17 cells and to determine its contribution to the LEAS cytotoxic activity. Unlike other cancers, the availability of commercial canine osteosarcoma cell lines is not wide enough. However, due to the interest that canine osteosarcoma represents, both for the health of dogs as a model for human osteosarcoma, new cell lines are being established; this will open the possibility that in the future the effects of LEAS could be evaluated in other lines from canine osteosarcoma. Besides, recently we reported that LEAS is cytotoxic towards human colon Caco-2 cells with an IC_{50} of $28 \mu\text{g/mL}$ [22], and recent results from our laboratory showed that LEAS is cytotoxic towards MCF-7 human breast cancer cells and the mouse melanoma cell line B16-F0. These results show that LEAS is cytotoxic towards cell lines of different origins and with other genetic backgrounds. On the other hand, LEAS was significantly less cytotoxic on MDCK cells with an $IC_{50} = 50 \mu\text{g/mL}$, which was three times higher than LEAS cytotoxicity on D-17 cells (Figure S1), indicating the selective toxicity of LEAS on the osteosarcoma cells.

In most cases, cancer cells maintain accelerated growth and longer survival than normal cells by suppressing apoptosis. In this work, the LEAS cytotoxicity on D-17 cells was related to apoptosis induction through both extrinsic and intrinsic pathways activation. The decrease in cell viability by LEAS was correlated with an increase in apoptotic activity, because the percentage of apoptotic cells was significantly higher in LEAS treated cells compared to control cells; besides, an increase in the activation of caspase 8 and caspase 9 was detected (Figures 3 and 4). In agreement, other groups have demonstrated that avocado lipids activate both extrinsic and intrinsic apoptosis simultaneously in oral [20] and breast cancer cells [19]. In agreement with the apoptosis induction, LEAS ($IC_{50} 15.5 \mu\text{g/mL}$) induced the loss of mitochondrial membrane potential of D-17 cells (Figure 5). A similar effect has been reported for avocado fatty acid derivatives, which induced the loss of mitochondrial potential in oral cancer cells [20]. Dysfunction of mitochondrial membrane is an important mechanistic feature of apoptosis of cancer cells treated with different drugs. The opening of mitochondrial permeability transition pores leads to depolarization of transmembrane potential, favoring the release of cytochrome c and pro-apoptotic proteins. Also, LEAS induced ROS production, which is consistent with the activation of the intrinsic pathway. Similar results were obtained in a study treating D-17 cells with the flavonoid myricetin [31]. In another study using dihydroartemisinin, cell death via oxidative damage was induced by ROS production in osteosarcoma cells [32].

The growth of tumor cells may be inhibited at any phase of the cell cycle, which results in cell cycle arrest. Phytochemicals extracted from *P. americana* induce cell cycle arrest [33]. Our data indicate that LEAS affects the cell cycle of D-17 cells, arresting the cells in G0/G1 phase. In agreement, betulinic acid (a triterpenoid) induced the cell cycle arrest of the D-17 cell line in the S phase [34]. Also, the flavonoid baicalein arrested the cell cycle of three canine osteosarcoma cell lines with a significant increase in G0/G1 and a decrease in G2/M [27].

Cancer treatment with cytostatic drugs has been used in the last 25 years, but significant adverse effects are very common. For this reason, new drugs and therapeutic targets are needed to improve the outcome of dogs suffering OSA and to reduce the long-term toxicities associated with the standard treatments [10,35]. The combination of two or more therapeutic agents permits diminished drug dosages and consequently toxicity, and also reduces the development of resistance by target cells and provides the potential for synergism of drug effects. The most common chemotherapeutic agents used for OSA treatment in dogs are doxorubicin and platinum-based compounds such as carboplatin and cisplatin [10]. In this work, the cytotoxicity of doxorubicin, carboplatin, and cisplatin was evaluated in combination with LEAS on D-17 cells (Figure 8). Our drug combination studies demonstrated synergism of the three compounds with LEAS and an enhancement in the sensitivity of D-17 cells to these cytostatic drugs was observed. The synergism of LEAS with the drugs could limit some of the acute and long-term toxicities associated with high doses.

4. Materials and Methods

4.1. Reagents, Cell Lines, and Cell Culture

The osteosarcoma D-17 (ATCC[®] CCL-183[™]) cell line was purchased from Cientifica Senna (Ciudad de México, México) and MDCK (ATCC[®] CCL-34[™]) cell line was kindly donated by Laura Cobos-Marín (UNAM, México). Both cell lines were routinely cultured according to the supplier's recommendations. Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium/nutrient F-12 Ham (DMEM/F12K, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (Equitech Bio, Kerrville, TX, USA), 100 U/mL penicillin/streptomycin (Gibco), and 1 µg/mL amphotericin B (Invitrogen) at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. All experiments were performed using cell lines maintained at low passage numbers (5–10 passages). Cisplatin, carboplatin, and doxorubicin were purchased from Sigma and work solutions were prepared in Dulbecco's modified Eagle's medium/nutrient F-12 Ham.

4.2. Lipid-Rich Extract from Avocado Seed (LEAS)

Mexican avocado fruits (*P. americana* var. *drymifolia*) were collected when physiological maturity was achieved in Michoacán, Mexico. The LEAS was obtained as reported [24]. Briefly, frozen avocado seeds were crushed, and the powder was extracted in a Soxhlet apparatus for 14 h with hexane (C₆H₁₄, J.T. Baker). This fraction was filtered (Whatman filter, Sigma, St. Louis, MO, USA) and cooled for 12 h at −18 °C to obtain the LEAS crystals, which were recovered by discarding the supernatant and then drying with gas nitrogen. This extract contains abundant molecules of 17–21 carbon aliphatic chains with hydroxyl groups such as aliphatic acetogenins and long-chain fatty acids. The extract characterization was previously reported [24]. The crystals were resuspended in 5% DMSO (dimethylsulfoxide, Sigma, St. Louis, MO, USA). The evaluated concentrations of LEAS were: 1, 5, 10, 20, 50, 75, 100, and 150 µg/mL, and the final concentration of vehicle for all the experiments was DMSO 0.1%, which was used as control.

4.3. MTT Viability Assay

Cell viability was assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma, St. Louis, Missouri, MO, USA) assays after 24 and 48 h of treatment with LEAS, and the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated as reported [22]. For this, D-17 and MDCK cell lines were plated at a density of 10,000 cells per well in 96-well tissue culture-treated plates (Corning Inc., Corning, New York, NY, USA) and synchronized by starvation using a medium without supplements for 24 h. Cells were treated with vehicle (DMSO), actinomycin D (80 µg/mL, Sigma), or LEAS (ranging from 1 to 100 µg/mL). Briefly, MTT assays were performed by adding 10 µL of MTT dye (5 mg/mL) in phosphate-buffered saline (PBS) to each well and incubated for 4 h at 37 °C in 5% CO₂. Finally, formazan crystals were solubilized in acid isopropanol (100 µL, 95%

isopropanol, and 5% of 1 N HCl). The absorbance measurements were carried out in a spectrophotometric plate reader (Bio Rad) at a wavelength of 595 nm. Cell viability results are reported as the percentage of viable cells with respect to cells treated with the vehicle. The IC₅₀ was calculated by regression analysis using Excel (Microsoft) and corroborated by flow cytometry with SYTO*9 green-fluorescent nucleic acid stain and propidium iodide in a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. For the rest of the experiments on the D-17 cells, the LEAS IC₅₀ calculated was used.

4.4. Calcium Efflux Testing

Calcium efflux was assessed by flow cytometry in a BD Accuri™ C6 flow cytometer using a calcium assay kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, D-17 cells (1×10^5 /mL) were cultured and synchronized in 100 mm flasks, then incubated with the indicator dye for 1 h at 37 °C. The baseline fluorescence was established (1 min), and then the treatments were added (LEAS IC₅₀ or vehicle). The measurements were performed for 3 min without interrupting the data collection. The changes of the fluorescence intensity in cell populations in response to the treatments were monitored using flow cytometry. Phorbol myristate acetate (3 mM; PMA, Sigma) was used as a positive control. Data were analyzed using FlowJo Software v. 10.4.2 (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA).

4.5. Measurement of the Membrane Potential

The changes in membrane potential of D-17 cells were measured using the DiSC3(5) dye (3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide, Sigma) as described [36]. Briefly, D-17 cells (1×10^4 /mL) were seeded in 96-well black-wall plates and cultured for 24 h. Then, they were washed two times with Hank's-HEPES buffer and incubated with DiSC3(5) 0.2 mM (dissolved in Hank's-HEPES buffer) for 30 min in a CO₂ incubator. LEAS IC₅₀ and vehicle were added to each well, and subsequent changes in the fluorescence intensity were monitored for 2 h in a Varioskan spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Valinomycin at 0.2 mM (Sigma) was used as a positive control.

4.6. Assessment of Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi_m$)

The effect of LEAS on the $\Delta\Psi_m$ of D-17 cells was evaluated by flow cytometry using JC-1 dye (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) that allows differentiating healthy cells (red fluorescence) from those with mitochondrial damage (green fluorescence). For this, D-17 cells (4×10^5 /mL) were cultured in 24-well plates and treated with LEAS IC₅₀ or vehicle and stained with JC-1 dye for 15 min at 37 °C in the dark, according to the manufacturer's instructions. The cells were subsequently washed twice with assay buffer, and their fluorescence was measured in a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Data were analyzed using the FlowJo Software v. 10.4.2 (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA).

4.7. Determination of Reactive Oxygen Species (ROS)

Superoxide anion (O₂⁻) and mitochondrial ROS production were measured by flow cytometry in a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) using dihydroethidium (DHE, 5 μM, molecular probes) and dihydrorhodamine-123 (DHR, 15 μM, molecular probes), respectively. D-17 cells (4×10^5 /mL) were cultured and synchronized for 24 h. Thereafter, they were incubated for 48 h with LEAS IC₅₀ or vehicle. Next, cells were recovered by trypsinization, washed with PBS, and incubated with DHR or DHE for 2 h in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C in darkness. Finally, cells were washed and analyzed. Ethanol (12% *v/v*) was used as a positive control. A total of 10,000 events were evaluated.

4.8. Apoptosis Analysis

Flow cytometry was used to detect the binding of annexin V to phosphatidylserine on the surface of cells. Briefly, D-17 cells were plated in 24-well plates and synchronized for 24 h. Thereafter, the cells were treated with LEAS for 24 and 48 h before being harvested by trypsinization and centrifugation. Cells were washed with PBS and resuspended in 100 μ L binding buffer according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). After the addition of 1 μ L annexin V-FITC (Alexa Fluor™ 488 conjugate, Invitrogen, Waltham, MA, USA) and 1 μ L 7-ADD (Biolegend, San Diego, CA, USA), the cell mixture was incubated for 20 min at room temperature. A minimum of 10,000 cells per sample was collected on a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and analyzed using the FlowJo Software v. 10.4.2 (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA). Actinomycin D (80 μ g/mL, Sigma) was used as a positive control for apoptosis.

Also, the activation of representative caspases of apoptosis pathways was evaluated by flow cytometry using the CaspGLOW™ fluorescein active caspase-8 and 9 kits (Invitrogen, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. For this, D-17 cells were plated in 24-well plates and synchronized for 24 h. Thereafter, the cells were treated with LEAS for 24 and 48 h, harvested by trypsinization, and stained with 1 μ L Substrate-FITC (Caspase-Glo 8 or 9), incubated for 60 min at 37 °C in 5% CO₂, and were finally washed twice with 100 μ L of wash buffer. A minimum of 10,000 events per sample were collected on a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

4.9. Cell Cycle Analysis

Cell cycle analysis was performed in D-17 cell line treated with LEAS using the BD cycle test Plus DNA kit (BD biosciences, San Jose, CA, USA) according to manufacturer's specifications. Briefly, 5×10^4 D-17 cells were seeded in 24-well plates and synchronized for 24 h. Further, the medium was replaced with 400 μ L of fresh medium supplemented with heat-inactivated fetal bovine serum and treated with LEAS during 24 and 48 h. Then, cells were harvested following trypsinization and washed with buffer solution, adjusted to 1×10^5 cells for treatment. Finally, each sample was centrifuged, and the supernatant was removed, solution A was added and incubated for 10 min at room temperature, then solution B was added and incubated for 10 min. Finally, solution C was added and incubated for 10 min in darkness and whilst being kept in ice-cold, until samples were analyzed on a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). For each sample, 20,000-gated events were acquired. Total event counts within the G0/G1, S, and G2/M phases were used to calculate the percentage of cells within each phase of the cell cycle.

4.10. Drug Combination Studies

The LEAS interactions with cytotoxic drugs usually used against canine osteosarcoma (cisplatin, carboplatin, or doxorubicin) were assessed. For this, D-17 cells were seeded (2500 cells/well) in a 96-well plate and then were subjected to the simultaneous treatment with LEAS (5, 10, 20, 50 μ g/mL), cisplatin (3.34, 16.7, 33.4, 66.8 μ M), carboplatin (50, 100, 200, 400 μ M) or doxorubicin (46.8, 97.7, 187, 350 nM) and incubated for 72 h. The viable cells were determined by MTT assay as described above and the IC₅₀ was estimated for each case. Controls consisting of cells treated with the individual compounds were included. All drugs were freshly prepared before each experiment. All experiments were performed in triplicates. Drug interactions were analyzed following the method of Aapro et al. [37]. The type of interaction between LEAS and cytostatic drugs was determined using the equations:

$$\text{Additive} = SF_{1+y} = SF_1 \times SF_y$$

$$\text{Sub-additive} = SF_1 \times SF_y < SF_{1+y} < SF_1 \text{ and } SF_y$$

$$\text{Antagonistic} = SF_{1+y} > SF_1 \times SF_y$$

where, SF_{1+y} = surviving fraction of cells exposed to the combination of LEAS and cisplatin or carboplatin or doxorubicin, SF_1 = surviving fraction of cells exposed to LEAS alone, SF_y = surviving fraction of cells exposed to cisplatin or carboplatin or doxorubicin alone. A combination index (CI) was determined and the CI values indicate a synergistic effect when <1 , an antagonistic effect when >1 , and an additive effect when equal to 1.

4.11. Statistical Analyses

The data were analyzed with the PRISM10.0 software, performing a one-way analysis of variance (One-Way ANOVA) using the post hoc Tukey test. The results are reported as the means \pm the standard errors (SE), and the significance level was set at $p \leq 0.05$.

5. Conclusions

LEAS was cytotoxic for the canine D-17 osteosarcoma cell line through the induction of caspase-dependent apoptosis. Also, LEAS increases the proportion of cells in G0/G1 phase. Besides, LEAS induced a significant loss of mitochondrial membrane potential and increased ROS production. LEAS improved the cytotoxicity of cisplatin, carboplatin, and doxorubicin on D-17 cells through a synergistic effect. These results show that avocado can be a source of attractive anticancer molecules and further studies are needed to evaluate its potential as an antitumor agent for bone cancer treatment in humans and dogs.

Supplementary Materials: The following are available online, Figure S1: Effect of LEAS on MDCK cell line viability.

Author Contributions: Conceptualization, S.P.-A., R.S.-G., A.O.-Z. and J.E.L.-M.; Funding acquisition, R.S.-G., A.O.-Z. and J.E.L.-M.; Investigation, S.P.-A., R.S.-G., M.B.-M., A.O.-Z. and J.E.L.-M.; Project administration, J.E.L.-M.; Writing—original draft, S.P.-A. and J.E.L.-M.; Writing—review & editing, R.S.-G. and A.O.-Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from CONACyT (CB 2016-287210), CIC 14.1, 2.10, and 14.5 from Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo to A.O.-Z., R.S.-G. and J.E.L.-M., respectively.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

Conflicts of Interest: The authors declare that there are no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.

References

1. Adams, V.J.; Evans, K.M.; Sampson, J.; Wood, J.L. Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. *J. Small Anim. Pract.* **2010**, *51*, 512–524. [[CrossRef](#)]
2. Dobson, J.M. Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs. *ISRN Vet. Sci.* **2013**, *2013*, 941275. [[CrossRef](#)]
3. Vail, D.M.; MacEwen, E.G. Spontaneously Occurring Tumors of Companion Animals as Models for Human Cancer. *Cancer Invest.* **2000**, *18*, 781–792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Mueller, F.; Fuchs, B.; Kaser-Hotz, B. Comparative biology of human and canine osteosarcoma. *Anticancer Res.* **2007**, *27*, 155–164. [[PubMed](#)]
5. Schiffman, J.D.; Breen, M. Comparative oncology: What dogs and other species can teach us about humans with cancer. *Philos. Trans. R. Soc. B* **2015**, *370*, 20140231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Egenvall, A.; Nødtvedt, A.; von Euler, H. Bone tumors in a population of 400,000 insured Swedish dogs up to 10 y of age: Incidence and survival. *Can. J. Vet. Res.* **2007**, *71*, 292–299.
7. Simpson, S.; Dunning, M.; de Brot, S.; Alibhai, A.; Bailey, C.; Woodcock, C.L.; Mestas, M.; Akhtar, S.; Jeyapalan, J.N.; Lothion-Roy, J.; et al. Molecular Characterisation of Canine Osteosarcoma in High Risk Breeds. *Cancers* **2020**, *12*, 2405. [[CrossRef](#)]
8. Simpson, S.; Dunning, M.D.; de Brot, S.; Grau-Roma, L.; Mongan, N.P.; Rutland, C.S. Comparative review of human and canine osteosarcoma: Morphology, epidemiology, prognosis, treatment and genetics. *Acta Vet. Scand.* **2017**, *59*, 1–11. [[CrossRef](#)]
9. Selvarajah, G.T.; Kirpensteijn, J. Prognostic and predictive biomarkers of canine osteosarcoma. *Vet. J.* **2010**, *185*, 28–35. [[CrossRef](#)]

10. Szewczyk, M.; Lechowski, R.; Zabielska, K. What do we know about canine osteosarcoma treatment?—Review. *Vet. Res. Commun.* **2014**, *39*, 61–67. [[CrossRef](#)]
11. Ostrander, E.A.; Dreger, D.L.; Evans, J.M. Canine Cancer Genomics: Lessons for Canine and Human Health. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **2019**, *7*, 449–472. [[CrossRef](#)]
12. Pasic, I.; Lipton, J.H. Current approach to the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Leuk. Res.* **2017**, *55*, 65–78. [[CrossRef](#)]
13. Wang, H.; Khor, T.O.; Shu, L.; Su, Z.-Y.; Fuentes, F.; Lee, J.H.; Kong, A.-N.T. Plants vs. Cancer: A Review on Natural Phytochemicals in Preventing and Treating Cancers and Their Druggability. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2012**, *12*, 1281–1305. [[CrossRef](#)]
14. Isani, G.; Bertocchi, M.; Andreani, G.; Farruggia, G.; Cappadone, C.; Salaroli, R.; Forni, M.; Bernardini, C. Cytotoxic Effects of *Artemisia annua* L. and Pure Artemisinin on the D-17 Canine Osteosarcoma Cell Line. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 1615758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Levine, C.B.; Bayle, J.; Biourge, V.; Wakshlag, J.J. Cellular effects of a turmeric root and rosemary leaf extract on canine neoplastic cell lines. *BMC Vet. Res.* **2017**, *13*, 388. [[CrossRef](#)]
16. Dabas, D.; Shegog, R.; Ziegler, G.; Lambert, J. Avocado (*Persea americana*) Seed as a Source of Bioactive Phytochemicals. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 6133–6140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. D'Ambrosio, S.M.; Han, C.; Pan, L.; Kinghorn, A.D.; Ding, H. Aliphatic acetogenin constituents of avocado fruits inhibit human oral cancer cell proliferation by targeting the EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK1/2 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *409*, 465–469. [[CrossRef](#)]
18. Lee, E.A.; Angka, L.; Rota, S.-G.; Hanlon, T.; Mitchell, A.; Hurren, R.; Wang, X.M.; Gronda, M.; Boyaci, E.; Bojko, B.; et al. Targeting Mitochondria with Avocatin B Induces Selective Leukemia Cell Death. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 2478–2488. [[CrossRef](#)]
19. Butt, A.J.; Roberts, C.G.; Seawright, A.A.; Oelrichs, P.B.; MacLeod, J.K.; Liaw, T.Y.; Kavallaris, M.; Somers-Edgar, T.J.; Lehrbach, G.M.; Watts, C.K.; et al. A novel plant toxin, persin, with in vivo activity in the mammary gland, induces Bim-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 2300–2309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Ding, H.; Han, C.; Guo, D.; Chin, Y.-W.; Ding, Y.; Kinghorn, A.D.; D'Ambrosio, S.M. Selective Induction of Apoptosis of Human Oral Cancer Cell Lines by Avocado Extracts via a ROS-Mediated Mechanism. *Nutr. Cancer* **2009**, *61*, 348–356. [[CrossRef](#)]
21. Rosenblat, G.; Meretski, S.; Segal, J.; Tarshis, M.; Schroeder, A.; Zanin-Zhorov, A.; Lion, G.; Ingber, A.; Hochberg, M. Polyhydroxylated fatty alcohols derived from avocado suppress inflammatory response and provide non-sunscreen protection against UV-induced damage in skin cells. *Arch. Dermatol. Res.* **2010**, *303*, 239–246. [[CrossRef](#)]
22. Lara-Márquez, M.; Báez-Magaña, M.; Raymundo-Ramos, C.; Spagnuolo, P.A.; Macías-Rodríguez, L.; Salgado-Garciglia, R.; Ochoa-Zarzosa, A.; López-Meza, J.E. Lipid-rich extract from Mexican avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) induces apoptosis and modulates the inflammatory response in Caco-2 human colon cancer cells. *J. Funct. Foods* **2020**, *64*, 103658. [[CrossRef](#)]
23. Ochoa-Zarzosa, A.; Báez-Magaña, M.; Guzmán-Rodríguez, J.J.; Flores-Alvarez, L.J.; Lara-Márquez, M.; Zavala-Guerrero, B.; Salgado-Garciglia, R.; López-Gómez, R.; López-Meza, J.E. Bioactive Molecules from Native Mexican Avocado Fruit (*Persea americana* var. *drymifolia*): A Review. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2021**, *76*, 133–142. [[CrossRef](#)]
24. Báez-Magaña, M.; Ochoa-Zarzosa, A.; Alva-Murillo, N.; Salgado-Garciglia, R.; López-Meza, J.E. Lipid-rich extract from Mexican avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) reduces *Staphylococcus aureus* internalization and regulates innate immune response in bovine mammary epithelial cells. *J. Immunol. Res.* **2019**, *2019*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Sánchez-Albarrán, F.; Salgado-Garciglia, R.; Molina-Torres, J.; López-Gómez, R. Oleosome Oil Storage in the Mesocarp of Two Avocado Varieties. *J. Oleo Sci.* **2019**, *68*, 87–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Lu, Q.-Y.; Arteaga, J.R.; Zhang, Q.; Huerta, S.; Go, V.L.W.; Heber, D. Inhibition of prostate cancer cell growth by an avocado extract: Role of lipid-soluble bioactive substances. *J. Nutr. Biochem.* **2005**, *16*, 23–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Helmerick, E.C.; Loftus, J.; Wakshlag, J.J. The effects of baicalein on canine osteosarcoma cell proliferation and death. *Vet. Comp. Oncol.* **2012**, *12*, 299–309. [[CrossRef](#)]
28. Alkhalaf, M.I.; Alansari, W.S.; Ibrahim, E.A.; Elhalwagy, M.E. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activities of avocado (*Persea americana*) fruit and seed extract. *J. King Saud Univ.* **2019**, *31*, 1358–1362. [[CrossRef](#)]
29. Widiyastuti, Y.; Pratiwi, R.; Riyanto, S.; Wahyuono, S. Cytotoxic activity and apoptosis induction of avocado *Persea americana* Mill. seed extract on MCF-7 cancer cell line. *Indones. J. Biotechnol.* **2018**, *23*, 61–67. [[CrossRef](#)]
30. Poradowski, D.; Obmińska-Mrukowicz, B. Effect of selected nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the viability of canine osteosarcoma cells of the D-17 line: In vitro studies. *J. Vet. Res.* **2019**, *63*, 399–403. [[CrossRef](#)]
31. Park, H.; Park, S.; Bazer, F.W.; Lim, W.; Song, G. Myricetin treatment induces apoptosis in canine osteosarcoma cells by inducing DNA fragmentation, disrupting redox homeostasis, and mediating loss of mitochondrial membrane potential. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 7457–7466. [[CrossRef](#)]
32. Hosoya, K.; Murahari, S.; Laio, A.; London, C.A.; Couto, C.G.; Kisseberth, W.C. Biological activity of dihydroartemisinin in canine osteosarcoma cell lines. *Am. J. Vet. Res.* **2008**, *69*, 519–526. [[CrossRef](#)]
33. Ding, H.; Chin, Y.-W.; Kinghorn, A.D.; D'Ambrosio, S.M. Chemopreventive characteristics of avocado fruit. *Semin. Cancer Biol.* **2007**, *17*, 386–394. [[CrossRef](#)]
34. Zhao, J.; Li, R.; Pawlak, A.; Henkowska, M.; Sysak, A.; Wen, L.; Yi, J.-E.; Obmińska-Mrukowicz, B. Antitumor Activity of Betulinic Acid and Betulin in Canine Cancer Cell Lines. *In Vivo* **2018**, *32*, 1081–1088. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Fernandes, I.; Melo-Alvim, C.; Lopes-Brás, R.; Esperança-Martins, M.; Costa, L. Osteosarcoma Pathogenesis Leads the Way to New Target Treatments. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

-
36. Guzmán-Rodríguez, J.J.; López-Gómez, R.; Salgado-Garciglia, R.; Ochoa-Zarzosa, A.; López-Meza, J.E. The defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *82*, 620–627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 37. Aapro, M.; Alberts, D.; Salmon, S. Interactions of human leukocyte interferon with vinca alkaloids and other chemotherapeutic agents against human tumors in clonogenic assay. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1983**, *10*, 161–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7.1.1 Complementary results

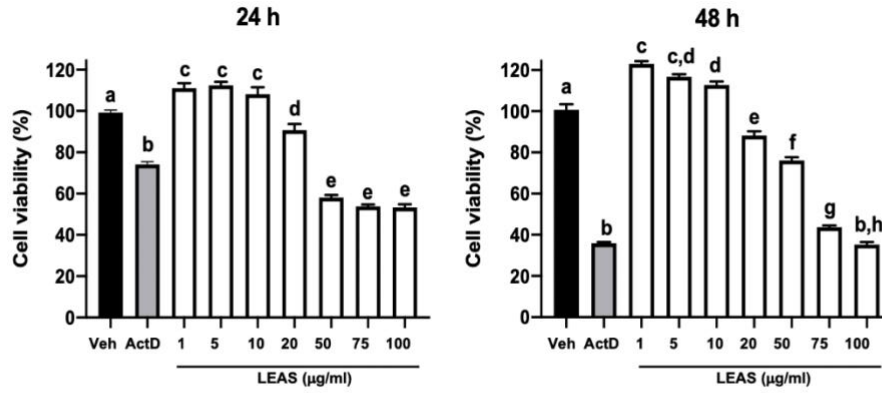


Figure S1. Effect of LEAS on MDCK cell line viability. Cells were treated with LEAS (1, 5, 10, 20, 50, 75, and 100 µg/ml) and cell viability was evaluated by MTT assays at 24 h and 48 h. Cell viability is shown with respect to cells treated with vehicle (DMSO 0.1%). Actinomycin D (ActD) was used as a positive control (80 µg/ml). Data represent the mean of three independent experiments performed in triplicate. Different letters denote significant differences within the treatments (one-way ANOVA and Tukey's pairwise comparison, $P < 0.05$).

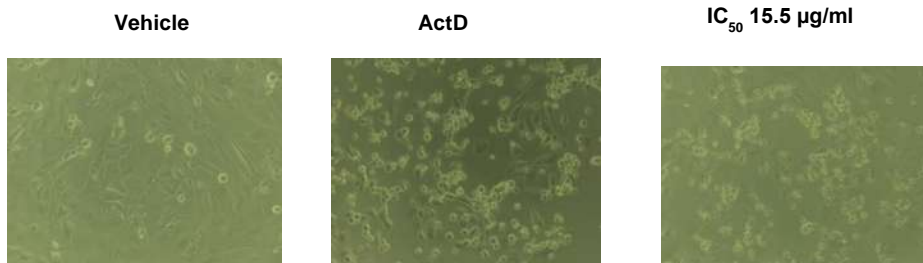


Figure 3. D-17 cell line morphology after different treatments at 48 h, taken by light field microscopy are shown.

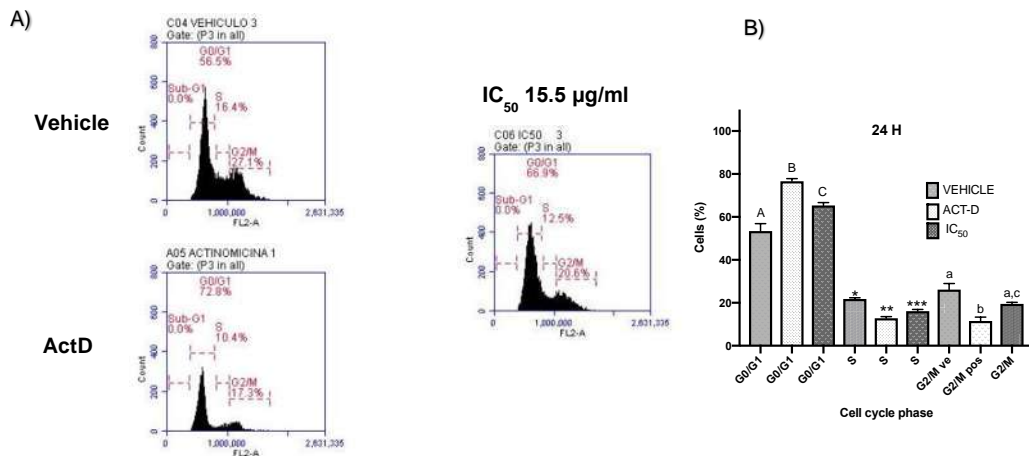


Figure 4. Effect of LEAS on cell cycle progression. The cycle cell phases were determined by flow cytometry using propidium iodide (PI). Cells were treated for 24 h with LEAS IC₅₀, vehicle or Act D. **A)** Representative histograms are showed. **B)** The graphic shows percentage of cells in different cycle cell phases. Each bar shows the mean of triplicates ± SE of two independent experiments. Different letters denote significant differences in all values compared with each other (one-way ANOVA and Tukey's pairwise comparison, $P < 0.05$).

Table 3. Drug interaction effects of LEAS with cytostatic drugs. Interaction between LEAS and cisplatin, carboplatin or doxorubicin in canine osteosarcoma D 17 cells after 72 h incubation. P-values (in parentheses) of 0.05 or less were considered significant (bold). For definitions see Materials and Methods. SYN, synergistic; SA, sub-additive; ANT, antagonistic.

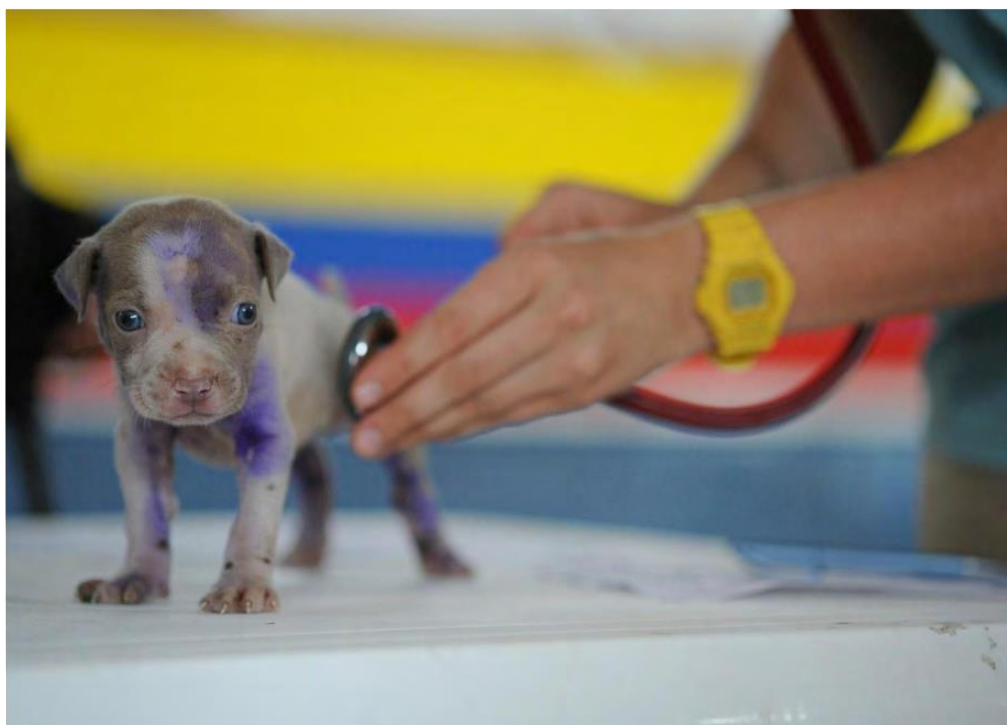
	LEAS (µg/ml)		
	5	10	20
Cisplatin (µM)	3.34	(0.0001) SYN	(<0.0001) SYN
	16.7	(<0.0001) SYN	(<0.0001) SYN
	33.4	(0.0074) SYN	(0.0014) SYN
	66.8	(0.0278) ANT	(0.5511) ANT
Carboplatin (µM)	50	(0.0001) SYN	(<0.0001) SYN
	100	(0.0002) SYN	(<0.0001) SYN
	200	(<0.0001) SYN	(<0.0001) SYN
	400	(0.6488) ANT	(0.0012) ANT
Doxorubicin (nM)	46.8	(0.1526) ANT	(0.0317) SA
	93.75	(0.0696) ANT	(0.0011) SA
	187.5	(0.2757) SA	(0.0009) SA
	375	(0.2133) SA	(0.0007) SYN

7.2 Capítulo 2. “Mi perro, ¿Podría tener cáncer?”

ARTÍCULO

Mi perro, ¿podría tener cáncer?

Salvador Padilla Arellanes y Joel Edmundo López Meza



M.C. Salvador Padilla Arellanes, Médico Veterinario Zootecnista. Actualmente estudiante en el Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, Opción Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

salvador25@hotmail.com

D.C. Joel Edmundo López Meza, Profesor e Investigador del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

elmeza@umich.mx

El cáncer es una de las principales causas de muerte en los seres humanos, después de las enfermedades cardiovasculares, mientras que **en los perros y gatos constituye la principal causa de muerte**. Esta enfermedad también es común en los animales de granja como las vacas, cerdos y aves de corral, incluso, existe evidencia de ella en los dinosaurios.

Entre las mascotas, los perros y los gatos pueden desarrollar algún tipo de cáncer como las neoplasias (benignas y malignas), que se presentan en cualquier órgano del cuerpo con diferente comportamiento y signología clínica. El avance de la ciencia en los últimos años ha permitido desarrollar mejores métodos de diagnóstico de esta enfermedad, tanto en los seres humanos como en los animales, por lo que las mascotas hoy en día tienen

una mejor oportunidad de ser tratadas con éxito. En un momento inesperado de la vida de nuestro perro, podría ser diagnosticado con cáncer y de eso precisamente te hablamos en este artículo.

El cáncer afecta animales domésticos y silvestres

Se ha documentado que cualquier animal, silvestre o doméstico, puede desarrollar algún tipo de cáncer. Por ejemplo, en el demonio de Tasmania se ha demostrado que lo afecta un tipo de cáncer que se puede pasar de un animal a otro a través de la mordida. Interesantemente, se ha descubierto que los dinosaurios también presentaban cáncer, ya que, en un estudio realizado en 2003, donde investigadores escanearon por medio de fluoroscopia y tomografía computarizadas, más de diez mil vértebras de dinosaurios en la búsqueda de tumores, encontrando alrededor del 3 % de estos en los dinosaurios con picos (*Cretaceous hadrosaurs*), pero no en otras especies.

En cuanto a los animales domésticos, particularmente las mascotas como perros y gatos, pero también en hurones, hámster, erizos e incluso peces, se puede desarrollar cáncer. **Existen más de cien tipos de cáncer en las mascotas**, los tipos más comunes son los de la piel. Muchas de estas neoplasias malignas se presentan en animales adultos o viejos, pero son más comunes en los perros.

¿Por qué mi perro puede desarrollar cáncer?

Se sabe que aproximadamente uno de cada cuatro perros, en algún momento de su vida tendrá tumores, y casi la mitad de los perros mayores de diez años desarrollarán cáncer. Los perros contraen el cáncer aproximadamente con la misma frecuencia que los humanos, mientras que hay menos información sobre la frecuencia de cáncer en los gatos.

Existen muchas **similitudes en la presentación del cáncer en los seres humanos y en animales** domésticos como los perros. Se ha visto que el cáncer de hueso es más frecuente en el perro (osteosarcoma), y también es el más común en los adolescentes; los tumores de la glándula mamaria tienden a diseminarse a los huesos con la misma frecuencia, tanto en mujeres como en perras; y, el cáncer de próstata solo se presenta en hombres y perros.

¿Qué es una neoplasia o cáncer?

El crecimiento anormal e incontrolado de células o tejidos en el cuerpo se llama neoplasia o tumor, que puede ser benigno o maligno. Las neoplasias benignas tienden a crecer lentamente y no desplazan a los tejidos corporales que la rodean, además de que no se extienden por todo el cuerpo; mientras que las neoplasias malignas, determina-





En el laboratorio se pueden observar al microscopio las células cancerosas del perro. Fotografía: Padilla-Arellanes S.

das como cáncer, pueden ser impredecibles y crecer a diversos ritmos (a veces rápidamente).

Hay muchos tipos de cáncer como se mencionó anteriormente, y estos pueden comportarse de manera muy diferente. Algunos tienen la habilidad de diseminarse a otros sitios del cuerpo, incluso a sitios muy distantes del tumor original. Esto sucede debido a que las células cancerosas entran a los vasos sanguíneos o linfáticos y pueden ser transportadas a otros órganos, fenómeno conocido como metástasis.

¿Cómo darnos cuenta si nuestro perro tiene alguna neoplasia o cáncer?

Al igual que en los seres humanos, los perros pueden desarrollar neoplasias en diferentes partes del cuerpo. **Los signos clínicos son muy similares a los presentes en los seres humanos**, y dependerán del tipo de cáncer. Sin embargo, muchos de estos signos se pueden observar en otras condiciones de enfermedad que no sea cáncer, por lo que es recomendable la atención inmediata del médico veterinario para determinar la causa.

Diagnóstico de cáncer en las mascotas, principalmente en el perro

Lo primero que se debe hacer es visitar al médico veterinario de cabecera, quien realizará una re-

visión minuciosa y completa a la mascota. Además, para poder determinar la extensión de la enfermedad, el médico veterinario puede solicitar varios estudios, los cuales incluyen pruebas de sangre, orina y excremento como primera instancia o pruebas de gabinete; posteriormente podrá realizar estudios de rayos X o ultrasonido.

En la mayoría de las neoplasias, la **citología con aguja delgada** (extracción de las células neoplásicas por medio de una jeringa para analizarlas por microscopía), es una herramienta muy útil para diagnosticar el tipo de neoplasia; sin embargo, para muchas neoplasias será necesario realizar una **biopsia** (extracción de un fragmento del tejido sospechoso) para determinar específicamente si es benigna o maligna.

Otros estudios que pueden ser solicitados incluyen: endoscopías, radiografías con medios de contraste, tomografías computarizadas y resonancias magnéticas, además de aspirados con jeringa de los nódulos linfáticos y la médula ósea, con el objeto de determinar si el cáncer se ha diseminado a otros sitios.

Con los resultados de estos estudios, el médico veterinario podrá determinar el tipo y extensión de la neoplasia que presenta la mascota, y con ello, establecer las opciones de tratamiento más adecuadas o remitir a la mascota con un médico

veterinario más especializado en cáncer (oncólogo veterinario).

Tratamientos para el cáncer en perros

Existen varios tipos de tratamientos que serán similares para otras mascotas, el más utilizado en la actualidad es la **cirugía**, pero también existen muchos protocolos de quimioterapia (medicamentos específicos para el cáncer). Otra opción de tratamiento es la **radioterapia**; sin embargo, esta solo se encuentra disponible en algunos hospitales veterinarios muy especializados y es muy costosa. Actualmente se está investigando con la **inmunoterapia** (células de las defensas del cuerpo específicas contra el cáncer y otras enfermedades), con resultados prometedores. Cabe recalcar que dependiendo del tipo de cáncer y la magnitud de la enfermedad, se pueden utilizar dos o más tipos de terapia en la misma mascota.

Es importante mencionar que algunos tipos de neoplasia se pueden curar de manera definitiva, mientras que en otras, solo se puede controlar su rápida propagación a otras partes del cuerpo, lo que ayuda a prolongar la vida y comodidad de la mascota, pero todo depende de la etapa en que se encuentra la enfermedad y del tipo de cáncer. Sin embargo, es importante considerar la eutanasia (muerte asistida con medicamentos de manera ética) cuando la mascota tiene un cáncer en etapa avanzada, y en la que ningún tratamiento será exitoso; también cuando los costos son muy elevados y la familia no los puede pagar; y, el más importante, cuando la mascota esté sufriendo y teniendo una calidad de vida muy pobre.

¿Se puede prevenir el cáncer en las mascotas?

En la actualidad se conoce poco sobre el origen de la mayoría de las neoplasias en los animales, por lo que la prevención puede ser difícil. En los perros existen razas con mayor predisposición a presentar cáncer como el bóxer y el cobrador dorado (Golden retriever), por lo que es importante que, al adquirir una mascota, se pregunte al médico veterinario sobre este riesgo.

Es posible reducir el riesgo de presentación del cáncer solo en ciertas circunstancias, por ejemplo, la **esterilización temprana**, es decir, antes de que



cumpla una perra un año de edad, disminuye el riesgo de presentar cáncer en glándula mamaria y ovario. En el caso de los perros machos, la esterilización temprana también disminuirá la presentación de cáncer testicular y prostático.

También existen estudios que relacionan los **hábitos alimenticios o el medio ambiente** donde se desarrolla la mascota, por ejemplo, en hogares donde las mascotas están en contacto prolongado con humo de tabaco, estas tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer.



Emory University (2020). «Cáncer en animales domesticados», en *Cancer Quest*. Emory Winship Cancer Institute.
<https://www.cancerquest.org/es/biologia-del-cancer/cancer-en-animales-domesticados>

FDA (2020). «Mi perro tiene cáncer; ¿qué necesito saber?», en *U.S. Food & Drug Administration (FDA)*.

<https://www.fda.gov/consumers/articulos-en-espanol/mi-perro-tiene-cancer-que-necesito-saber>

Veterinary Cancer Society (s/a). «Cáncer en animales». Asociación Americana de Médicos Veterinarios.
https://ebusiness.avma.org/files/productdownloads/cancer_brochure_sp.pdf

8.- DISCUSIÓN

El osteosarcoma es una enfermedad agresiva y devastadora tanto en los seres humanos como en los perros, por lo que se requiere de la búsqueda de opciones de tratamiento alternativas para tener un mejor éxito a largo plazo (Ehrhart, 2020). Los tratamientos actuales en pacientes con osteosarcoma tanto humanos como caninos son idénticos, ya que diversos estudios han revelado una marcada conservación genética de este padecimiento en ambas especies, con alteraciones moleculares compartidas en diferentes vías involucradas en el desarrollo del cáncer, además de compartir amplificaciones de oncogenes conocidos (Fernandes, 2021). Los perros también comparten factores medioambientales con los seres humanos y poseen presentaciones clínicas similares, incluyendo progresión, resistencia, recurrencia y metástasis. Lo más importante es que los perros con osteosarcoma tienen un curso de la enfermedad más corto que los seres humanos, lo cual significa que los descubrimientos terapéuticos podrían ser hechos más rápidamente en los perros y así poder ser extrapolados a estudios en seres humanos (Somarelli, 2020).

En la búsqueda de nuevos tratamientos contra el osteosarcoma, se han estudiado en las últimas décadas diferentes opciones de tratamiento tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha evaluado una vacuna contra el osteosarcoma canino basada en la bacteria gram positiva *Listeria monocytogenes*, que en un estudio inicial en perros prolongó el tiempo de supervivencia con respecto a un grupo de perros control con cuidados estándar; sin embargo, se observaron efectos adversos en el 8% de los perros (n=49) (Musser, 2020). También se han realizado estudios con algunos antiinflamatorios no esteroideos como el carprofeno y el ácido tolfenámico, los cuales fueron citotóxicos contra la línea celular D-17 (Poradowsky, 2019). Previamente, en nuestro grupo de trabajo se reportaron los efectos antiinflamatorios de LEAS sobre células de epitelio mamario bovino (Báez-Magaña, 2019). En estudios posteriores será necesario evaluar la respuesta inflamatoria de la línea celular D-17 regulada por LEAS y determinar su contribución en la actividad citotóxica.

Existe la necesidad para reducir las pruebas en animales debido a las legislaciones actuales, ha desviado la atención de la comunidad científica al uso de cultivos celulares, en particular, la línea celular D-17 de osteosarcoma canino (Henklewska, 2019; Lee, 2020). De acuerdo a lo descrito previamente, en este trabajo se utilizó la línea celular D-17 como modelo de estudio. Esta línea ha sido utilizada para evaluar nuevos agentes terapéuticos contra el osteosarcoma, por ejemplo, se utilizó para evaluar los efectos de la curcumina, uno de los compuestos principales de la *Curcuma longa*. Este compuesto fue citotóxico a través de la activación de la vía extrínseca de la apoptosis mediada por caspasas (Peixoto, 2020). Por otra parte, el flordizín docosahexaenoato (PZ-DHA), un compuesto sintetizado del flordizín, un polifenol natural, y del ácido docosahexaenoico, un ácido grado omega-3, demostró actividad citotóxica dependiente de la dosis en diferentes líneas celulares cancerosas de origen humano, así como en la línea celular D-17 de osteosarcoma canino (Murray, 2021). Estos estudios demuestran la utilidad de esta línea celular para evaluar compuestos de origen vegetal con potencial anticanceroso contra el osteosarcoma.

Numerosos estudios han evaluado las propiedades citotóxicas de los compuestos de diversos tipos de aguacate, pero principalmente con los del cultivar Hass, contra diferentes tipos de líneas celulares de cáncer de próstata, colon, oral y leucemia (Lu, 2005; D'Ambrosio, 2011; Lee, 2015; Lara-Márquez, 2020). Los lípidos de la pulpa del aguacate nativo mexicano han atraído la atención por sus propiedades biológicas, aunque las propiedades nutraceuticas de los lípidos presentes en la semilla han sido poco estudiadas. Sin embargo, en nuestro conocimiento, los lípidos de aguacate no han sido evaluados aún en cáncer de hueso, como el osteosarcoma, el cual es la neoplasia más prevalente en el sistema músculo esquelético tanto de los seres humanos como del perro. En este estudio, LEAS disminuyó la viabilidad de la línea D-17 a través de la inducción de apoptosis, la cual se relacionó con la producción de ROS y la despolarización de la membrana mitocondrial. También, LEAS favoreció el arresto del ciclo celular en la fase G0/G1. Además, mejoró la citotoxicidad de diferentes quimioterapéuticos y podría tener un uso potencial en tratamientos combinados para el osteosarcoma canino. Estos resultados coinciden con los efectos

citotóxicos reportados previamente para la curcumina y polifenoles en esta línea celular (Peixoto, 2020; Murray, 2021).

En este trabajo, LEAS exhibió efectos citotóxicos sobre células D-17 de osteosarcoma canino ($IC_{50} = 15.5 \mu\text{g/mL}$) de manera dependiente de la concentración, resultados similares a los reportados con otros extractos de plantas sobre esta línea celular D-17. Isani (2019) reportó los efectos citotóxicos de un extracto de ajeno dulce y artemisinina con una IC_{50} de $65 \mu\text{M}$ para un extracto hidroalcohólico y $548 \mu\text{M}$ para el estándar puro. También la citotoxicidad de la baicaleina (un flavonoide) fue evaluado en tres líneas celulares de osteosarcoma (HMPOS, D-17 y OS2.4) con concentraciones citotóxicas en el rango de 1 a $25 \mu\text{M}$ (Halmerick *et al.*, 2012). El nanoclinoptilolito, un antidiarreico natural e inmunomodulador, ha demostrado tener efectos citotóxicos en diferentes líneas celulares de cáncer, en el caso de la línea celular D-17 de osteosarcoma canino demostró ser citotóxico a bajas concentraciones activando el mecanismo de apoptosis, con un incremento de actividad de caspasa 3/7 y la disminución de la expresión de la proteína anti-apoptótica *BCL2* y el aumento de la expresión de la proteína pro-apoptótica *BAX* (Alkim, 2020). Estos estudios demuestran que las moléculas bioactivas de origen vegetal son un alternativa para el desarrollo de productos contra el osteosarcoma, ya que activan la muerte celular programada de las células D-17.

Diversos extractos obtenidos de la semilla de aguacate han sido reportados con efectos citotóxicos hacia las células cancerosas. Alkhalif (2019) evaluó un extracto lipídico de la semilla de aguacate que exhibió actividades anticancerosas de manera dependiente de la concentración sobre la línea celular HCT-116 de cáncer de colon y la línea celular HePG1 de cáncer de hígado, ambas líneas de origen humano. Por otro lado, un extracto clorofórmico de semilla de aguacate mostró una fuerte actividad citotóxica contra células MCF-7 con una IC_{50} de $94.87 \mu\text{g/mL}$ (Widiyastuti, 2018).

En la mayoría de los casos, las células cancerosas, mantienen un crecimiento acelerado y tiempos de sobrevida mayores que las células sanas, debido a que suprimen los procesos de apoptosis. En este trabajo, la citotoxicidad de LEAS sobre

la línea celular D-17 estuvo relacionada a la activación de mecanismos de apoptosis, tanto por la vía extrínseca como la vía intrínseca. Además, se detectó un incremento en la activación de la caspasa 8 y la caspasa 9. La activación de las dos rutas de apoptosis por efecto de los lípidos de aguacate ha sido reportada por otros grupos de investigación en células de cáncer oral (Ding, 2009) y células de cáncer de mama (Butt, 2006).

Además de la inducción de apoptosis, LEAS indujo la pérdida del potencial de membrana mitocondrial en las células D-17. Un efecto similar ha sido reportado con derivados de ácidos grasos, los cuales indujeron la pérdida del potencial de membrana mitocondrial en células de cáncer oral (Ding, 2009). La disfunción de la membrana mitocondrial es un mecanismo importante para la activación de la apoptosis en células cancerosas tratadas con diferentes quimioterapéuticos. La apertura de poros transitorios afecta la permeabilidad mitocondrial provocando la despolarización del potencial transmembrana, favoreciendo la liberación de citocromo c y otras proteínas pro-apoptóticas. También LEAS indujo la producción de ROS, la cual es consistente con la activación de la vía intrínseca de la apoptosis. Resultados similares fueron obtenidos en un estudio tratando las células D-17 con el flavonoide miricetina (Park, 2018). En otro estudio utilizando la dihidroartemisina, la muerte celular vía daño oxidativo fue inducida por la producción de ROS en las células de osteosarcoma (Hosoya, 2008).

El crecimiento de células tumorales puede ser inhibido en cualquier fase del ciclo celular, lo cual provoca su arresto. Los fitoquímicos extraídos de *P. americana* inducen el arresto del ciclo celular (Ding, 2007). Nuestros datos indican que LEAS afecta el ciclo celular en las células D-17, deteniendo las células en la fase G0/G1. En congruencia con este estudio, en un trabajo utilizando el ácido betulínico (un triterpenoide), se reportó que éste causó la detención del ciclo celular en la fase S en células D-17 (Zhao, 2018). En el mismo sentido, el flavonoide baicaleína arrestó el ciclo celular en tres líneas celulares de osteosarcoma canino, con un incremento significativo en la fase G0/G1 y una disminución en la G2/M (Helmerick, 2012).

Los efectos adversos y toxicidad de la quimioterapia en pacientes con cáncer permanecen como un problema mayor, por lo tanto, la búsqueda de alternativas más seguras, como los productos de origen natural, para ser utilizados como mono o terapia adjunta con los quimioterapéuticos utilizados en la actualidad, es una prioridad en la investigación actual en los tratamientos contra el cáncer (Wang, 2012; Szewczyk, 2014). Por esta razón, son necesarios nuevos medicamentos y blancos terapéuticos, para mejorar el tiempo de supervivencia en los pacientes con osteosarcoma y reducir al máximo los efectos adversos secundarios asociados con los tratamientos convencionales (Szewczyk, 2014; Fernandes, 2021). La combinación de dos o más agentes quimioterapéuticos permite disminuir la dosis de medicamentos y por consiguiente los efectos adversos, además de reducir el desarrollo de resistencia por las células blanco y proveer el potencial para el sinergismo de los efectos combinados. Los agentes quimioterapéuticos más utilizados en el tratamiento del osteosarcoma canino son la doxorubicina y los compuestos basados en platino como el carboplatino y el cisplatino (Selmic, 2014; Szewczyk, 2014). En este trabajo, la citotoxicidad de doxorubicina, carboplatino y cisplatino fueron evaluados en combinación con LEAS sobre las células D-17.

Los resultados de los estudios de combinación demostraron sinergismo de los tres fármacos con LEAS y un aumento en la sensibilidad a los medicamentos citostáticos en las células D-17. El sinergismo de LEAS con otros medicamentos ya utilizados podría limitar algunos de los efectos adversos a largo plazo asociados con altas dosis. En un estudio evaluando 5 líneas celulares de osteosarcoma canino (OSCA-8, OSCA-16, OSCA-40, Abraham y D-17) se observó un incremento en la expresión de la exportina-1 (XPO1), una proteína relacionada a la proliferación y supervivencia celular en cáncer y el verdinexor un inhibidor de esta proteína, a bajas concentraciones, exhibió inhibición del crecimiento celular e incrementó la actividad de la caspasa 3/7. La combinación del verdinexor y la doxorubicina provocaron una potente inhibición de la viabilidad celular y demostraron actividad sinérgica en tres de las 5 líneas de osteosarcoma canino evaluadas (Breitbach 2021). También estudios previos han demostrado que la doxorubicina conjugada con 4 nmol de nanopartículas

de oro estabilizadas con glutatión (Au-GSH-Dox), aumentaron la actividad antitumoral y citotoxicidad en la línea celular D-17 de osteosarcoma canino (Malek, 2021).

Por último, el siguiente modelo muestra los mecanismos involucrados en la citotoxicidad causada por las moléculas presentes en LEAS sobre las células D-17 de osteosarcoma canino (Figura 5).

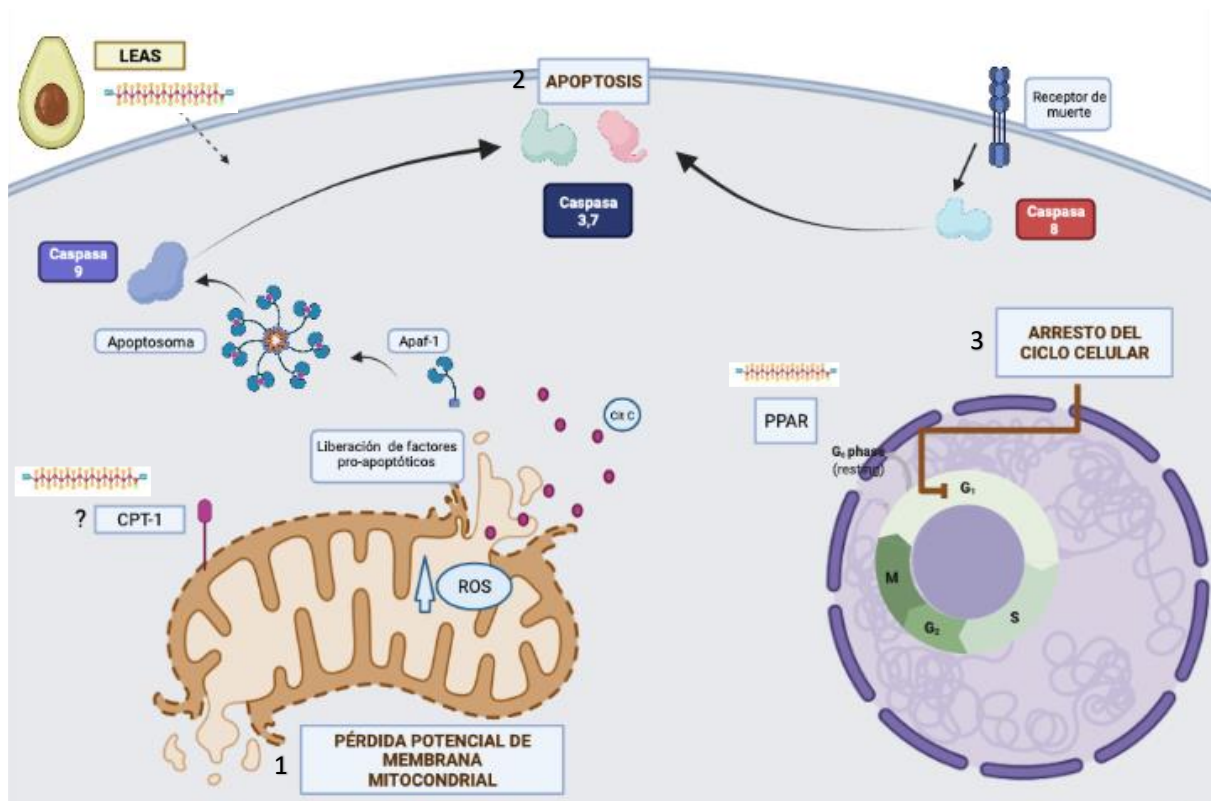


Figura 5. Modelo propuesto de los mecanismos de citotoxicidad de LEAS sobre las células D-17. 1) Pérdida del potencial de membrana y aumento en la producción de ROS, 2) Apoptosis por la vía extrínseca e intrínseca, 3) Arresto del ciclo celular en etapa G₀/G₁. (Creado en BioRender.com)

9.- CONCLUSIÓN

El extracto lipídico (LEAS) de la semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) fue citotóxico para la línea celular D-17 de osteosarcoma canino a través de la activación de apoptosis dependiente de caspasas y detuvo el ciclo celular, observando un incremento en la proporción de células en la fase G0/G1. Además, LEAS indujo significativamente la pérdida del potencial de membrana mitocondrial e incrementó la producción de especies reactivas de oxígeno. Así mismo, presentó una actividad citotóxica sinérgica con el cisplatino, carboplatino y doxorrubicina, lo cual mejoró el efecto sobre las células D-17.

10.- REFERENCIAS

Abdel-Moneim, A.; Ahmed, O.M.; Fahim, H.I.; Mohamed, E.E. The Preventive Effects of Avocado Fruit and Seed Extracts on Cardio-nephrotoxicity Induced by Diethylnitrosamine/2-acetylaminoflurine in Wistar Rats. **Bas Sci Med.** 2017, 6(1): 4-13.

Adams, V.J.; Evans, K.M.; Sampson, J.; Wood, J.L. Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. **J Small Anim Pract.** 2010, 51, 512–524.

Alberts, B., Johnson, A. y Lewis, J. Cancer treatment: Present and future. In Molecular Biology of the Cell, 2002 (4th edition). New York: Garland Science. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26811/>

Alfranca, L.; Martinez-Cruzado, J.; Tornin, A.; Abarategi, T.; Amaral, E.; de Alava, P.; Menendez, J.; Garcia-Castro, R.; Rodriguez, R. Bone microenvironment signals in osteosarcoma development. **Cell Mol Life Sci.** 2015, 72, 3097-3113.

Alkhalaf, M.I.; Alansari, W.S.; Ibrahim, E.A.; Elhalwagy, M.E. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activities of avocado (*Persea americana*) fruit and seed extract. **J King Saud Univ.** 2019, 31, 1358–1362.

Alkim, P.; Kiral, F.; Ulutas, B. y Ekren, G.S. Cytotoxic and apoptotic effect of nanoclipoptilite on canine osteosarcoma cell lines. **J Vet Res.** 2020, 64, 589-596.

Alves S.I.R.; Magnani, M.; Medeiros, F.S.; Sabino, K.; de Souza, J.; Queiroga-Neto, V. Characterization of the chemical and structural properties of native and acetylated starches from avocado (*Persea americana* Mill.) seeds, **Int J Food Prop.** 2017, 20:sup1, S279-S289

Anand, P.; Kunnumakkara, A. B.; Kunnumakara, A. B.; Sundaram, C.; Harikumar, K. B.; Tharakan, S. T. y Aggarwal, B. B. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharm. Res.** 2008, 25, 2097–116.

Báez-Magaña, M.; Ochoa-Zarzosa, A.; Alva-Murillo, N.; Salgado-Garciglia, R.; López-Meza, J.E. Lipid-rich extract from Mexican avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) reduces *Staphylococcus aureus* internalization and regulates innate immune

response in bovine mammary epithelial cells. *J Immunol Res*. 2019, 1–10.

Baraona, C. M. and Sancho, B. E. Aguacate y mango. Fruticultura especial. 2000. Editorial Universidad Estatal a distancia.

Beeharry, N.; Lowe, J. E.; Hernandez, A. R.; Chambers, J. A.; Fucassi, F.; Cragg, P.J. y Green, I. C. Linoleic acid and antioxidants protect against DNA damage and apoptosis induced by palmitic acid. *Mut Res*. 2003, 530 (1– 2), 27–33.

Bonnett, B.; Egenvall, A.; Hedhammar, A.; Olson, P. Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995–2000: I. Breed, gender, age and cause-specific rates. *Acta Vet Scand*. 2005, 46:105–20.

Bora, S.P.; Narain, N.; Rocha, R.V.M.; Bora, P. S.; Narain, N.; Rocha, R. V. M. and Queiroz Paulo, M. Characterization of the oils from the pulp and seeds of avocado (cultivar: Fuerte) fruits. *Grasas y Aceites* 2001, 52 (3–4), 171–174.

Breibatch, J.T.; Louke, D.S.; Tobin S.J.; Watts, M. R.; Davies, A.E. y Fenger, J.M. The selective inhibitor of nuclear export (SINE) verdinexor exhibits biologic activity against canine osteosarcoma cell lines. *Vet Comp Oncol*. 2021, 19 362–373.

Buhyan, D.J.; Alsherbiny M.A.; Perera, S.; Low, M.; Basu, A.; Devi, A.A. et al. The Odyssey of bioactive compounds in avocado (*Persea americana*) and their health benefits. *Antioxidants*. 2019,8, 426.

Butt, A. J.; Roberts, C. G.; Seawright, A. A.; Oelrichs, P. B.; Macleod, J. K.; Liaw, T.Y. E. y Sutherland, R. L. A novel plant toxin, persin, with in vivo activity in the mammary gland, induces Bim-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *Mol Can Ther*. 2006, 5(9), 2300–2309.

Cavalcanti, J.N.; Amstalden, E.M.I.; Guerra, J.L.; Magna, L.C. Osteosarcoma in dogs: Clinical-morphological study and prognostic correlation. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2004, 41, 299–305.

Dabas, D.; Shegog, R. M.; Ziegler, G. R. y Lambert, J. D. Avocado (*Persea americana*) seed as a source of bioactive phytochemicals. *C Pharm Design*. 2013, 19(34), 6133–40.

Dabas,D.; Elias, R.J.; Ziegler, G.R.; Lambert, J.D. In Vitro Antioxidant and Cancer Inhibitory Activity of a Colored Avocado Seed Extract. *Int J Food Sci.* 2019, 7.

D'Ambrosio, S. M.; Han, C.; Pan, L.; Douglas Kinghorn, A.; Ding, H.; Kinghorn, A. y Ding, H. Aliphatic acetogenin constituents of avocado fruits inhibit human oral cancer cell proliferation by targeting the EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK1/2 pathway. *Bioch Bioph Res Comm.* 2011, 409 (3), 465–469.

D'Arcy, M. Cell Death. A review of the major forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Cell Biol Int.* 2019, 43, 582-592.

Davis, B.W. y Ostrander, E.A. Domestic dogs and cancer research: A breed-based genomics approach. *ILAR J.* 2014, 55, 59-68

Dernell, W.S.; Straw, R.C.; Withrow, S.J. Tumors of the Skeletal System. In *Small Animal Clinical Oncology*; Withrow, S.J., MacEwen, E.G., Eds.; W.B. Saunders: Philadelphia, PA, USA, 2001; pp. 378–417.

Di Stefano,V.; Avellone, G.; Bongiorno, D.; Indelicato, S.; Massenti, R.; Lo Bianco, R. Quantitative evaluation of the phenolic profile in fruits of six avocado (*Persea americana*) cultivars by ultra-high-performance liquid chromatography- heated electrospray-mass spectrometry. *Int J Food Prop.* 2017, 20:6, 1302-1312.

Ding, H.; Chin, Y. W.; Kinghorn, A. D.; Ambrosio, S. M. D. and D'Ambrosio, S. M. Chemopreventive characteristics of avocado fruit. *Sem Canc Biol.* 2007, 17(5), 386–394.

Ding, H.; Han, C.; Guo, D.; Chin, Y.-W.; Ding, Y.; Kinghorn, D. y D'Ambrosio, S. M. Selective induction of apoptosis of human oral cancer cell lines by avocado extracts via a ROS-mediated mechanism. *Nut Cancer.* 2009, 6, 348–56.

Dobson, J.M. Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs. *ISRN Vet Sci.* 2013, 941275.

Donnarumma, G.; Buommino, E.; Baroni, A.; Auricchio, L.; De Filippis, A.; Cozza, V.; Msika, P.; Piccardi, N. y Tufano, M.A. Effects of AV119, a natural sugar from avocado, on

Malassezia furfur invasiveness and on the expression of HBD-2 and cytokines in human keratinocytes. *Exp Derm.* 2007, 16 (11):912–919.

Edmunds, G.L.; Smalley, M.J.; Beck, S.; Errington, R.J.; Gould, S.; Winter, H; Brodbelt, DC; O'Neill, DG. Dog breeds and body conformations with predisposition to osteosarcoma in the UK: a case-control study. *Can Med Gen.* 2021, (8) 2.

Egenvall, A.; Nødtvedt, A.; von Euler, H. Bone tumors in a population of 400,000 insured Swedish dogs up to 10 y of age: Incidence and survival. *Can J Vet Res.* 2007, 71, 292–299.

Ehrhart, N.P.; Nic T.M.F. Tumors of the skeletal system. In: Thamm DH, DMV JML, eds. Withrow & Macewen's Small Animal Clinical Oncology. 6th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2020:524-564.

Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death *Toxicol Pathol.* 2007, 35, 495-516.

Ferlay J.; Ervik M.; Lam F.; Colombet M.; Mery L.; Piñeros M, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer; 2020 (<https://gco.iarc.fr/today>), consultado en febrero de 2021.

Fernandes, I.; Melo-Alvim, C.; Lopes-Brás, R.; Esperança-Martins, M.; Costa, L. Osteosarcoma Pathogenesis Leads the Way to New Target Treatments. *Int J Mol Sci.* 2021, 22, 813.

Flores-Alvarez, L.J.; Guzman-Rodríguez, J.J.; López-Gómez, R.; Salgado-Garciglia, R.; Ochoa-Zarzosa, A.; López-Meza, J.E. PaDef defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) is cytotoxic to K562 chronic myeloid leukemia cells through extrinsic apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018, 99, 10-18.

Gebhard, C.; Miller, I.; Hummel, K; Neschi, N.; Schlosser, S.; Walter, I. Comparative proteome analysis of monolayer and spheroid culture of canine osteosarcoma cells. *J Proteomics.* 2018,177:124-136

Güclü, G. Approach to osteosarcoma treatment to medicinal plants. In: Research in Medicinal and aromatic plants. Ed Iksad, 2020, 190-206.

Gustafson, D.L.; Duval, D.L.; Regan, D.P.; Thamm, D.H. Canine sarcomas as a surrogate for the human disease. *Pharmacol Ther.* 2018 Mar 9. pii: S0163-7258(18)30019-6.

Guzman-Rodríguez, J.J.; López-Gómez, R.; Suárez-Rodríguez, L.M.; Salgado-Garciglia, R.; Rodríguez-Zapata, L.C.; Ochoa-Zarzosa, A.; López-Meza, J.E. Antibacterial activity of defensin PaDef from avocado fruit (*Persea americana* var. *drymifolia*) expressed in endothelial cells against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Biomed Res Int.* 2013: 986273. pp. 1-25.

Guzman-Rodríguez, J.J.; López-Gómez, R.; Salgado-Garciglia, R.; Ochoa-Zarzosa, A.; López-Meza, J.E. The defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. *Biomed Pharmacother.* 2016, 82, 620-627.

Hanahan, D. Hallmarks of cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022, 12:31-46.

Hecht, S. S. (1999). Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. *JNCI J Nat Can Inst.* 91(14), 1194–1210.

Helmerick, E.C.; Loftus, J.; Wakshlag, J.J. The effects of baicalein on canine osteosarcoma cell proliferation and death. *Vet Comp Oncol.* 2012, 12, 299–309.

Henkewska, M.; Pawlak, A.; Kutkowska, J.; Pruchnik, H.; Rapak, A.; Obminska-Mrukowicz, B. In Vitro effects of the activity of novel platinum (II) complex in canine and human cell lines. *Vet Comp Oncol.* 2019, 17, 497–506.

Hosoya, K.; Murahari, S.; Laio, A.; London, C.A.; Couto, C.G.; Kisseberth, W.C. Biological activity of dihydroartemisinin in canine osteosarcoma cell lines. *Am J Vet Res.* 2008, 69, 519–526.

Isani, G.; Bertocchi, M.; Andreani, G.; Farruggia, G.; Cappadone, C.; Salaroli, R.; Forni, M.; Bernardini, C. Cytotoxic Effects of *Artemisia annua* L. and Pure Artemisinin on the D-17 Canine Osteosarcoma Cell Line. ***Oxid Med Cell.*** 2019, 1615758.

Jaffe, N.; Puri, A.; Gelderblom, H. Osteosarcoma: evolution of treatment paradigms. ***Sarcoma*** 2013, 203531.

Ji, J.; Zhang, L.; Wang, P.; Mu, Y. M.; Zhu, X. Y.; Wu, Y. Y. y Sun, X. Z. Saturated free fatty acid, palmitic acid, induces apoptosis in fetal hepatocytes in culture. ***Experimental and Toxicol Path.*** 2005, 56, 369–376.

Johnson, I. T. Phytochemicals and cancer. ***Proceed Nut Soc.*** 2007(66), 207–215.

Kansara, M.; Teng, M-W.; Smyth, M.J.; Thomas, D.M. Translational biology of osteosarcoma. ***Nat Rev Cancer.*** 2014, 14, 722-73

Kastenhuber, E.R.; Lowe, S.W. Putting p53 in Context. ***Cell.*** 2017, 170, 1062-78.

Khambete, N. y Kumar, R. Carcinogens and cancer preventors in diet. ***Int J Nut Pharma Neurol Dis.*** 2014, 4(1), 4.

Lara-Márquez, M. (2015). Efectos citotóxicos de ácidos grasos y derivados de ácidos grasos sobre células cancerosas. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Lara-Márquez, M.; Báez-Magaña, M.; Raymundo-Ramos, C.; Spagnuolo, P.A.; Macías-Rodríguez, L.; Salgado-Garciglia, R.; Ochoa-Zarzosa, A.; López-Meza, J.E. Lipid-rich extract from Mexican avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) induces apoptosis and modulates the inflammatory response in Caco-2 human colon cancer cells. ***J Funct Foods.*** 2020, 64, 103658.

LaRue, S.M.; Withrow, S.J.; Powers, B.E.; Wrigley, R.H.; Gillette, E.L.; Schwarz, P.D.; Straw, R.C. and Richter, S.L. Limb-sparing treatment for osteosarcoma in dogs. ***J Am Vet Med Assoc.*** 1989, 195, 1734-1744.

Lee, C.; Lin, Y.; Chang, W.; Lin, P.; Wu, Y. y Chang, J. Squamocin modulates histone H3 phosphorylation levels and induces G1 phase arrest and apoptosis in cancer cells.

BMC Cancer. 2011, 11, 58.

Lee, E. A.; Angka, L.; Rota, S. G.; Hanlon, T.; Hurren, R.; Wang, X. M. and Spagnuolo, P. A. Targeting mitochondria with Avocatin B induces selective leukemia cell death. **Cancer Res.** 2015, 75 (12), 2378–88.

Lee, J.; Moon, H.; Ku, B.; Lee, K.; Hwang, C.Y.; Baek, S.J. Anticancer effects of cold atmospheric plasma in canine osteosarcoma cells. **Int J Mol Sci,** 2020, 21:4556.

Levine, C.B.; Bayle, J.; Biourge, V.; Wakshlag, J.J. Cellular effects of a turmeric root and rosemary leaf extract on canine neoplastic cell lines. **BMC Vet Res.** 2017, 13, 388.

Lodish, H.; Berk, A.; Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Bretscher, A.; Ploegh, H. y Amon, A. (2013). Molecular cell biology (7th ed). New York: W. H. Freeman and Company.

Louie, S.; Roberts, L. y Nomura, D. K. Mechanisms linking obesity and cancer. **Mol Cell Biol.** 2013, 1831(10), 1499–508.

Lu, Q.-Y.; Arteaga, J.R.; Zhang, Q.; Huerta, S.; Go, V.L.W.; Heber, D. Inhibition of prostate cancer cell growth by an avocado extract: Role of lipid-soluble bioactive substances. **J Nutr Biochem.** 2005, 16, 23–30.

Malek, A.; Taciak, B.; Sobczak, K.; Grzelak, A.; Wójcik, M.; Mieczkowski, J.; Lechowski, R. y Zabielska-Koczywas, K.A. Enhanced cytotoxic effect of doxorubicin conjugated to glutathione-stabilized gold nanoparticles in canine osteosarcoma-in vitro studies. **Molecules.** 2021, 26, 3487.

Márquez-Ramírez, C.A.; Hernández de la Paz, J.L.; Ortiz-Avila, O. *et al.* Comparative effects of avocado oil and losartan on blood pressure, renal vascular function, and mitochondrial oxidative stress in hypertensive rats. **Nutrition** 2018, 54, 60-67.

Messerschmitt, P.J.; Garcia, R.M.; Abdul-Karim, F.W.; Greenfield, E.M.; Getty, P.J. Osteosarcoma. **J Am Acad Orthop Surg.** 2009, 17, 515-527.

Meyer, F.R. y Walter I. Establishment and characterization of new canine and feline osteosarcoma primary cell lines. **Vet Sci.** 2016, 3, 9.

- Mirabello, L.;** Troisi, R.J.; Savage, S.A. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int J Cancer*. 2009, 125, 229–234.
- Mu, Y. M.;** Yanase, T.; Nishi, Y.; Tanaka, A.; Saito, M.; Jin, C. H. y Nawata, H. Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells. *Endocrinology*. 2001, 142(8).
- Mueller, F.;** Fuchs, B.; Kaser-Hotz, B. Comparative biology of human and canine osteosarcoma. *Anticancer Res*. 2007, 27, 155–164.
- Murray, B.;** Arumuggam, N.; Astatkie, T. y Rupasinghe, V. Phloridzin docosahexaenoate, a novel polyphenolic derivate, is cytotoxic to canine osteosarcoma D17 cells. *Medical Res Archives* 2021, 9, 1-8.
- Musser, M.;** Berger, E.P.; Tripp, C.D.; Clifford, A.C.; Bergman, P.J. y Johannes, C.M. Safety evaluation of the canine osteosarcoma vaccine, live *Listeria* vector. *Vet Comp Oncol*. 2020, 19, 92-98.
- Newman, D.J.,** Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*. 2016, 79, 629-661.
- Ochoa-Zarzosa, A.;** Báez-Magaña, M.; Guzmán-Rodríguez, J.J.; Flores-Alvarez, L.J.; Lara-Márquez, M.; Zavala-Guerrero, B.; Salgado-Garciglia, R.; López-Gómez, R.; López-Meza, J.E. Bioactive Molecules from Native Mexican Avocado Fruit (*Persea americana* var. *drymifolia*): A Review. *Plant Foods Hum Nutr*. 2021, 76, 133–142.
- Ortiz-Ávila, O.;** Sámano-García, C.A.; Calderón-Cortés, E. *et al.* Dietary avocado oil supplementation attenuates the alterations induced by type I diabetes and oxidative stress in electron transfer at the complex II-complex III segment of the electron transport chain in rat kidney mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*. 2013, 45:271-287.
- Ostrander, E.A.;** Dreger, D.L.; Evans, J.M. Canine Cancer Genomics: Lessons for Canine and Human Health. *Annu Rev Anim Biosci*. 2019, 7, 449–472.
- Paoloni, M.;** Davis, S.; Lana, S.; Withrow, S.; Sangiorgi, L.; Picci, P.; Hewitt, S.; Triche, T.; Meltzer, P.; Khanna, C. Canine tumor cross-species genomics uncovers targets linked to

osteosarcoma progression. **Bio Med Central Genomics**. 2009, 10, 625.

Park, H.; Park, S.; Bazer, F.W.; Lim, W.; Song, G. Myricetin treatment induces apoptosis in canine osteosarcoma cells by inducing DNA fragmentation, disrupting redox homeostasis, and mediating loss of mitochondrial membrane potential. **J Cell Physiol**. 2018,1–10.

Pasic, I.; Lipton, J.H. Current approach to the treatment of chronic myeloid leukaemia. **Leuk Res**. 2017, 55, 65–78.

Peixoto, N.; Lopes, L.; de Sousa, V.; Arnhold, E.; de Sousa, V.; de Almeida, J. y Sabec, D. Curcumin promotes extrinsic apoptosis in canine osteosarcoma cells. **Res Society Develop**. 2020, 9, 9231.

Poradowski, D.; Obmin´ska-Mrukowicz, B. Effect of selected non steroidal anti-inflammatory drugs on the viability of canine osteosarcoma cells of the D-17 line: In vitro studies. **J Vet Res**. 2019, 63, 399–403.

Qayed, W. S.; Aboraia, A. S.; Abdel-rahman, H. M. y Youssef, A. F. Annonaceous acetogenins as a new anticancer agent. **Pharma Chemica**. 2005, 7(6), 24–35.

Ramos-Jerez, R. Phytochemical analysis of avocado seed (*Persea americana Mill, c.v. Hass*. Cuvllier Verlag Göttingen, 2007,11-47.

Rehmat, J. and Gul-e-Saba, Ch. Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. **Adv Pharm Bull**. 2019, 9(2) 205-218.

Rosenberg, A.E. WHO Classification of Soft Tissue and Bone, fourth edition: summary and commentary, **Curr Opin Oncol**. 25 ,2013, 571-573.

Rosenblat, G.; Meretski, S.; Segal, J.; Tarshis, M.; Schroeder, A.; Zanin-Zhorov, A. and Hochberg, M. Polyhydroxylated fatty alcohols derived from avocado suppress inflammatory response and provide non-sunscreen protection against UV-induced damage in skin cells. **Arch Derm Res**. 2011, 303, 239–246.

Ru, G.; Terracini, B. and Glickman, L.T. Host related risk factors for canine osteosarcoma.

Vet J. 1998, 156, 31-39.

Ruddon, R. W. Cancer biology. Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki (4th edition). 2007, New York: Oxford, University Press.

Sánchez-Albarrán, F.; Salgado-Garciglia, R.; Molina-Torres, J.; López-Gómez, R. Oleosome Oil Storage in the Mesocarp of Two Avocado Varieties. **J Oleo Sci.** 2019, 68, 87–94.

Schiffman, J.D. and Breen, M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 2015 370: 20140231.

Seigler, D. S. Secondary metabolism. Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics. 2002, Dordrecht: Springer Netherlands.

Selmic, L.E.; Burton, J.H.; Thamm, D.H.; Withrow, S.J.; Lana, S.E. Comparison of carboplatin and doxorubicin-based chemotherapy protocols in 470 dogs after amputation for treatment of appendicular osteosarcoma. **J Vet Intern Med.** 2014, 28, 554-563.

Selvarajah, G.T.; Kirpensteijn, J. Prognostic and predictive biomarkers of canine osteosarcoma. **Vet J.** 2010, 185, 28–35.

Simpson, S.; Dunning, M.K.; de Brot, S.; Grau-Roma, L.; Mongan, N.P.; Rutland C.S. Comparative review of human and canine osteosarcoma: morphology, epidemiology, prognosis, treatment and genetics. **Acta Vet Scand.** 2017, 59, 71.

Simpson, S.; Dunning, M.; de Brot, S.; Alibhai, A.; Bailey, C.; Woodcock, C.L.; Mestas, M.; Akhtar, S.; Jeyapalan, J.N.; Lothion-Roy, J.; et al. Molecular Characterization of Canine Osteosarcoma in High Risk Breeds. **Cancers.** 2020, 12, 2405.

Somarelli, J.A.; Boddy, A.M.; Gardner, H.L.; DeWitt, S.B.; Tuohy, J.; Megquier, K.; Sheth, M.U.; Hsu, S.D.; Thorne, J.L.; London, C.A.; et al. Improving Cancer Drug Discovery by Studying Cancer across the Tree of Life. **Mol Biol Evol.** 2020, 37, 11–17.

Sultan, F.; Ganaie, B.A. Comparative oncology: Integrating human and veterinary medicine. **Open Vet J.** 2018, 8, 25-34.

Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin.** 2021, 71, 209-249.

Szewczyk, M.; Lechowski, R.; Zabielska, K. What do we know about canine osteosarcoma treatment? Review. **Vet Res Commun.** 2014, 39, 61–67.

Tabe, Y.; Konopleva, M.; Andreeff, M. Fatty acid metabolism, bone marrow adipocytes, and AML. **Frontiers Oncol.** 2020, 10, 155.

Vail, D.M.; MacEwen, E.G. Spontaneously Occurring Tumors of Companion Animals as Models for Human Cancer. **Cancer Investig.** 2000, 18, 781–792.

Wang, H.; Khor, T.O.; Shu, L.; Su, Z.-Y.; Fuentes, F.; Lee, J.H.; Kong, A.-N.T. Plants vs. Cancer: A Review on Natural Phytochemicals in Preventing and Treating Cancers and Their Druggability. **Anti-Cancer Agents Med. Chem.** 2012, 12, 1281–1305.

Weschenfelder, C.; dos Santos, J.L.; de Souza, P.A.L.; de Campos, V.P.; Marcadenti, A. Avocado and Cardiovascular Health. **Open J Endo Metab Dis.** 2015, 5, 77–83.

WHO. Cancer. 2021. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> consultado el 18 julio de 2021.

Widiyastuti, Y.; Pratiwi, R.; Riyanto, S.; Wahyuono, S. Cytotoxic activity and apoptosis induction of avocado *Persea americana* Mill. seed extract on MCF-7 cancer cell line. **Indones J Biotechnol.** 2018, 23, 61–67.

Wilk, S.S. and Zabielska-Koczywas, K.A. Molecular Mechanisms of Canine Osteosarcoma Metastasis. **Int J Mol Sci.** 2021, 22, 3639.

Withrow, S.J. and Wilkins, R.M. 2010. Cross talk from pets to people: translational osteosarcoma treatments. **ILAR J.** 51, 208-213.

Wong, R.S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **J Exp Clin Cancer Res.** 2001, 30: 87

Yasir, M.; Das, S.; Kharya, M.D. The Phytochemical and Pharmacological Profile of *Persea Americana* Mill. ***Pharmacognosy Rev.*** 2010, 4, 77–84.

Yuan, S. S. F.; Chang, H. L.; Chen, H. W.; Yeh, Y. T.; Kao, Y. H.; Lin, K. H. y Su, J. H. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. ***Life Sci.*** 2003, 72 (25), 2853–2861.

Zhao, J.; Li, R.; Pawlak, A.; Henklewska, M.; Sysak, A.; Wen, L.; Yi, J.E.; Obmin´ska-Mrukowicz, B. Antitumor Activity of Betulinic Acid and Betulin in Canine Cancer Cell Lines. ***In Vivo.*** 2018, 32, 1081–1088.