



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**



**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TESIS

**IDENTIFICACIÓN DE MOLÉCULAS CITOTÓXICAS DEL EXTRACTO LIPÍDICO DE
LA SEMILLA DE AGUACATE NATIVO MEXICANO**

QUE PRESENTA:

LGA. MARÍA GUADALUPE PÉREZ ESQUIVEL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA PECUARIA

DIRECTOR:

DR. JOEL EDMUNDO LÓPEZ MEZA

CO-DIRECTORA:

DRA. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA

MORELIA, MICHOACÁN, MAYO DE 2025

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la dirección del Dr. Joel Edmundo López Meza y la Co-dirección de la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa.

Para su realización se contó con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (proyecto 17644), del Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación del Estado de Michoacán (PICIR22-022-C) y de la SECIHTI (beca 843420).

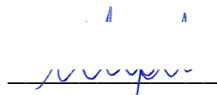
Declaración de originalidad

El presente documento es producto del trabajo original de investigación de **María Guadalupe Pérez Esquivel**, estudiante del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas y respetando siempre los más altos estándares éticos solicitados por la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.


Todos los datos de la investigación reportada en el presente documento de tesis (excepto los indicados explícitamente en el texto), fueron obtenidos por **María Guadalupe Pérez Esquivel** durante el periodo que fue estudiante de la Maestría en Ciencias Biológicas, bajo la Dirección del **Dr. Joel Edmundo López Meza** y la Co-Dirección de la **Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa**.

Morelia, Mich., a 23 de mayo de 2025

LGA. María Guadalupe Pérez Esquivel



Dr. Joel Edmundo López Meza



Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, UMSNH

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis asesores de tesis por permitirme ser parte de su grupo de trabajo y cumplir esta meta académica. A mi asesor el Dr. Joel Edmundo López Meza, por todas sus enseñanzas, su paciencia, motivación y por guiarme en este proyecto. A mi coasesora la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa por todo el apoyo y consejos brindados. A mis sinodales, la Dra. Nayeli Alva Murillo, el Dr. Rafael Salgado Garciglia y al Dr. Rodolfo López Gómez por todas las aportaciones en este trabajo. Agradezco a la Dra. Marisol Báez Magaña por todas sus enseñanzas y su apoyo en este proyecto. A la Dra. Alejandra Hernández García por abrirme las puertas de su grupo de trabajo y su laboratorio, y a la M.C. Yolanda García Rodríguez por su ayuda con el análisis de CG-EM.

A mis amigas: Mine, Gladys y Marisol por ser parte de esta etapa de mi vida, darme consejos y ayudarme en todo momento. Gracias por hacerme más fácil y ameno cada día. Agradezco también a mis compañeros del laboratorio por su apoyo y amistad.

Y especialmente agradezco a mi familia: Mi Mamá por todo su amor, por siempre estar para mí y apoyarme en esta etapa de mi vida, a mi papá por su amor y apoyo. A mis hermanos: Rafa y Gaby, por estar siempre conmigo, impulsarme y por su amor y apoyo incondicional. A Javi por motivarme, estar siempre presente y apoyarme en todo momento.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	3
III. INTRODUCCIÓN GENERAL	5
3.1 El cáncer	5
3.2 Factores implicados en el desarrollo del cáncer.....	6
3.3 Características de las células cancerosas.....	10
3.4 Tratamientos convencionales utilizados contra el cáncer	15
3.5 Las plantas en el tratamiento del cáncer	17
3.6 El aguacate	18
3.7 Composición química del aguacate.....	19
3.8 Actividad biológica de los compuestos del aguacate	19
3.9 Aguacate nativo mexicano	21
3.10 Derivados de ácidos grasos	21
3.11 Actividad anticancerosa de los lípidos de aguacate	24
3.12 Antecedentes	27
IV. JUSTIFICACIÓN	32
V. HIPÓTESIS	33
VI. OBJETIVOS	34
6.1 Objetivo general	34
6.2 Objetivos específicos	34
VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	35
VIII.MATERIALES Y MÉTODOS	36
IX. RESULTADOS	42
9.1 Obtención del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano	42
9.2 Determinación del efecto citotóxico del extracto lipídico de la semilla de aguacate en líneas celulares cancerosas	43
9.3 Fraccionamiento del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano.....	45

9.4 Evaluación del efecto citotóxico de las fracciones del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano.....	46
9.4.1 Las fracciones del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano disminuyen la viabilidad e inhiben la proliferación celular de la línea celular cancerosa B16-F0	46
9.4.2 Las fracciones del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano disminuyen la viabilidad y la proliferación en células de cáncer de mama.....	48
9.4.3 Las fracciones del extracto lipídico de la semilla de aguacate no tienen efectos citotóxicos en las células de epitelio mamario bovino	51
9.5 Las fracciones del extracto lipídico de la semilla de aguacate inducen apoptosis a través de la vía intrínseca en las líneas celulares cancerosas	52
9.6 Identificación de los compuestos citotóxicos de las fracciones del extracto lipídico de la semilla de aguacate.....	56
X. DISCUSIÓN	58
XI. PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES	65
XII. CONCLUSIONES	66
XIII. LITERATURA CITADA	67

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. El cáncer en el mundo.....	6
Figura 2. Sellos distintivos del cáncer.	11
Figura 3. Descripción general de las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis... 14	14
Figura 4. Acetogeninas.....	23
Figura 5. Obtención del extracto lipídico de la semilla de aguacate (LEAS).	42
Figura 6. Efecto citotóxico del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano en las células B16-F0 de melanoma murino.	43
Figura 7. Efecto citotóxico del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano en las células MCF-7 de cáncer de mama.....	44
Figura 8. Efecto citotóxico del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano en las células MDA-MB-231 de cáncer de mama.	45
Figura 9. Cromatografía en capa fina (TLC) de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna del extracto lipídico de la semilla de aguacate.....	46
Figura 10. Efecto citotóxico de las fracciones del extracto lipídico de la semilla de aguacate en las células B16-F0.	47
Figura 11. Las fracciones del extracto lipídico de la semilla de aguacate inhiben la proliferación de células B16-F0.....	48
Figura 12. Efecto de las fracciones 3 y 4 del extracto lipídico de la semilla de aguacate sobre la viabilidad y proliferación de las células MCF-7.....	49
Figura 13. Efecto de las fracciones 3 y 4 del extracto lipídico de la semilla de aguacate sobre la viabilidad y proliferación de las células MDA-MB-231.	50
Figura 14. Las fracciones del extracto lipídico de la semilla de aguacate no afectan la viabilidad de las células de epitelio mamario bovino (CEMB).	51
Figura 15. Las fracciones 3 y 4 del extracto lipídico de la semilla de aguacate inducen apoptosis en las células B16-F0.....	52
Figura 16. Las fracciones 3 y 4 del extracto lipídico de la semilla de aguacate activan la caspasa 9 en las células B16-F0.....	53
Figura 17. Efecto apoptótico de las fracciones 3 y 4 del extracto lipídico de la semilla de aguacate en células MCF-7.....	54
Figura 18. Las fracciones 3 y 4 del extracto lipídico de la semilla de aguacate activan la caspasa 9 en las células MCF-7.....	55
Figura 19. Efecto apoptótico de las fracciones 3 y 4 del extracto lipídico de la semilla de aguacate en células MDA-MB-231.....	55
Figura 20. Las fracciones 3 y 4 de del extracto lipídico de semilla de aguacate activan la caspasa 9 en células MDA-MB-231.	56
Figura 21. Cromatograma de CG-EM de la fracción 3 del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano.....	57
Figura 22. Cromatograma de CG-EM de la fracción 4 del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Composición lipídica del aguacate.....	19
Tabla 2. Composición del extracto rico en lípidos de la semilla de aguacate nativo mexicano (<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>).	27
Tabla 3. Propiedades del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano.....	29
Tabla 4. Características de las células cancerosas.....	37

I. RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, y en México es la tercera causa de muerte. Este grupo de enfermedades es tratado principalmente con tratamientos convencionales; sin embargo, estas estrategias presentan efectos secundarios severos. Por lo anterior, es importante la búsqueda de nuevos compuestos con actividad citotóxica mejorada y dirigida a las células cancerosas. En este sentido, las plantas han sido objeto de estudio en la búsqueda de compuestos bioactivos contra el cáncer. El aguacate es una planta en la que se han reportado propiedades citotóxicas asociadas a más de 20 compuestos bioactivos. En este sentido, en el grupo de trabajo se han reportado las actividades citotóxicas de un extracto lipídico (LEAS) de la semilla del aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) en diferentes líneas celulares cancerosas. LEAS es rico en ácidos grasos y sus derivados, principalmente contiene acetogeninas; no obstante hasta el momento, se desconoce cuál es la molécula responsable de la actividad citotóxica. Por lo que el objetivo de este trabajo fue identificar la(s) molécula(s) responsable(s) de la actividad citotóxica del extracto. LEAS se obtuvo de la semilla del aguacate nativo mexicano mediante una extracción Soxhlet con hexano y se evaluó su citotoxicidad en la línea celular de melanoma murino B16-F0 ($IC_{50}= 25.3 \mu\text{g/mL}$), y en las líneas celulares de cáncer de mamá MCF-7 ($IC_{50}= 31.17 \mu\text{g/mL}$) y MDA-MB-231 ($IC_{50}= 30.14 \mu\text{g/mL}$), mediante ensayos de exclusión por azul tripano por 24 h. Posteriormente, LEAS se fraccionó por cromatografía en una columna de sílice utilizando una fase móvil con hexano, acetato de etilo, isopropanol y ácido acético en una relación de 40:20:5:1. Las fracciones se analizaron por cromatografía en capa fina y se identificaron cuatro bandas con factores de retención (RF) de 0.80, 0.68, 0.53, y 0.40. La citotoxicidad de estas fracciones se evaluó en las células B16-F0 obteniendo los efectos más significativos en la fracción 3 (RF 0.53) y la fracción 4 (RF 0.40), con una IC_{50} de $62.2 \mu\text{g/mL}$ y $61.14 \mu\text{g/mL}$ a las 24 h, respectivamente. Posteriormente, se evaluó el efecto de estas fracciones en las células de cáncer de mama. Los resultados mostraron que la fracción 3 y 4 disminuyen la viabilidad y la proliferación celular en un 50% a una concentración de $100 \mu\text{g/mL}$ a las 48 h en las células MCF-7. En las células

MDA-MB-231 el tratamiento de 48 h con la fracción 3 afectó la viabilidad celular 40% a 100 µg/mL, y se determinó una IC_{50} = 55 µg/mL con la fracción 4. Mediante ensayos de citometría de flujo se determinó el mecanismo de muerte activado por las fracciones en las líneas celulares evaluadas (B16-F0, MCF-7 y MDA-MB-231). Ambas fracciones indujeron la apoptosis en todas las líneas mediante la activación de la caspasa 9. Finalmente, la composición química de las fracciones se determinó mediante CG-EM, estableciendo que las moléculas mayoritarias de la fracción 3 son acetogeninas de 17 C y las moléculas mayoritarias de las fracción 4 son acetogeninas de 21 C. En conclusión, las acetogeninas de 17 y 21 C son las responsables del efecto citotóxico de LEAS en las líneas celulares B16-F0, MCF-7 y MDA-MB-231, a través de la inhibición de la proliferación celular y la inducción de la apoptosis intrínseca.

Palabras clave: cáncer, aguacate, acetogeninas, citotóxico, apoptosis

II. ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death worldwide and the third leading cause of death in Mexico. This group of diseases is primarily treated with conventional therapies; however, these treatments often have severe side effects. Therefore, searching for new bioactive compounds with enhanced cytotoxic activity and specificity on cancer cells is essential. In this sense, plants are studying for bioactive compounds against cancer with anti-cancer properties. The avocado is a plant in which more than 20 bioactive compounds with cytotoxic properties have been identified. In this context, our group reported the cytotoxic effects of a lipid extract (LEAS) from the seed of the native Mexican avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) on different cancer cell lines. LEAS is rich in fatty acids and their derivatives, primarily containing acetogenins. However, the molecule(s) involved in the cytotoxic activity is (are) unknown. This study aimed to identify the molecule(s) responsible for the cytotoxic effect of the extract. LEAS was obtained from the avocado seed of the native Mexican avocado by Soxhlet extraction with hexane. Its cytotoxicity was evaluated on the murine melanoma cell line B16-F0 ($IC_{50} = 25.3 \mu\text{g/mL}$), and on the breast cancer cell lines MCF-7 ($IC_{50} = 31.17 \mu\text{g/mL}$) and MDA-MB-231 ($IC_{50} = 30.14 \mu\text{g/mL}$) by trypan blue exclusion assays at 24 h. Further, LEAS was fractionated by silica column chromatography using a mobile phase with hexane, ethyl acetate, isopropanol, and acetic acid in a ratio of 40:20:5:1. The fractions were analyzed by thin-layer chromatography, and four bands were identified with retention factors (RF) of 0.80, 0.68, 0.53, and 0.40. The cytotoxicity of these fractions was evaluated on B16-F0 cells; the most significant effects were obtained with fraction 3 (RF 0.53) and fraction 4 (RF 0.40), which exhibited IC_{50} values of $62.2 \mu\text{g/mL}$ and $61.14 \mu\text{g/mL}$ at 24 h, respectively. The effects of these fractions were then evaluated on breast cancer cells. The results showed that fractions 3 and 4, at a concentration of $100 \mu\text{g/mL}$ for 48 h, reduced cell viability and proliferation by 50% on MCF-7 cells. On MDA-MB-231 cells, treatment with fraction 3 for 48 h decreased cell viability by 40% at $100 \mu\text{g/mL}$, and an IC_{50} of $55 \mu\text{g/mL}$ was determined for fraction 4. Flow cytometry assays were used to assess the mechanism of cell death activated by the fractions on the cell lines evaluated (B16-F0, MCF-7, and MDA-MB-231). Both fractions induced apoptosis in all cell lines, activating caspase 9. Finally, the chemical

composition of the fractions was analyzed by GC-MS, revealing that the molecules in fraction 3 were mainly 17 C acetogenins, and most molecules in fraction 4 were 21 C acetogenins. In conclusion, 17 and 21 C acetogenins are responsible for the cytotoxic effects of LEAS on B16-F0, MCF-7, and MDA-MB-231 cell lines by inhibiting cell proliferation and induction of intrinsic apoptosis.

Keywords: cancer, avocado, acetogenins, cytotoxic, apoptosis

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

3.1 El cáncer

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2022) establece que el cáncer es un término utilizado para designar a un amplio grupo de enfermedades, las cuales pueden afectar a cualquier parte del cuerpo. El cáncer es promovido por la transformación de células normales en células cancerosas, las cuales son incapaces de controlar su crecimiento multiplicándose sin control. En condiciones normales las células se forman y se dividen a medida que se requieren nuevas células mediante los procesos que comprenden el ciclo celular, y cuando envejecen o se dañan deben morir y ser reemplazadas por nuevas células. En cambio, en las células cancerosas se pierde el control de estos procesos provocando que se formen y se multipliquen sin control y se diseminen a otras partes del cuerpo, mediante un proceso llamado metástasis (NIH, 2023).

Durante los últimos 20 años, el cáncer se ha transformado en una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Según el análisis GLOBOCAN en 2022, se presentaron un total de 19,9 millones de nuevos casos de cáncer y casi 10 millones de muertes en el 2022. Siendo el cáncer de pulmón (12.4%), mama (11.5%), y el colorrectal (9.5%) los de mayor incidencia, y el cáncer de pulmón (18.7%) colorrectal (9.3%) y de hígado (7.8%) los que ocasionan más número de muertes (Fig. 1) (GLOBOCAN, 2022). Con las actuales tasas de crecimiento poblacional, los cambios en los estilos de vida y el envejecimiento de la población, se proyecta que para el 2040 habrá un incremento de 60% en el número de casos de cáncer.

En el caso de la Región de las Américas, el número de casos de cáncer se estimó en 4 millones en 2020, y se proyecta que aumentará hasta los 6 millones en 2040, causando 1,4 millones de muertes (Parra-Soto *et al.*, 2020). En México en 2022, se reportaron 207,154 casos de cáncer, siendo los de mayor incidencia el cáncer de mama (15%), próstata (12.8%) y el colorrectal (7.8%). El número de muertes por el cáncer se estimó en un total de 99,210 casos ocasionados principalmente por el cáncer colorrectal (8.6%), de mama (8.5%) y pulmón (8.1%) (GLOBOCAN, 2022). Los

tumores malignos fueron la tercera causa de muerte representando el 10.6% de las defunciones del país, siendo los estados con mayor tasa de defunciones la Ciudad de México, Sonora y Veracruz. En Michoacán en 2022 se registraron 69.06 defunciones causadas por tumores malignos por cada 100,000 habitantes, siendo el cáncer de mama, próstata, colorrectal y cervicouterino los de mayor incidencia (INEGI, 2024).

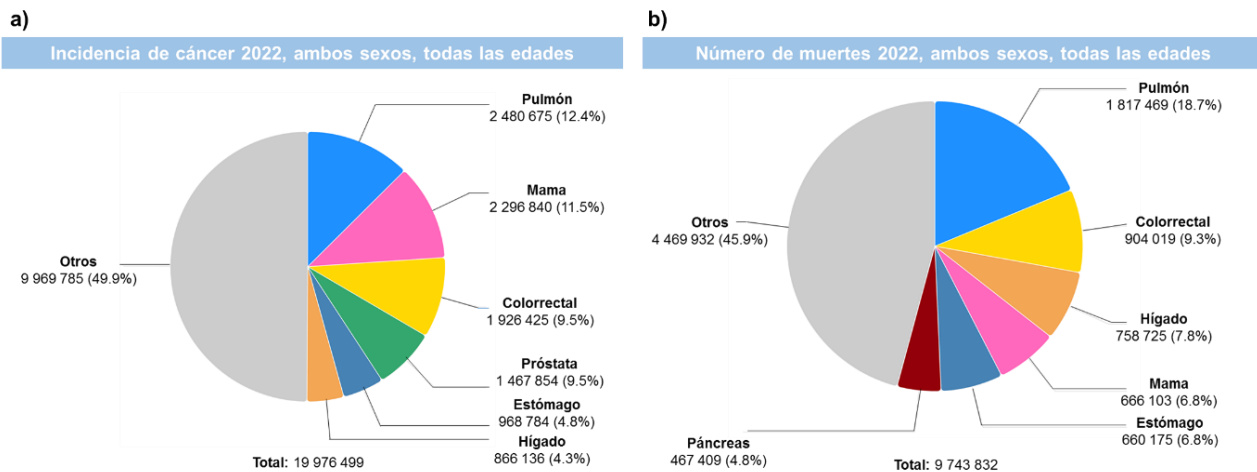


Figura 1. El cáncer en el mundo. a) Para el 2022 los casos nuevos de cáncer se estimaron en un total de 19,976,499, siendo el cáncer de pulmón con un total de 2,480,675 (12.4%) casos el tipo de cáncer con mayor incidencia, seguido por el cáncer de mama con un total de 2,296,840 (11.5%) casos y el cáncer colorrectal con 1,926,425 (9.6%) casos. **b)** Las muertes por cáncer en el mismo año se estimaron en 9,958,133 muertes, siendo ocasionadas principalmente por el cáncer de mama con 1,796,144 (18%) muertes, el cáncer de colorrectal con 935,173 (9.4%) muertes y el cáncer de hígado con un total de 830,180 (8.3%) muertes. (Tomado y modificado de GLOBOCAN, 2024).

3.2 Factores implicados en el desarrollo del cáncer

La transformación de células normales en tumorales implica, además del crecimiento descontrolado y la proliferación celular sostenida, una transformación maligna, es decir, una pérdida de las características y funciones normales de las células en un tejido. Esto se debe a la interacción de mutaciones genéticas y alteraciones epigenéticas de numerosos genes que codifican proteínas que regulan este proceso. Asimismo, el ambiente es otro factor que contribuye a la aparición del fenotipo maligno incrementando la probabilidad de desarrollar cáncer (Sánchez *et al.*, 2022).

Factores genéticos

El cáncer es una enfermedad genética ya que las mutaciones génicas constituyen la base de la carcinogénesis, proceso por el cual las células normales se transforman en células cancerosas. Las mutaciones alteran la cantidad o la función de productos proteicos que regulan el crecimiento y la división celular y la reparación del ADN. (Peter, 2022). Los cambios genéticos que contribuyen al cáncer afectan tres tipos principales de genes: protooncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN. Los genes reparadores de ADN están involucrados en procesos de reparación de daños o errores en el ADN, mediante distintos mecanismos como la reparación de mal apareamiento (missmatch), reparación por escisión de base o nucleótido, unión de extremos no homólogos y recombinación homóloga (Sánchez, 2013). Las mutaciones en estos genes se asocian a errores en la replicación del ADN y mayor susceptibilidad a desarrollar cáncer (ASC, 2022). La función de los protooncogenes es regular el crecimiento y la división celular normal; sin embargo, la alteración de estos puede ocasionar que se transformen en genes que causan cáncer, llamados oncogenes. Los genes supresores de tumores evitan el descontrol y desregulación de la división celular y evitan la muerte celular programada (NIH, 2021; Wong *et al.*, 2011).

Los oncogenes pueden causar cambios en las vías que controlan el crecimiento y la división celular, el metabolismo celular, la reparación del ADN, la angiogénesis y otros procesos fisiológicos. Existe una gran cantidad de oncogenes conocidos que pueden contribuir a la transformación neoplásica en células humanas como el gen *RAS*, el cual está mutado en el 25% de los cánceres, en tanto el oncogen *HER2* se encuentra amplificado y sobreexpresado en aproximadamente el 20% de los carcinomas de mama. La amplificación del oncogen *MYC* está relacionado con el cáncer de mama, pulmón, ovario y próstata, así como en leucemias y linfomas, mientras que la pérdida de su regulación es común en el cáncer de colon (Ospina, 2011; Iram *et al.*, 2017;).

Los genes supresores de tumores desempeñan un papel en la división celular normal y la reparación del ADN, son cruciales para detectar señales de crecimiento inapropiadas o daño del ADN en las células. Cuando estos genes sufren mutaciones o dejan de funcionar, la preservación de la integridad genómica se vuelve ineficiente. Por ejemplo las mutaciones de los genes *BRCA1* y *BRCA2* que disminuyen su función aumentan el riesgo de cáncer de mama y de ovario (Peter, 2022). El gen *RB* codifica la proteína RB cuya función es el control de la progresión de la fase G1-S del ciclo celular, la alteración de este gen provoca una proliferación descontrolada (Hernández, 2016).

El gen *TP53* es un tipo de gen supresor de tumores que codifica a la proteína p53 conocida como el guardián del genoma, cuya principal función es detener el ciclo en la fase G1/S cuando se haya producido daño en el ADN, asegurando así la integridad genómica y la reparación del ADN, si el daño no es reparado p53 induce la muerte celular programada. Cuando la proteína p53 está inactiva o alterada permite la supervivencia y la división de células con ADN dañado. La mutación en *TP53* es uno de los cambios genéticos más frecuentemente encontrados en el cáncer humano, ya que se encuentra mutado en alrededor del 50% de los cánceres (Hanahan, 2011).

La epigenética en el cáncer

La epigenética se define como el estudio de los cambios en la expresión de los genes que no afectan la secuencia del ADN, pero sí cambios en la expresión de los genes (Recillas, 2020). Las principales modificaciones epigenéticas en el cáncer son la metilación del ADN y las modificaciones de las histonas, que actúan en conjunto con las alteraciones genéticas en la iniciación y desarrollo del cáncer confiriendo a los tumores rasgos heterogéneos y plasticidad fenotípica. Las alteraciones epigenéticas en el cáncer pueden resultar en la activación de oncogenes y el silenciamiento de genes supresores de tumores, lo que promueve la capacidad de proliferar descontroladamente de las células cancerosas (Yu *et al.*, 2024).

La metilación del ADN interfiere en la progresión del ciclo celular y la diferenciación celular debido al silenciamiento por metilación de reguladores del ciclo

celular, como p21, p27, y p53, en diferentes tipos de cáncer como próstata, mama, colon y pulmón (Waldmann, 2013). El cáncer está caracterizado por una hipometilación en el genoma a nivel global, y la hipermetilación en promotores de genes específicos. Los niveles de hipometilación favorecen la expresión de protooncogenes, mientras que la hipermetilación puede producir el silenciamiento de genes supresores de tumores y de genes involucrados en la regulación de procesos celulares implicados en el cáncer (Gómez *et al.*, 2022). La alteración epigenética más reconocida en el cáncer es la hipermetilación de las islas CpG de los promotores de genes supresores de tumores, tales como *CDKN2A/p16* y *CDKN2B/p15* (inhibidor 2A y B de quinasas dependientes de ciclina), *RB* (retinoblastoma); *MLH1* (homólogo 1 de mutL), *BRCA1* (cáncer de mama), los cuales están implicados en la regulación del ciclo celular, reparación del ADN y muchos otros procesos (Ahuja *et al.*, 2016).

Las modificaciones químicas de las histonas pueden llevar tanto a la activación como a la represión génica. Las principales modificaciones de las histonas son la acetilación y la metilación, por lo general la acetilación de histonas se asocia con la activación de la expresión de genes; mientras que el efecto de la metilación depende del aminoácido que se modifica, el grado de metilación y su posición en la histona. La alteración de los patrones normales de las modificaciones de las histonas es una característica del cáncer. En diferentes tipos de cáncer (próstata, pulmón, mama y leucemia) las modificaciones más características son la reducción global de la trimetilación de H4K20 (H4K20me3) y la acetilación de H4K16 (H4K16Ac), junto con la hipometilación del ADN en secuencias repetidas (Díaz, 2016).

Factores ambientales

El medioambiente y el comportamiento humano tienen efectos en el fenotipo de las personas y son los principales causantes de mutaciones genéticas y modificaciones epigenéticas anormales implicadas en la progresión del cáncer. Los factores ambientales implicados se pueden clasificar en:

a) Carcinógenos físicos: como las radiaciones ultravioleta, la exposición a la luz ultravioleta es uno de los principales factores de riesgo de cáncer de piel. La exposición excesiva a la radiación ultravioleta causó en 2020 alrededor de 1,2 millones de nuevos

casos de cáncer de piel distinto del melanoma (carcinomas epidermoide y basocelular) y 325,000 casos de melanoma cutáneo, así como 64,000 y 57,000 defunciones prematuras por cáncer de piel distinto del melanoma y por melanoma cutáneo, respectivamente (OMS, 2022).

b) Carcinógenos químicos: el tabaquismo está relacionado con un mayor riesgo de padecer cáncer de vejiga, pulmón, cavidad oral, laringe, faringe y esófago. El arsénico, es un tóxico ambiental al que los humanos pueden estar expuestos en diversos grados por medio del agua, aire, suelo y alimentos contaminados. Esta exposición se relaciona con un mayor riesgo de cáncer de vejiga, piel, pulmón, hígado y riñón (Gómez *et al.*, 2022). El consumo de bebidas alcohólicas tiene una fuerte asociación con un aumento del riesgo de cáncer de cabeza y cuello, de esófago, hígado, colorrectal y el cáncer de mama (NIH, 2020).

c) Carcinógenos biológicos: pueden ser virus, bacterias y protozoos. El virus del papiloma humano (VPH) está relacionado con el cáncer de cuello uterino. Cuando el VPH de riesgo alto infecta las células, interfiere con las formas en que estas se multiplican, dividen y comunican entre sí, y hace que las células infectadas se multipliquen sin control. Otro tipo de virus es el Epstein-Barr (VEB), el cual es un agente infeccioso que durante la fase latente expresa diferentes proteínas o micro-ARN con capacidad oncogénica, por lo que las células infectadas tienen el potencial de desarrollar cáncer. Esto se ha demostrado en algunos tipos de cáncer como el linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo y cáncer gástrico. Otro ejemplo es el virus de la hepatitis B y hepatitis C que causan cáncer hepático. Con respecto a bacterias, las infecciones de *Helicobacter pylori* se relacionan con el cáncer de estómago (Wayne *et al.*, 2007; NIH, 2020).

3.3 Características de las células cancerosas

El cáncer es responsable de más de 200 enfermedades que presentan sellos distintivos y características habilitadoras necesarias para la proliferación de un tumor y que favorecen su desarrollo y diseminación en el organismo. Hanahan y Weinberg (2022) establecieron 14 características (distintivas y habilitadoras) que constituyen un

principio para comprender la diversidad de las enfermedades neoplásicas, término utilizado para referirse al crecimiento descontrolado de células o tejidos anormales en el organismo ocasionado una neoplasia o tumor (Fig. 2). Las principales características de las células cancerosas son la multiplicación rápida y descontrolada de las células anormales, la evasión de la muerte celular programada y la capacidad invasiva conocida como metástasis.

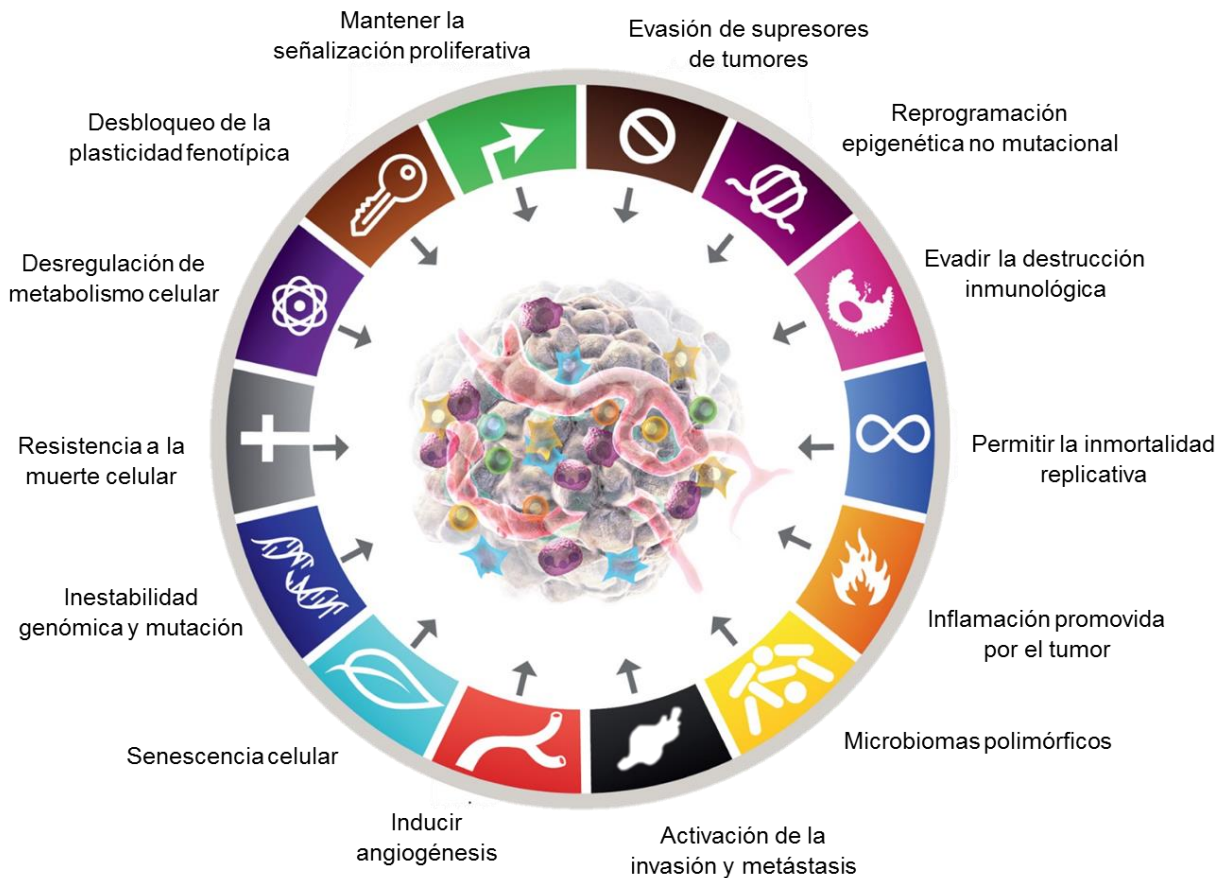


Figura 2. Sellos distintivos del cáncer. Las características de las células cancerosas favorecen el desarrollo del cáncer. (Tomado y modificado de Hanahan y Weinberg, 2022).

Permitir la inmortalidad replicativa

En un tejido normal las células reciben señales antiproliferativas para mantener la inactividad celular y la homeostasis tisular, la proliferación se puede bloquear en el ciclo celular al inducir a las células a pasar a la fase G0. Sin embargo, las células cancerosas tienen la capacidad de promover su propio crecimiento y división celular

descontrolada, ignorando las señales que normalmente regulan la proliferación celular. Las señales antiproliferativas se canalizan a través de la proteína del retinoblastoma (RB), la cual al estar hipofosforilada bloquea la proliferación secuestrando y alterando la función de los factores de transcripción E2F que controlan la expresión de genes esenciales para la progresión de la fase G1 a la fase S. La interrupción de la vía RB libera E2F y, por lo tanto, permite la proliferación celular, lo que hace que las células sean insensibles a los factores anticrecimiento (Hanahan y Weinberg, 2022).

Invasión y metástasis

La capacidad de las células cancerosas de diseminarse en todo el organismo se basa en dos mecanismos: la invasión y la metástasis. La invasión se refiere a la capacidad de la célula de invadir tejidos circundantes, mientras que la metástasis implica la diseminación de las células cancerosas, desde el lugar donde se formó el cáncer (tumor primario), a través del torrente sanguíneo o el sistema linfático hasta otra parte del cuerpo, donde forman un nuevo tumor en otros órganos o tejidos. El proceso de metástasis se produce cuando la adhesión célula a célula está disminuida y es ocasionada principalmente por cambios en E-cadherina, perdiendo o disminuyendo su expresión en la mayoría de cánceres epiteliales. Otras características que promueven la metástasis son el aumento en la motilidad celular y la producción de proteasas que degradan la matriz extracelular (Wayne *et al.*, 2007; Hanahan y Weinberg, 2022).

Evasión de la muerte celular programada

Las células crecen y se multiplican mediante el ciclo celular, cuando estas envejecen o sufren daños son eliminadas mediante el proceso de muerte celular programada conocida como apoptosis. La apoptosis es un proceso celular controlado genética y bioquímicamente por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos como el daño al ADN, citocinas o pérdida de la matriz extracelular. En este proceso las células se autodestruyen formando cuerpos apoptóticos que contienen los restos del núcleo protegido por la membrana nuclear y los organelos, estos son fagocitados por células aledañas o células del sistema inmune, en este proceso las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones

inflamatorias, ni ocasionar daños en los tejidos (Hanahan, 2011; Wong, 2011). El proceso de apoptosis en la célula, se lleva a cabo principalmente por dos vías, la vía extrínseca y la vía intrínseca (Fig. 3).

Vía extrínseca

La vía de apoptosis extrínseca es mediada por familias de receptores como el receptor Fas o el receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) conocidos como receptores de muerte, los cuales reciben señales proapoptóticas desde el exterior (Hanahan, 2011). La activación de los receptores de muerte es consecuencia de la unión de algún ligando como TNF- α , el ligando de Fas (FasL) o el ligando inductor de la apoptosis relacionado a factores (TRAIL). La unión del ligando con su receptor estimula la trimerización del receptor y permite la unión de la proteína FADD (factor asociado al dominio de muerte), ocasionando la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC). FADD recluta proteínas que contienen el dominio efector de muerte, como la caspasa 8 que se activa y escinde una serie de sustratos como las caspasas efectoras 3 y 7, o BID, una proteína proapoptótica exclusiva de BH3 que permeabiliza la membrana externa mitocondrial (Lee *et al.*, 2012; Bock, 2022).

Vía intrínseca o mitocondrial

En la vía intrínseca la apoptosis se activa mediante señales que convergen en las mitocondrias, esta vía puede activarse por daño al ADN, proteínas sensoras como PUMA, daño al citoesqueleto, hipoxia, hipertermia, infecciones virales, o radicales libres. En esta vía las mitocondrias responden a las señales proapoptóticas liberando citocromo c, un potente catalizador de la apoptosis (Hanahan, 2000; Lodish *et al.*, 2013).

Los miembros de la familia Bcl-2 pro-supervivencia, como Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1, tienen como función principal salvaguardar la integridad de la membrana externa mitocondrial uniendo e inhibiendo Bax y Bak que son reguladores centrales de la vía intrínseca de la apoptosis (Peña, 2018). Cuando las proteínas Bcl-2 que favorecen la supervivencia se inhiben, Bax y Bak quedan libres para ser activadas solo por proteínas BH3 y formar poros en la membrana externa mitocondrial, proceso conocido

como permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP), lo que generalmente obliga a la célula a morir (Bock, 2020).

La formación de poros en la membrana externa de las mitocondrias permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembranal, como el citocromo c. El citocromo c en el citoplasma activa al complejo proteico denominado apoptosoma compuesto por múltiples copias de APAF-1, que permite la activación de la caspasa 9, una vez activa esta caspasa escinde y activa a las caspasas efectoras como la caspasa 3 y 7, que concluirán con el proceso de muerte celular (Bock, 2023).

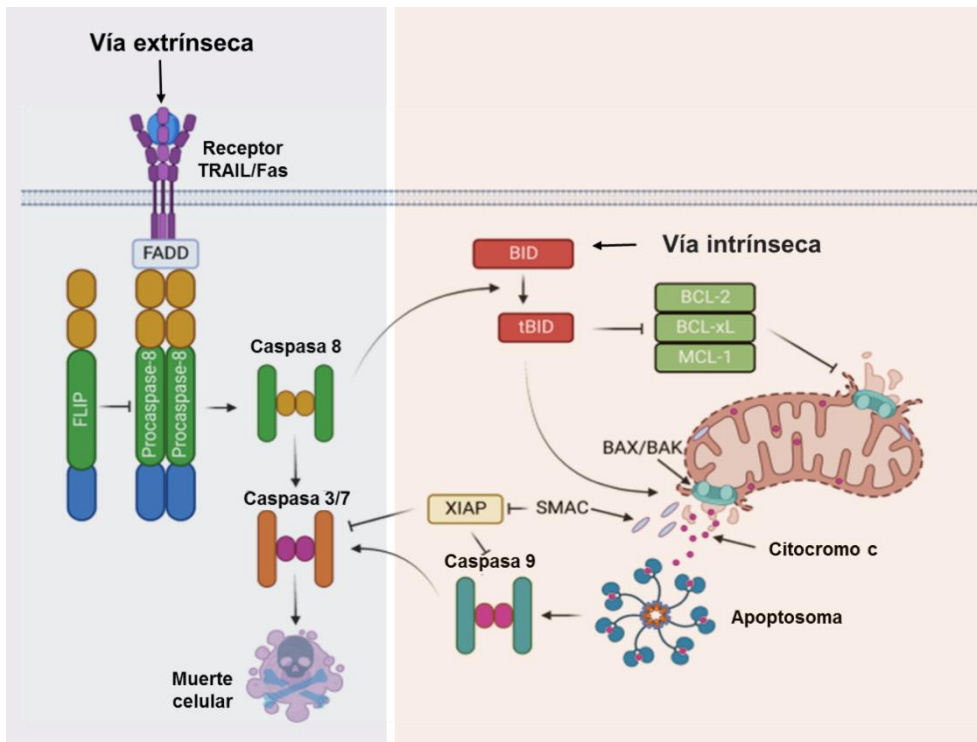


Figura 3. Descripción general de las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis.

La apoptosis por vía extrínseca es mediada por receptores localizados en la membrana celular. La apoptosis por vía intrínseca es mediada por señales provenientes de las mitocondrias. FADD: factor asociado al dominio de muerte; FLID: Proteína inhibidora de FLICE; XIAP: Inhibidor de la apoptosis ligado al cromosoma X; SMAC: Segundo activador de caspasas derivado de las mitocondrias; TRAIL: Ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral. (Modificado de Bock, 2023).

La vía intrínseca se puede conectar con la vía extrínseca, una vez activada la caspasa 8 por los receptores de muerte, esta caspasa activa a la proteína Bid, lo que

provoca la apertura del poro mitocondrial y la activación de la caspasa 9 (Bock, 2023; Pérez, 2012).

Las células cancerosas adquieren la capacidad de evadir la apoptosis, dando lugar a una división celular descontrolada lo que les permite sobrevivir y acumularse en el tejido y, por consiguiente, al crecimiento de un tumor. Generalmente, los mecanismos por los cuales se produce la evasión de la apoptosis pueden dividirse en: 1) la alteración en el equilibrio de las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas, 2) la disminución de la actividad de las caspasas, y 3) la alteración de la señalización del receptor de muerte. Algunos de los procesos que ocurren en la evasión de la apoptosis son el incremento en la expresión de moléculas como Bcl-2 y Bcl-X, reducción de los mediadores pro-apoptóticos Bim, Bid y PUMA, y mutaciones que involucran al gen supresor de tumores *TP53*. Este gen tiene múltiples funciones como el control del ciclo celular, mantener la integridad del ADN y la supervivencia de las células que son expuestas a agentes que dañan el ADN. La alteración del gen *TP53* confiere un riesgo muy elevado de desarrollar cáncer, debido a que permite la proliferación de células cancerosas (Hanahan, 2011; Wong, 2011; Pazo *et al.*, 2012).

3.4 Tratamientos convencionales utilizados contra el cáncer

El cáncer suele ser tratado principalmente con cirugía, quimioterapia o radioterapia. El tratamiento dependerá en gran medida del tipo de cáncer del que se trate y el estadio en el que se encuentre, además solo en algunos casos es suficiente que la persona reciba un tipo de tratamiento, pero en la mayoría reciben una combinación de estos (NIH, 2022). Los tratamientos se pueden dividir en locales y sistémicos. En los locales se ataca al tumor sin afectar otras partes del cuerpo, son prácticamente exclusivos para cáncer en etapa temprana, incluyen cirugías, ablación y embolización y radioterapia. Los tratamientos sistémicos tienen como objetivo eliminar masivamente las células tumorales, se utiliza en la mayoría de los tratamientos clínicos y generalmente se aplica en la dosis máxima tolerada; incluye quimioterapia, medicamentos de terapia dirigida e inmunoterapia (ACS, 2024).

Cirugía: Es la principal modalidad terapéutica para el cáncer, la cual consiste en la extirpación del cáncer en una operación (NIH, 2022).

Quimioterapia: Es un tipo de tratamiento que usa fármacos para destruir células cancerosas deteniendo o disminuyendo el crecimiento de estas. La quimioterapia es utilizada para reducir el tamaño de un tumor antes de la cirugía o de radioterapia (quimioterapia neoadyuvante), destruir las células cancerosas que pueden haber quedado después del tratamiento con cirugía o con radioterapia (quimioterapia adyuvante) y para destruir las células cancerosas que han regresado o que se han extendido a otras partes del cuerpo (NIH, 2015). Los fármacos utilizados en quimioterapia se pueden dividir en: 1) antimetabólicos que inhiben las rutas metabólicas requeridas para la síntesis de ADN, como el metotrexato y mercaptopurina; 2) agentes alquilantes que inhiben la función del ADN, por ejemplo la clofosfamida, el clorambucil y el cisplatino; y 3) antibióticos los cuales inhiben el funcionamiento del ADN uniéndose a él o inhibiendo a las topoisomerasas necesarias para la replicación, algunos ejemplos de estos fármacos son la bleomicina y la doxorubicina (Wayne *et al.*, 2007).

Radioterapia: Es un tratamiento utilizado en el cáncer que usa altas dosis de radiación para destruir células cancerosas y reducir tumores. En dosis altas, la radioterapia destruye las células cancerosas o hace lento su crecimiento, al dañar su ADN. Los tipos de radioterapia utilizados contra el cáncer son: radioterapia con rayos de fotones, radioterapia con rayos de partículas y la radioterapia con rayos de electrones. Este tratamiento se puede utilizar antes de la cirugía para disminuir el tamaño del tumor, o después de la cirugía para eliminar células cancerosas que hayan quedado (NIH, 2019).

Inmunoterapia: Es un enfoque terapéutico que utiliza el sistema inmunológico del cuerpo para combatir el cáncer. Para tratar el cáncer se han establecido inmunoterapias basadas en células T, células NK y células dendríticas, también se han desarrollado anticuerpos monoclonales, vacunas e inmunomoduladores. La inmunoterapia actúa sobre células/moléculas inmunitarias, a diferencia de otras

terapias que actúan a través de los efectos citotóxicos directos sobre las células tumorales (de León, 2018).

La administración de fármacos quimioterapéuticos para el tratamiento oncológico se caracteriza por que tienen efectos tóxicos no solo en las células cancerosas, sino que también afectan a las células sanas, siendo inespecíficos y teniendo baja efectividad, además las células cancerosas pueden desarrollar resistencia a los fármacos quimioterapéuticos (Velázquez *et al.*, 2021). Los efectos secundarios dependerán del tipo de cáncer, estadio, enfermedades y el entorno. Los tratamientos antineoplásicos presentan toxicidad directa con el tubo digestivo provocando náuseas, vómitos o diarrea, lo que ocasiona complicaciones digestivas con repercusiones nutricionales, que incluso podrían provocar la muerte por desnutrición (Alonso *et al.*, 2023). Debido a los efectos adversos de las terapias convencionales se ha incrementado la importancia de obtener nuevos compuestos con actividad citotóxica mejorada y dirigida a las células cancerosas, como una alternativa para la obtención de nuevos productos que ayuden a reducir el desarrollo del cáncer.

3.5 Las plantas en el tratamiento del cáncer

Las plantas han sido una fuente importante en la búsqueda de metabolitos bioactivos contra el cáncer. Las propiedades citotóxicas de las plantas están relacionadas con la presencia de metabolitos secundarios, como los compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides, taninos, estilbenos, xantonas, terpenos, lignanos, acetogeninas y quinonas. Estos metabolitos son moléculas orgánicas producto del metabolismo secundario y forman parte del mecanismo de defensa de las plantas, que se basa en la capacidad de generar sustancias químicas que posean un efecto citotóxico o citostático, lo que las convierten en una fuente de moléculas con actividad antitumoral (Teodor *et al.*, 2020).

Existen diferentes metabolitos de las plantas utilizados en el tratamiento del cáncer, como la vinblastina y vincristina, alcaloides aislados de *Catharanthus roseus* utilizados contra el cáncer de mama, testículo, pulmón y leucemia. También se han reportado que flavonoides como la quercetina, genisteína y rohitukina para el

tratamiento de algunos tipos de cáncer de mama, próstata y vejiga (Biganzoli *et al.*, 2013). Los agentes quimioterapéuticos derivados de plantas más conocidos y utilizados en el tratamiento del cáncer son los taxanos, como el paclitaxel (conocido inicialmente como taxol), aislado de la especie vegetal *Taxus brevifolia* (Muñoz, 2016). Otro tipo de metabolito secundario son los terpenos los cuales están constituidos por moléculas de 5 carbonos denominados isoprenos, de estos metabolitos se ha determinado que el monoterpeno geraniol de *Rabdosia rubescens* posee efectos citotóxicos en la línea celular cancerosa de hígado HepG2 (Thoppil, 2011). Además, se han reportado medicamentos exitosos contra el cáncer, derivados de los estudios de las propiedades citotóxicas de las plantas como: la doxorrubicina, etopósido, irinotecan, gemcitabina, entre otros (Muñoz, 2016).

3.6 El aguacate

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es una planta tropical que pertenece a la familia Lauraceae, que se conforma de alrededor de 2,200 especies. Se trata de un árbol de tronco grueso que puede alcanzar hasta los 20 m de altura, tiene un sistema radicular secundario y poco profundo, con hoja alargada y perenne, su fruto es una baya comestible con diferentes características (color verde claro, oscuro, violeta, cáscara rugosa, pulpa verde amarillenta y una semilla dicotiledónea grande central) dependiendo de la variedad (Pérez *et al.*, 2015). Es originario de regiones tropicales y subtropicales de México y Centroamérica, tiene tres variedades botánicas: antillana (*P. americana* var. *americana*), guatemalteca (*P. americana* var. *guatemalensis*) y mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*), de las cuales existen más de 1,000 cultivares y clones, siendo Hass, Bacon, Fuerte y Criollo las variedades más importantes (Cid *et al.*, 2021).

En México, el aguacate es de suma importancia ya que el país es uno de los principales productores y exportadores de aguacate aportando cerca del 30% de la producción a nivel mundial, con una superficie sembrada en 2022 de 259,769 ha y más de un 1 millón de toneladas de producción. Destaca Michoacán como el estado con la mayor superficie sembrada, con 179,914 ha, lo que representa el 70% del total

nacional en el 2022, aportando el 87.2% del total cosechado en el país; además, es el estado líder productor con 353,403 toneladas (SIAP, 2023).

3.7 Composición química del aguacate

La fruta del aguacate es un alimento muy valorado debido a su alto valor nutricional, principalmente por su alto contenido de lípidos, contiene ácidos grasos tanto saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, destacando el ácido oleico el cual corresponde al 58% del total de los ácidos grasos (Tabla 1). El consumo de esta fruta también proporciona fibra dietética, minerales como el magnesio y potasio, es rica en tocoferoles, ácido ascórbico, piridoxina, β carotenos, y contiene vitaminas como A, B-6, C, E, ácido fólico, ácido pantoténico, colina, niacina y riboflavina (Figueroa *et al.*, 2018; Vivero *et al.*, 2019; Lara *et al.*, 2021).

Tabla 1. Composición lipídica del aguacate¹.

Tipo de ácido graso	Ácido graso	Nomenclatura	g/100 g
Saturado (16-20%)	Palmítico	C16:0	12.5
			14.0
	Estearico	C18:0	0.2-0.4
	Araquídico	C20:0	0.1
Monoinsaturado (66-72%)	Palmitoleico	C16:1	4.0-5.0
	Oleico	C18:1n-9	70-74
	Gadoleico	C20:1	0.1
Poliinsaturado (8-13%)	Linoleico	C18:2n-6	9.0-10.0
	Alfa-linolénico	C18:3n-3	0.3-0.6

¹(Tomado de Vivero *et al.*, 2019).

3.8 Actividad biológica de los compuestos del aguacate

Se ha reportado que los diversos compuestos que contiene el aguacate poseen propiedades antioxidantes, anticancerosas, antimicrobianas y antiinflamatorias. A continuación, se describen algunos ejemplos de estas actividades: Khalifa *et al.*, (2013) determinaron el efecto citotóxico de un extracto acuoso del fruto del aguacate (AFWE)

en cuatro líneas celulares de cáncer humano: pulmón (A549), hígado (HepG-2), colon (HT-29) y mama (MCF-7). El extracto tuvo efectos citotóxicos contra todas las líneas celulares de cáncer, presentó un porcentaje de letalidad de 93.3%, 98.3%, 97.8% y un 91.7%, respectivamente. En otro estudio evaluaron un extracto etanólico obtenido de las semillas de aguacate Hass, una fracción del extracto y un compuesto triterpenoide aislado del extracto contra las líneas celulares cancerosas MCF-7 y HepG2, obteniendo que las tres muestras presentaron actividad anticancerosa contra las dos líneas celulares (Fitriani *et al.*, 2017). Widiyastut *et al.* (2018) determinaron el efecto citotóxico de un extracto clorofórmico de la semilla de aguacate Hass contra la línea celular MCF-7 obteniendo una concentración inhibitoria (IC_{50}) de 94.87 $\mu\text{g/mL}$, este extracto clorofórmico se dividió con metanol, obteniendo una fracción soluble en metanol, la cual incrementó el efecto citotóxico contra la línea celular MCF-7 (IC_{50} de 34 $\mu\text{g/mL}$), y se determinó que esta fracción induce apoptosis y modula la detención del ciclo celular en la misma línea celular. Adicionalmente, se evaluaron los efectos de un extracto etanólico de la cáscara del aguacate Hass en la línea celular de cáncer de colon Caco-2, en este estudio se determinó una disminución en la viabilidad celular dependiente de la concentración con una IC_{50} de 670.1 $\mu\text{g/mL}$ (Rodríguez-Martínez *et al.* 2021). Estos ejemplos ilustran la relevancia del aguacate en la búsqueda de moléculas con potencial citotóxico hacia células de cáncer.

Asimismo, se ha reportado que extractos y metabolitos del aguacate tienen propiedades antioxidantes y actividades antimicrobianas (Dabas *et al.*, 2013; Bahrume *et al.*, 2019). En el aguacate predominan los ácidos grasos monoinsaturados, que han demostrado tener efectos antidiabéticos y reducen el riesgo de padecer problemas cardíacos (Tentolouris *et al.* 2008; Wang y *et al.*, 2020). También se han demostrado propiedades benéficas en la osteoartritis (Cervantes *et al.* 2021).

Las plantas producen naturalmente péptidos con actividad antimicrobiana que forman parte del sistema de defensa vegetal. En la semilla del aguacate nativo mexicano se identificó el gen de una snakina (PaSn) que codifica un péptido antimicrobiano rico en cisteína GASA/Snakin con actividad antibacteriana (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2013). Además, la expresión de este péptido como una proteína

recombinante permitió demostrar sus propiedades antifúngicas (Hernández-Martínez *et al.*, 2022). Otro tipo de péptidos antimicrobianos ampliamente estudiados son las defensinas, Guzmán-Rodríguez *et al.*, (2016) encontraron que la defensina PaDef obtenida del fruto de aguacate nativo mexicano tiene propiedades citotóxicas en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, a través de la inducción de la apoptosis intrínseca. Además, se reportó que PaDef tiene actividad citotóxica en la línea celular de leucemia mieloide aguda K-562 mediante la inducción de apoptosis a través de la vía extrínseca (Flores, *et al.*, 2018).

3.9 Aguacate nativo mexicano

El aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) son árboles que alcanzan hasta 15 m de altura, crecen en altitudes mayores de 2,000 msnm en climas húmedos, cálidos, semiáridos o templados, es la variedad más resistente al frío ya que puede tolerar temperaturas de hasta 0°C. Sus hojas son de color verde oscuro, pero sus brotes jóvenes son de color verde claro o rojizo. Se caracteriza por poseer frutos pequeños, de piel lisa y delgada, y rico sabor; además, es la variedad con la semilla más grande ya que representa alrededor del 30% del peso total de la fruta, esta es larga, ovalada y lisa o ligeramente rugosa (Gutiérrez, *et al.*, 2009). Tiene un alto contenido de lípidos (20-30%) y una alta cantidad de derivados de ácidos grasos en comparación a otros cultivares (Lara-Márquez *et al.*, 2020). Además, el aguacate nativo mexicano se utiliza como injerto en la producción de aguacate Hass debido a su resistencia a plagas y enfermedades, la calidad del fruto y su capacidad para absorber y transportar nutrientes (Ochoa- Zarzosa *et al.*, 2021).

3.10 Derivados de ácidos grasos

La semilla del aguacate tradicionalmente se ha considerado como un producto de desecho; sin embargo, es fuente importante de metabolitos bioactivos, aunque las propiedades nutraceuticas de la misma han sido poco estudiadas. El aceite de la semilla es rico en lípidos y ácidos grasos esenciales; asimismo, es rico en compuestos fenólicos con capacidad antioxidante y una alta cantidad de proantocianinas, en comparación con el mesocarpo y el exocarpo (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2021).

El aguacate nativo mexicano es rico en ácidos grasos (AG) y sus derivados (DAG). Se ha reportado una gran variedad de estos compuestos en la semilla de aguacate (Tabla 2), entre ellas las acetogeninas alifáticas (avocatinas, perseninas, pahuatinas, ácidos grasos polihidroxiados) que son DAG y representan la mayor parte de las moléculas lipídicas de la semilla. Además, se presentan AG saturados, insaturados y poliinsaturados, siendo los más abundantes el ácido palmítico, el ácido oleico, el ácido esteárico y el ácido tetracosanoico (Báez-Magaña, 2014; Lara Márquez *et al.*, 2020).

Las acetogeninas son metabolitos secundarios de plantas que se encuentran en las familias de las angiospermas ancestrales Lauraceae y Annonaceae. Las acetogeninas del aguacate (Fig. 4) presentan cadenas largas de 17, 19 o 21 carbonos, estas se subdividen según el número de carbonos de sus cadenas alifáticas en avocatinas y ácidos grasos polihidroxiados de 17 C de longitud; pahuatinas de 19 C de longitud; y persinas de 21 C de longitud (Tcheng *et al.*, 2017).

Las acetogeninas son sintetizadas en las células oleosas especializadas denominadas idioblastos presentes en los frutos y las hojas del aguacate, son derivadas de la ruta de síntesis de ácidos grasos de cadena larga teniendo como precursor el ácido linoleico, la síntesis de acetogeninas está ligada a las enzimas elongasa y desaturasa. Presentan cadenas alifáticas con insaturaciones, un grupo acetoxi en lugar del carboxilo terminal, y cuentan con grupos hidroxilo o furanos a lo largo de la cadena (Lee *et al.*, 2015; Tcheng, *et al.*, 2022). La cantidad de acetogeninas en el aguacate varía dependiendo del estado de madurez y el tejido; en la pulpa del aguacate se encuentra un contenido mayor de acetogeninas de 21 C, como la persina y la persenona A, mientras que en la semilla de aguacate las acetogeninas de 17 C son las más abundantes y la cantidad de acetogeninas encontradas varía entre 1.09-8.3 mg/g de peso fresco (Rodríguez-López, 2017; Báez-Magaña *et al.*, 2019). La función que desempeñan las acetogeninas en la planta es la protección contra patógenos, además son posibles reservorios de energía. Se ha reportado que las acetogeninas del aguacate presentan propiedades anticancerosas (Ding *et al.*, 2009; D'Ambrosio *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2015), antioxidantes (Rodríguez-Sánchez *et al.*,

2013), antiinflamatorias (Rosenblat *et al.*, 2011) y antimicrobianas (Villarreal-Lara *et al.*, 2019).

A diferencia del aguacate, las acetogeninas de la familia Annonaceae poseen cadenas alifáticas de 35 o 37 C (Fig. 4). Las cadenas pueden tener de 1 a 3 anillos tetrahidrofuránicos (THF) adyacentes o no, sustituyentes oxigenados (hidroxilos, cetonas y epóxidos) localizados a lo largo de la cadena. En uno de sus extremos presentan un anillo lactónico metil sustituido, α , β insaturado, en ocasiones saturado o rearrreglado como cetolactona (Schilie-Guzmán *et al.*, 2009). Se han reportado diversos estudios de las propiedades anticancerosas de las acetogeninas de esta familia: por ejemplo, en la línea celular cancerosa de cáncer de mama MCF-7 (Lima *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2017), la línea celular A549 de cáncer de pulmón (Ma *et al.*, 2017) y la línea celular de cáncer de colon HT-29 (Moghadamtousi *et al.*, 2015).

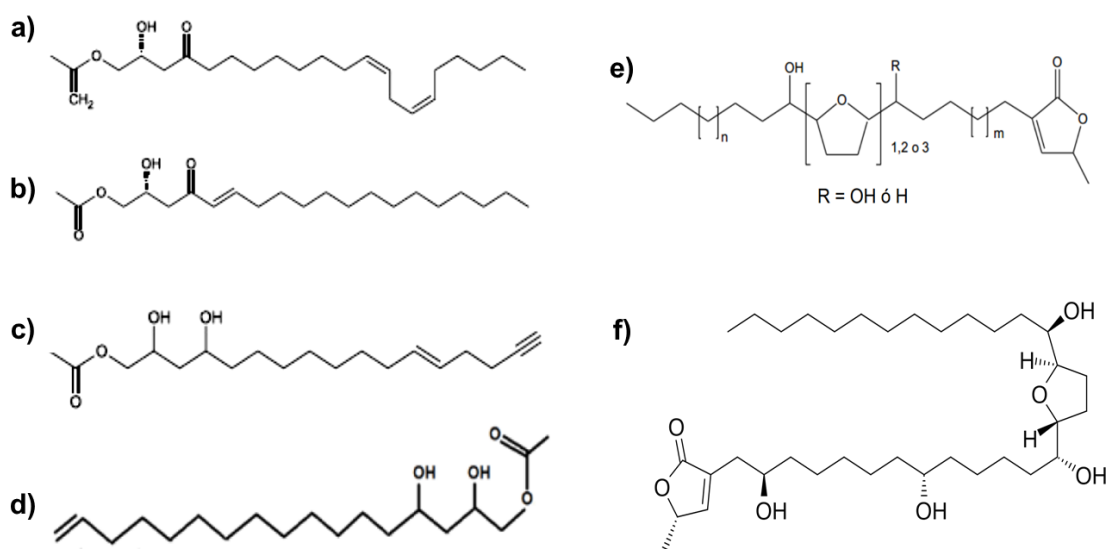


Figura 4. Acetogeninas. Estructura de las acetogeninas del aguacate: **a)** persina, **b)** pahuatina, **c)** avocatina y **d)** alcohol graso polihidroxilado. **e)** Estructura general de las acetogeninas de las Annonaceae, **f)** annonacina acetogenina de *Annona muricata*.

El mecanismo de acción de las acetogeninas de las anonáceas se atribuye principalmente a su capacidad para inhibir la actividad de la enzima ubiquinona oxidorreductasa del complejo I de la cadena de transporte de electrones. Las acetogeninas pueden bloquear selectivamente la función del complejo I en las células cancerosas, lo que interrumpe el suministro de energía y el metabolismo celular. Esto

provoca la disminución en la proliferación de las células cancerosas y la inducción de apoptosis (Liaw, 2015) También se reportan que estos metabolitos inducen cambios epigenéticos como la modificación de histonas, por ejemplo la acetogenina escuamocina (bis-THF) modula la fosforilación de la histona 3, desencadenando el arresto del ciclo celular y la muerte celular activando las caspasas 8 y 9 (Lee *et al.*, 2011). Además, se ha reportado que estas acetogeninas aumentan el nivel de calcio en la mitocondria, desregulando el potencial de membrana, dañando la mitocondria y activando la muerte celular (Gaviria *et al.*, 2011).

3.11 Actividad anticancerosa de los lípidos de aguacate

Las actividades anticancerosas del aguacate se han asociado con más de 20 grupos de compuestos bioactivos, entre ellos moléculas lipídicas de cadena larga, como los AG y DAG de cadena larga (avocatinas, alcoholes grasos polihidroxilados, pahuatinas, y persinas) (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2021). Diversos estudios han demostrado la actividad anticancerosa de los lípidos del aguacate hacia diversos tipos celulares. Por ejemplo un extracto lipídico de la semilla de aguacate constituido principalmente por ácido linoleico (C18:2), ácido oleico (C18:1) y ácido palmítico (C16:0), y un extracto de la pulpa del aguacate constituido por ácido oleico (C18:1) y palmítico (C16:0), mostraron propiedades citotóxicas en la línea celular de cáncer de hígado HEPG2 y en la línea celular de cáncer de colon HCT116, mediante la inducción de apoptosis; sin embargo, los efectos inhibidores de los lípidos de la semilla fueron mayores en ambas líneas celulares en comparación con los lípidos de la fruta (Alkhalaf *et al.*, 2018). Un extracto rico en ácido oleico y ácido linoleico mostró propiedades citotóxicas en la línea celular HT-29 y Caco-2 mediante la inducción de apoptosis (Llor *et al.*, 2003). También se evaluó un extracto hexánico de la semilla de aguacate en la línea celular de MCF-7, donde se determinó un efecto citotóxico con un valor IC_{50} 47.87 ± 1.5 $\mu\text{g/mL}$, mediante la inducción de apoptosis. Además se demostró que la actividad citotóxica del extracto fue selectiva (Rahwawati, 2019).

Con respecto a los acetogeninas alifáticas se determinó que un extracto de la pulpa de aguacate rico en acetogeninas presenta propiedades citotóxicas en las líneas celulares cancerosas HEPG-2 (IC_{50} 8.1 $\mu\text{g/mL}$), MCF-7 (IC_{50} 52.1 $\mu\text{g/mL}$) y HT-29 (IC_{50}

11.3 µg/mL) (Hassan *et al.*, 2022). Se han reportado estudios donde dos acetogeninas de 17 C obtenidas de un extracto clorofórmico del mesocarpio del aguacate Hass inducen apoptosis de manera selectiva por vía de la apoptosis extrínseca e intrínseca en células de cáncer oral (Ding *et al.*, 2009). Estas mismas acetogeninas actúan de manera sinérgica inhibiendo la proliferación de las células de cáncer oral 83-01-82CA (D'Ambrosio *et al.*, 2011). En otro estudio se determinó que la persina, inhibe la proliferación celular mediante la detención del ciclo celular en la fase G2/M, e induce apoptosis por la vía extrínseca e intrínseca en distintas líneas celulares de cáncer de mama como MCF-7, MDA-MB-231 y T-47D (Butt *et al.*, 2006). La persina es un alcohol graso acetilado de 21 C con un grupo hidroxilo en C-2 y un grupo ceto en el C-4, así como dobles enlaces en los C-12 y C-15 (Tcheng *et al.*, 2023). Roberts *et al.* (2007) demostraron el efecto sinérgico de la persina cuando se combina con tamoxifeno, un inhibidor competitivo del estradiol utilizado para tratar el cáncer de mama, tanto en las células MCF-7 como en las células T-47D.

Además, se ha reportado que la avocatina B (Avo B) compuesta por la mezcla 1:1 de dos alcoholes grasos de 17 carbonos (avocado y avocadina), con grupos hidroxilo en C-2 y C-4, disminuye la viabilidad de las células de leucemia mieloide aguda (LMA) por medio de la inducción de apoptosis por la vía intrínseca (Lee *et al.*, 2015). La LMA presenta como característica distintiva tasas anormalmente altas de oxidación de ácidos grasos mitocondriales (FAO). Recientemente el mismo grupo de trabajo ha reportado que Avo B es un potente inhibidor de la FAO disminuyendo los niveles de NADH, esto ocasiona muerte celular mediada por ROS caracterizada por la liberación mitocondrial del citocromo c y AIF (factor inductor de apoptosis), lo que resulta en la muerte selectiva en LMA y no afecta a las células hematopoyéticas. En su estudio determinaron que el número impar de átomos de carbono, la presencia y estereoquímica de la configuración (2R,4R) y la insaturación terminal son fundamentales para la modulación de la FAO (Lee *et al.*, 2015; Tcheng *et al.*, 2023). También se ha determinado el efecto sinérgico entre Avo B y tratamientos quimioterapéuticos utilizados en leucemia mieloide aguda como la citarabina y la doxorubicina, y se ha observado un incremento en la inducción de la apoptosis en comparación de los tratamientos individuales (Tcheng *et al.*, 2017). En otro estudio se

determinó que la combinación de un compuesto bioactivo de *Curcuma amada*, denominado 2,4,6-trihidroxi-3,5-diprenildihidrochalcona (M1), con Avo B en una proporción 1:2, reduce sinérgicamente la viabilidad de la línea celular de LMA (Jayasankar *et al.*, 2022). Tcheng *et al.* (2021) identificaron que la avocadina es el inhibidor de la FAO más potente dentro de la mezcla Avo B, el cual induce la muerte celular en distintas líneas celulares de leucemia (TEX y OCI-AML2). Además, en un estudio realizado para demostrar la seguridad de la Avo B, se observó que es tolerado y no mostró efectos tóxicos en pacientes sanos que consumieron de 50 a 200 mg por día durante 60 días (Ahmed *et al.*, 2019).

Sin embargo, muchas de las actividades anticancerosas reportadas para el aguacate derivan del cultivar comercial Hass y poco se conoce sobre las propiedades citotóxicas de la variedad nativa mexicana.

3.12 Antecedentes

En nuestro grupo de trabajo se han descrito las propiedades citotóxicas e inmunomoduladoras de un extracto lipídico de la semilla del aguacate nativo mexicano (LEAS). LEAS es un extracto rico en moléculas lipídicas de cadena larga, principalmente contiene acetogeninas como avocatinas, pahuatinas, persinas y alcoholes grasos polihidroxiados que presentan un alto contenido de cadenas insaturadas (77.4%). En la tabla 2 se muestran los principales compuestos identificados en LEAS.

Tabla 2. Composición del extracto rico en lípidos (LEAS) de la semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*)¹.

Grupo	Compuesto	Contenido (µg/g)
Derivados de ácidos grasos (acetogeninas alifáticas)	Avocatinas	32.28
	Ácidos grasos polihidroxiados	24.26
	Persinas	10.12
	Pahuatinas	4.26
Ácidos grasos de cadena larga	Ácido tetradecanoico	2.49
	Ácido hexadecanoico	7.1
	Ácido 9,12-octadecadienoico	4.06
	Ácido 9-octadecenoico	5.32
	Ácido octadecanoico	5.06
	Ácido eicosanoico	2.39
	Ácido 13-docosenoico	2.44
	Ácido docosanoico	3.63
	Ácido 15-tetracosenoico	2.88
Ácido tetracosanoico	4.29	

¹Tomada y modificada de Báez *et al.*, 2019

Las propiedades inmunomoduladoras de LEAS se analizaron en la regulación de la internalización de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas (CEMB). LEAS disminuyó la internalización y la adhesión bacteriana en las CEMB en un 80% y 30%, respectivamente. El extracto indujo la expresión de la interleucina IL-10, e inhibió la expresión de la citocina proinflamatoria TNF- α ; además, indujo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y disminuyó la activación de la MAPK p38 y Akt, las cuales están relacionadas con la internalización de *S. aureus* y la expresión de genes inflamatorios (Báez-Magaña *et al.*, 2019). Además, Báez-Magaña (2019), sugiere que la acetogenina más abundante del extracto, llamada kupandina (17 C), es la responsable de esta actividad inmunomoduladora, esto debido a que los estudios realizados con esta molécula mostraron resultados similares a los del extracto.

Asimismo, en estudios previos se ha reportado que LEAS es citotóxico hacia diferentes líneas celulares de cáncer humano (cáncer de colon y cáncer de mama) y animales (melanoma de ratón, osteosarcoma canino). En la línea celular de cáncer de colon Caco-2, el tratamiento con LEAS ($IC_{50} = 28 \mu\text{g/mL}$) a las 48 h provocó la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (58.2%), la inhibición de la oxidación de ácidos grasos (45%), un aumento en la producción de O_2 (30%) y ROS mitocondrial (52%), provocando la inducción de apoptosis a través de la activación simultánea de las caspasas 8 y 9, por lo que induce la activación de las vías de apoptosis tanto extrínseca e intrínseca (Lara-Márquez *et al.*, 2020). Además, LEAS presentó actividad citotóxica con una IC_{50} de $33.09 \mu\text{g/mL}$ a las 48 h contra la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, provocando pérdida del potencial de membrana mitocondrial e inducción de la apoptosis (Solís-Avilés, 2021).

En la línea celular D-17 de osteosarcoma canino, LEAS fue citotóxico con una IC_{50} de $15.5 \mu\text{g/mL}$ a las 48 h, induciendo apoptosis dependiente de caspasas por las vías extrínseca e intrínseca, esto debido a que LEAS provocó una pérdida significativa del potencial de membrana mitocondrial y aumentó la producción del anión superóxido y ROS mitocondrial. Además, LEAS estimuló la detención del ciclo celular en la fase G0/G1 (Padilla-Arellanes *et al.*, 2021). Garnica Velázquez (2023) demostró la actividad

citotóxica de LEAS en la línea celular B16-F0 de melanoma murino, obteniendo una IC₅₀ de 40.85 µg/mL a las 24 h y de 34.74 µg/mL a las 48 h. Asimismo, reportó que LEAS tiene propiedades antitumorales, ya que la administración de LEAS a una concentración de 0.2 mg/g de peso corporal en ratones inhibió el crecimiento tumoral del melanoma en más del 50% (Tabla 3).

No obstante, hasta el momento se desconoce cuál es la molécula de LEAS responsable de la actividad citotóxica.

Tabla 3. Propiedades del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano.

Propiedades	Modelo	Concentración	Destacado	Referencia
Inmuno-moduladoras	CEMB infectadas con <i>S. aureus</i>	100 ng/mL (24h)	-Inhibe la internalización (80%) y adhesión (30%) de <i>S. aureus</i> . -Propiedades antiinflamatorias: regulación negativa de TNF- α y regulación positiva de IL-10.	Báez-Magaña <i>et al.</i> , 2019
Epigenéticas	CEMB infectadas con <i>S. aureus</i>	100 ng/mL (24 h)	-LEAS aumenta la di y la trimetilación de la histona H3 en CEMB infectadas con <i>S. aureus</i> . Lo que podría estar relacionado con la inhibición de la expresión de genes proinflamatorios.	Báez-Magaña <i>et al.</i> , 2019
Citotóxicas	Caco-2	IC ₅₀ = 28 µg/mL (48 h)	-Inhibe la proliferación celular. -Aumenta la producción de ROS. -Provoca pérdida del potencial de	Lara-Márquez <i>et al.</i> , 2020

			<p>membrana mitocondrial.</p> <ul style="list-style-type: none"> -Disminuye la oxidación de ácidos grasos. -Induce apoptosis extrínseca e intrínseca. 	
	HCT-116	IC ₅₀ = 8 µg/mL (48 h)	-Inhibe la proliferación celular	Lara-Márquez <i>et al.</i> , 2020
	Eritrocitos	LEAS: 1,5,10, 20, 50 y 75 µg/mL (24 h)	-No causa lisis en eritrocitos.	Lara-Márquez <i>et al.</i> , 2020
	MCF-7	IC ₅₀ = 33 µg/mL (48 h)	<ul style="list-style-type: none"> -Provoca pérdida del potencial de membrana mitocondrial. -Induce apoptosis. 	Solís-Avilés, 2021
	D17	IC ₅₀ = 15 µg/mL (48 h)	<ul style="list-style-type: none"> -Aumentó la producción del anión superóxido y ROS mitocondrial. -Ocasiona pérdida del potencial de la membrana mitocondrial. -Detención del ciclo celular en la fase G₀/G₁. -Induce apoptosis extrínseca e intrínseca. 	Padilla-Arellanes, <i>et al.</i> , 2021
		LEAS: 5, 10, 20, 50 µg/mL en combinación con cisplatino, carboplatino y doxorubicina (72 h)	-LEAS tiene efecto sinérgico con cisplatino, carboplatino y doxorubicina.	Padilla-Arellanes, <i>et al.</i> , 2021

	B16-F0	IC ₅₀ = 40.85 µg/mL (24 h) IC ₅₀ = 34.74 µg/mL (48 h)	-Disminuye la viabilidad celular.	Garnica- Velázquez, 2023
	MDA-MB- 231	40 µg/mL (24 h)	-Inhibe la migración basal.	Alejo, 2024
Antitumoral	Tumor de melanona murino	0.2 mg/g de peso	-Inhibe el crecimiento tumoral de melanoma en más del 50%.	Garnica- Velázquez, 2023

IV. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del cuerpo y es una de las principales causas de muerte en México y en el mundo. Debido a la gran diversidad de factores que ocasionan que las células se vuelvan cancerosas, el tratamiento del cáncer dependerá del tipo y del estadio en el que se encuentre. Los tratamientos convencionales (cirugía, radioterapia o quimioterapia) suelen ser efectivos para tratar el cáncer. Sin embargo, si no se eliminan todas las células cancerosas la enfermedad puede resurgir; además, los fármacos quimioterapéuticos tienen efectos tóxicos que disminuyen la calidad de vida de las personas. Debido a esto se ha incrementado la importancia de buscar y obtener nuevos compuestos con actividad citotóxica mejorada y selectiva contra las células cancerosas.

Las plantas han sido objeto de estudio en la búsqueda de compuestos con actividad anticancerosa. Entre estas se encuentra el aguacate, en el cual se han reportado actividades citotóxicas asociadas con distintos compuestos bioactivos, entre ellos las moléculas lipídicas de cadena larga, como los ácidos grasos y sus derivados. Recientemente se ha reportado la actividad citotóxica de un extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano (LEAS) en líneas celulares de cáncer humano (cáncer de colon y cáncer de mama) y de animales (osteosarcoma canino y melanoma de ratón). Sin embargo, se desconoce cuál es la molécula del extracto responsable de la actividad citotóxica. Por lo que la identificación de la(s) molécula(s) citotóxicas de LEAS favorecerá su purificación para futuros estudios *in vivo* que permitan sentar las bases para el desarrollo de nuevos compuestos con actividad anticancerosa.

V. HIPÓTESIS

Las acetogeninas de 17 C del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) tienen propiedades citotóxicas en las líneas celulares cancerosas.

VI. OBJETIVOS

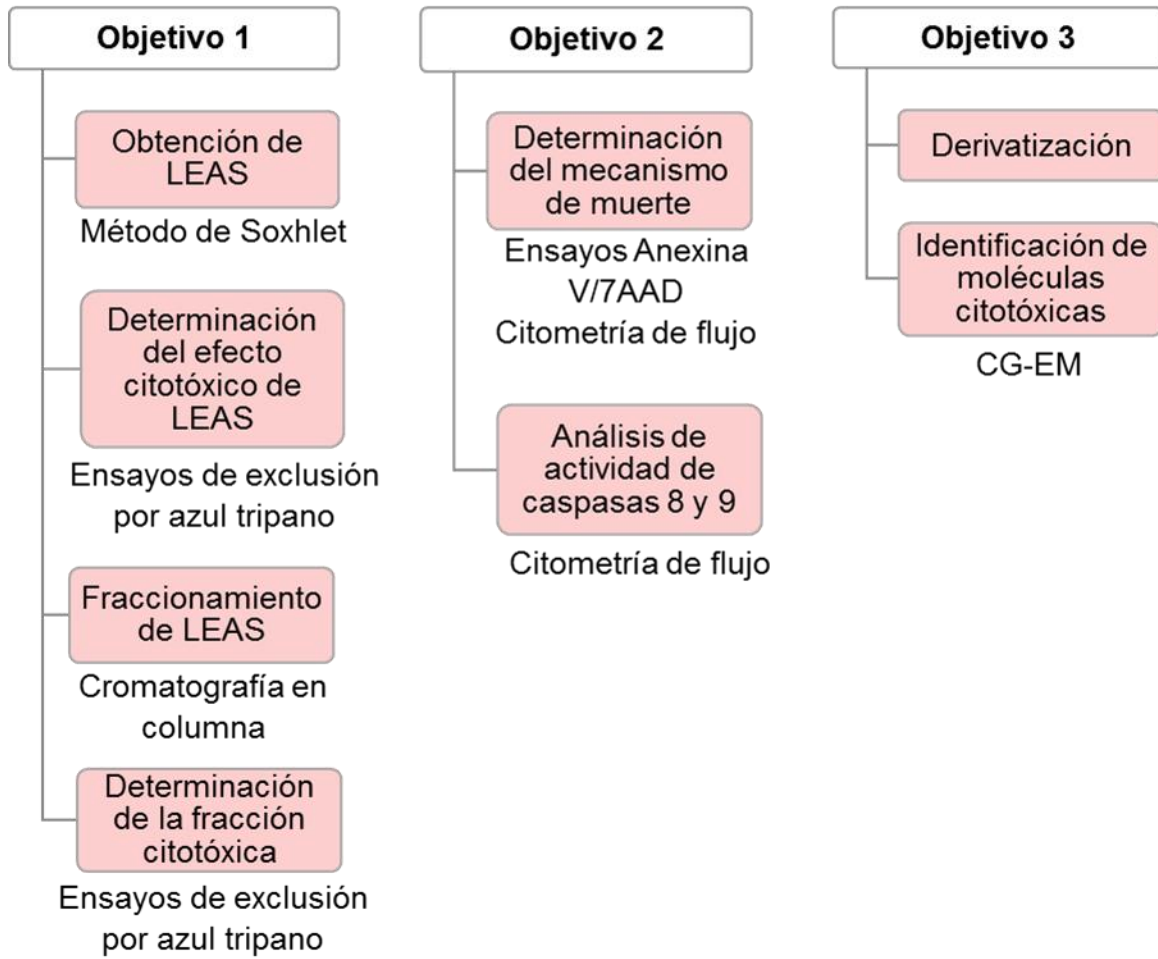
6.1 Objetivo general

Determinar si las acetogeninas de 17 C son las moléculas responsables de la actividad citotóxica del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) sobre las líneas celulares cancerosas.

6.2 Objetivos específicos

- 1) Evaluar las propiedades citotóxicas de las fracciones del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano en las líneas celulares cancerosas.
- 2) Determinar el mecanismo de muerte inducido por la fracción citotóxica en las líneas celulares cancerosas.
- 3) Identificar la(s) molécula(s) responsable(s) de la actividad citotóxica del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano.

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

En este trabajo se utilizó la línea celular B16-F0 (ATCC CRL-6322™) de melanoma murino, y las líneas celulares cancerosas humanas de cáncer de mama MCF-7 (ATTCC HTB-22™) y MDA-MB-231 (ATCC HTB-26™). Las células se cultivaron de acuerdo con lo reportado por el grupo de trabajo (Lara-Márquez *et al.*, 2020). Las células B16-F0 se cultivaron en placas de 5 mL con medio Eagle modificado de Dulbecco alto en glucosa (Sigma, cat. D5648-10X1L), suplementado con 5% de suero fetal bovino (Biowest, cat. BIO-S1400), 5% de suero de ternera (Biowest, cat. BIO-S0400-500), 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, cat. 15140122), y 0.1% anfotericina B (Invitrogen, cat. A2942), pH 7.4. Para el caso de las células MDA-MB-231 se cultivaron en placas de 5 mL con medio Eagle modificado de Dulbecco alto en glucosa (Sigma), suplementado con 5% de suero fetal bovino (Biowest), 5% de suero de ternera (Biowest), 0.1% de L-glutamina (Invitrogen, cat. 25030081), 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco), y 0.1% anfotericina B (Invitrogen), pH 7.4. Las células MCF-7 se cultivaron en placas de 5 mL para cultivo celular con medio Eagle modificado de Dulbecco/F-12 de Ham (Sigma, cat D8900), suplementado con 5% de suero fetal bovino (Biowest), 5% de suero de ternera (Biowest), 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco), y 0.1% anfotericina B (Invitrogen), pH 7.4. Las células de epitelio mamario bovino (CEMB) se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco/F-12 de Ham, suplementado con 10% suero fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco), y 0.1% anfotericina B (Invitrogen), 10 µg/mL de insulina (Sigma) y 10 µg/mL de hidrocortisona (Sigma), pH 7.4. Las células se mantuvieron en incubación a 5% CO₂ y 37°C hasta alcanzar el 80% de confluencia.

Tabla 4. Características de las células cancerosas.

	B16-F0	MCF-7	MDA-MB-231
Organismo	<i>Mus musculus</i> , ratón	<i>Homo sapiens</i> , humano	<i>Homo sapiens</i> , humano
Clasificación	Eucariota, Animalia, Metazoos, Cordados, Vertebrados, Tetrápodos	Célula epitelial	Célula epitelial
Morfología	Mezcla de células fusiformes y epiteliales.	Epitelial	Epitelial
Tejido	Piel	Mama; glándula mamaria	Mama; glándula mamaria
Enfermedad	Melanoma	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma
Propiedades de crecimiento	Adherente	Adherente y/o suspensión	Adherente
Tumorigénico	Sí	Sí	Sí

Obtención del extracto lipídico de la semilla de aguacate (LEAS)

Los frutos del aguacate mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) se recolectaron en estado de madurez fisiológica en el municipio de Tingambato, Michoacán, México. LEAS se obtuvo según lo reportado previamente (Báez-Magaña *et al.*, 2019). Brevemente, se trituraron las semillas congeladas y se realizó una extracción Soxhlet con hexano (Meyer, cat. 1480-18) por 14 h de reflujo a 60°C. El extracto se filtró con papel Whatman y se enfrió durante 12 h a -18°C para obtener los cristales de LEAS, los cuales posteriormente se secaron con nitrógeno gaseoso. Los cristales se resuspendieron en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, cat. D1435-500ML) para los análisis de citotoxicidad y en hexano para fraccionar el extracto por cromatografía en columna.

Fraccionamiento del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano

El fraccionamiento de LEAS se realizó mediante cromatografía en columna. Para ello se empaquetó una columna de vidrio de 1 x 12 pulgadas con 35 g de gel de sílice (Sigma, cat. 288624) y se equilibró con hexano (Meyer), acetato de etilo (J.T. Baker, cat. 15538664), isopropanol (J.T. Baker, cat. 15598574), y ácido acético (J.T. Baker, cat. 15541152) en una relación 40:20:5:1. Las condiciones de corrida fueron las siguientes: velocidad de goteo: 60 gotas/min y un volumen inicial: 70 mL. Se recuperaron 4 fracciones: fracción 1 (12 mL), fracción 2 (10 mL), fracción 3 (10 mL) y la fracción 4 (50 mL), las cuales se analizaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) utilizando la mezcla de disolventes anteriormente descrita. El revelado de la TLC se realizó usando yodo sublimado. Las fracciones se secaron con nitrógeno gaseoso y se resuspendieron en DMSO 2.5% y etanol 2.5%. La citotoxicidad de las fracciones se evaluó en las siguientes líneas celulares cancerosas: B16-F0 de melanoma murino, MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama, como se describe a continuación.

Ensayos de viabilidad celular

Los efectos citotóxicos de las fracciones de LEAS se determinaron a través del ensayo de exclusión por azul tripano (Lara-Márquez *et al.*, 2020). Para la línea celular B16-F0 se cultivaron 3,000 células/pozo en cajas de 96 pozos en medio DMEM alto en glucosa suplementado, se sincronizaron con medio sin suplementos durante 24 h y fueron expuestas a diferentes concentraciones (10-80 µg/mL) de las fracciones colectadas por 24 h. Las células MCF-7 (10,000 células/pozo) se cultivaron en cajas de 96 pozos en medio DMEM/F12 suplementado, se sincronizaron con medio sin suplementos durante 24 h y fueron expuestas por 48 h a diferentes concentraciones de las fracciones (12.5-100 µg/mL). Las células MDA-MB-231 (20,000 células/pozo) se cultivaron en cajas de 96 pozos en medio DMEM alto en glucosa suplementado, se sincronizaron con medio sin suplementos durante 24 h y fueron expuestas a las fracciones colectadas por 48 h a concentraciones de 12.5-100 µg/mL. Para determinar el efecto de las fracciones en células sanas, se utilizaron células de epitelio mamario bovino (CMEB), para lo cual se cultivaron 10,000 células/pozo en medio F12 suplementado y fueron expuestas a concentraciones de 10-100 µg/mL de las

fracciones durante 24 h. En todos los casos, una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, las células fueron recolectadas después de ser desprendidas de las cajas de cultivo con tripsina, la cual se inactiva con medio suplementado. La suspensión celular obtenida se mezcló 1:1 con azul tripano (Sigma, cat. T8154) y se contó el número de células viables y muertas en un microscopio invertido (Zeiss) utilizando un hemocitómetro. Los resultados de viabilidad celular se reportan como el porcentaje de células viables con respecto a las células tratadas con el vehículo. La concentración medio inhibitoria (IC₅₀) se calculó mediante un análisis de regresión lineal utilizando el programa Excel (Microsoft). Los datos de proliferación celular se obtuvieron graficando el número total (vivas y muertas) de células obtenidas después de cada tratamiento.

Determinación del mecanismo de muerte celular y activación de caspasas

Para determinar la tasa de apoptosis se realizó el ensayo de anexina V, utilizando las líneas celulares cancerosas B16-F0 (12,000 células/pozo), MCF-7 (40,000 células/pozo) y MDA-MB-231 (80,000 células/pozo). Para ello, las células fueron cultivadas en placas de 24 pozos como se describió anteriormente. Los cultivos celulares se sincronizaron por restricción de nutrientes durante 24 h antes del tratamiento con las fracciones citotóxicas de LEAS, después las células se incubaron con las concentraciones establecidas experimentalmente. Las células se recuperaron por desprendimiento con tripsina, luego se centrifugaron a 1,500 rpm por 10 min a 4°C, luego se lavaron con 1 mL de PBS y se centrifugaron a 1,500 rpm por 10 min a 4°C. Las células se incubaron en agitación por 15 min a temperatura ambiente con anexina V (Invitrogen, cat. A13201) y 7-AAD (7-aminoactinomicina D), (Invitrogen, cat. 420404), finalmente se añadieron 80 µL de buffer de anexina y se mantuvieron en hielo hasta su uso. La tasa de apoptosis se determinó utilizando el citómetro de flujo Accuri-C6 (BD Biosciences), se utilizó como control positivo de apoptosis actinomicina D (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016). Los porcentajes de células fluorescentes y la intensidad de fluorescencia media se determinaron a partir de los histogramas de la emisión de fluorescencia en los gráficos.

La actividad de caspasas 8 y 9 se evaluó utilizando el kit CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase Staining kit de acuerdo con las instrucciones del

fabricante. Las células B16-F0, MCF-7 y MDA-MB-231 se cultivaron en placas de 24 pocillos y se incubaron con las fracciones citotóxicas durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células se recuperaron mediante desprendimiento con tripsina, se centrifugaron a 3,000 rpm por 5 min y se incubaron en oscuridad con los sustratos de las caspasas: FITC-IETD-FMK para la caspasa 8 y FITC-LEHD-FMK para la caspasa 9, durante 60 min a 37°C con un 5% de CO₂. Posteriormente las células se centrifugaron a 3,000 rpm durante 5 min a -4°C y se eliminó el sobrenadante. Finalmente se realizaron dos lavados con el buffer de lavado. La fluorescencia se evaluó en un citómetro de flujo Accuri-C6 (BD Biosciences) y se analizó con el software FlowJo X 10.0.7 (Flores *et al.*, 2019).

Derivatización de las fracciones citotóxicas

Una vez identificadas las fracciones citotóxicas, estas se colocaron en un Reacti-vial de manera independiente, el cual se secó con nitrógeno gaseoso, después se adicionaron 100 µL de diclorometano y 1 mL de NaOH 0.5 N (Sigma, cat. 1310-73-2) en metanol, el vial se calentó a 90°C durante 10 min y se dejó enfriar hasta 30°C aproximadamente, después se adicionó 1 ml de trifluoruro de boro en metanol, se calentó hasta 90°C durante 10 min y se enfrió hasta 30°C. Con la ayuda de una pipeta Pasteur se transfirió toda la muestra del Reacti-vial a un tubo de ensaye (“tubo 1”). A continuación, se adicionó 1 ml de hexano (Meyer) y se agitó vigorosamente en un vortex. La fase superior se transfirió a un tubo de ensaye nuevo (“tubo 2”). Después se adicionó 1 ml de hexano al tubo 2 y se agitó con un vortex, nuevamente la fase superior se transfirió a un nuevo tubo de ensaye y se agregó 1 ml de agua destilada, la fase superior se pasó a través de una columna (Poly-prep, Chromatography columns) rellena con NaSO₄ (Sigma, cat. 7757-82-6), la fase orgánica se recuperó en un tubo nuevo, el cual se llevó a sequedad con nitrógeno gaseoso.

Identificación de los compuestos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

Se inyectaron 3 µL de la muestra derivatizada (10 mg/mL) tipo split (50:1) en un cromatógrafo (Agilent 6890) acoplado a un detector selectivo de masas Agilent 5973N,

equipado con columna capilar HP-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m). La corrida se realizó con las siguientes condiciones: Temperatura del inyector, 270°C; temperatura del detector, 300°C. Las condiciones de operación del horno fueron las siguientes: La temperatura inicial fue de 150°C por 3 min, con un incremento gradual de 5°C por minuto hasta 278°C mantenida por 12 min (tiempo total de 40.6 min), post-corrída a 300°C por 3 min. La identificación de los compuestos se realizó por comparación de su espectro de masas y el tiempo de retención, de acuerdo con la base de datos espectrales NIST/EPA/NIH, "Chem Station" Agilent Technologies Rev. D.04.00 (2011). Para la cuantificación se utilizó el estándar metil éster octadecanoato.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el software JMP 18 y GraphPad Prism 8.0.1 mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA una vía), utilizando la prueba post hoc de Tukey para los resultados de viabilidad y proliferación celular. Para el caso de los resultados de determinación del mecanismo de muerte se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA una vía) utilizando la prueba post hoc de Dunnett. Los datos se representan como la media \pm errores estándar (EE) con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Las figuras se realizaron con el software GraphPad Prism 8.0.1

IX. RESULTADOS

9.1 Obtención del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano

El extracto lipídico de la semilla (LEAS) de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) se obtuvo mediante una extracción de Soxhlet con hexano durante 14 h a 60° C, como se muestra en la Fig. 5a. A partir de 500 g de semilla triturada se recuperaron cristales ricos en ácidos grasos y derivados de ácidos grasos con un rendimiento del 0.2% (Fig. 5b). El extracto obtenido fue monitoreado por cromatografía en capa fina (TLC) para determinar la composición de LEAS. Mediante la TLC se identificaron cinco bandas mayoritarias con un factor de retención (FR) de 0.40, 0.53, 0.64, 0.80 y 0.90 (Fig. 5c).

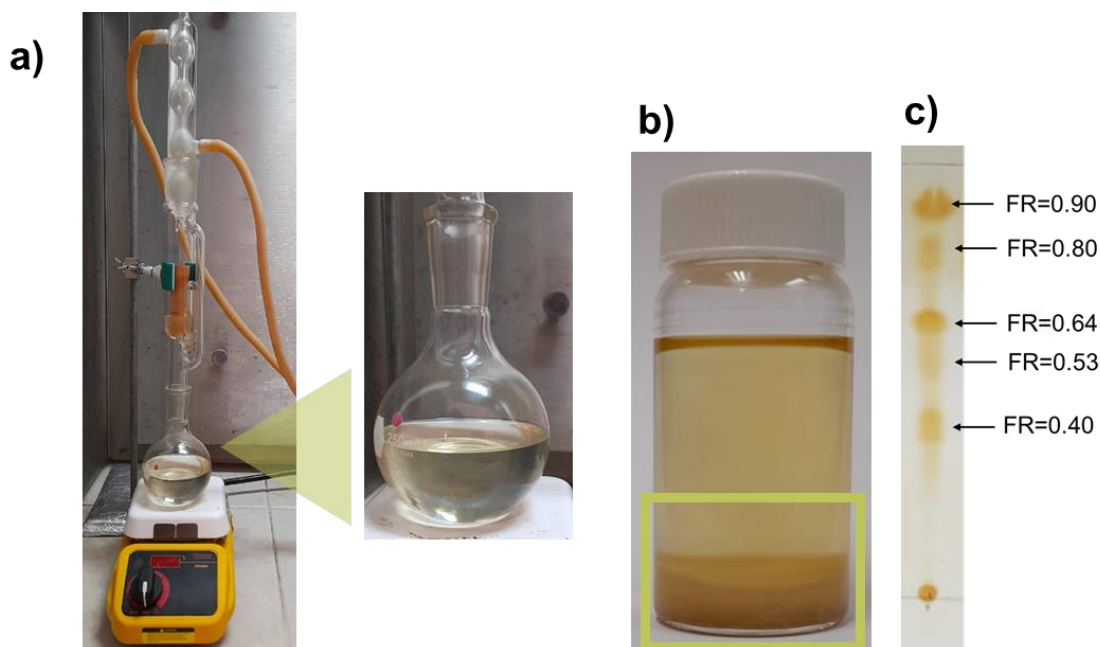


Figura 5. Obtención del extracto lipídico de la semilla de aguacate (LEAS). a) Equipo Soxhlet, se muestra el matraz que contiene el solvente (hexano) utilizado en la extracción. Las condiciones de extracción fueron: 14 h de reflujo a una temperatura de 60°C. b) Cristales de LEAS. c) Cromatografía en capa fina (TLC) de LEAS. Se realizó una TLC utilizando la siguiente mezcla de solventes: hexano, acetato de etilo, isopropanol, ácido acético (40:20:5:1), el revelado de la TLC se realizó usando yodo sublimado. Se muestran los valores del FR de las principales bandas, el cual se calculó como la distancia recorrida del componente entre la distancia recorrida del disolvente. FR: factor de retención.

Del extracto obtenido una parte se diluyó en DMSO obteniéndose un “stock madre” de 80 mg/mL que se utilizó para realizar las pruebas de citotoxicidad, y otra parte se diluyó en hexano (5 mg/mL) para llevar a cabo el fraccionamiento de LEAS mediante la cromatografía en columna.

9.2 Determinación del efecto citotóxico del extracto lipídico de la semilla de aguacate en líneas celulares cancerosas

El efecto citotóxico de LEAS se determinó mediante ensayos de exclusión por azul tripano a las 24 h en la línea celular B16-F0 de melanoma murino. Las células fueron tratadas con LEAS a las concentraciones de 5, 10, 15, 20, y 30 $\mu\text{g/mL}$, el vehículo (DMSO 0.1%) y actinomicina D (2.5 μM) como control positivo de muerte celular. Los resultados mostraron una disminución de la viabilidad celular dependiente de la concentración. A las 24 h de incubación con LEAS se observó que la concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$ disminuyó la viabilidad en un 60% con respecto al vehículo (Fig. 6a). Mediante un análisis de regresión lineal se calculó una concentración media inhibitoria (IC_{50}) de 25.3 $\mu\text{g/mL}$ a las 24 h.

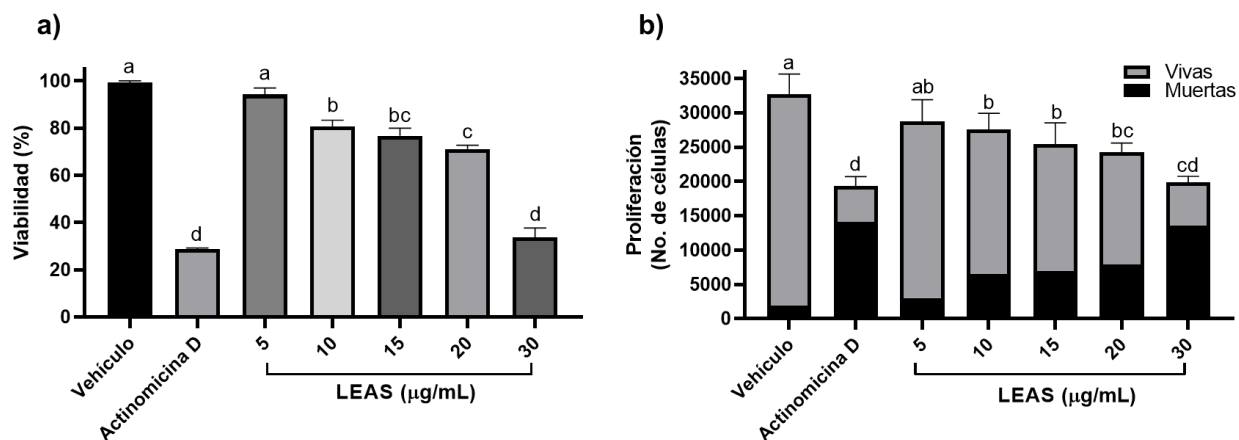


Figura 6. Efecto citotóxico del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano en las células B16-F0 de melanoma murino. Las células fueron tratadas con LEAS (5, 10, 15, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$), el vehículo (DMSO 0.1%) y actinomicina D (2.5 μM). El efecto citotóxico fue evaluado mediante ensayos de exclusión por azul tripano a las 24 h. **(a)** viabilidad y **(b)** proliferación celular. La viabilidad celular se calculó respecto al vehículo y se calculó la concentración media inhibitoria mediante un análisis de regresión lineal. Los datos presentan la media \pm EE. ANOVA de una vía, post hoc Tukey ($p \leq 0.05$). Letras diferentes representan diferencias significativas. $n=9$

El efecto de LEAS en la proliferación celular se determinó contando el número de células totales (vivas y muertas) en los tratamientos (Fig. 6b). Se obtuvo que LEAS disminuyó el número de células en un 40% en la concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$, con respecto al vehículo.

Posteriormente se evaluó el efecto citotóxico de LEAS en las líneas celulares cancerosas humanas. Se utilizaron dos líneas celulares de cáncer de mama diferentes: MCF-7 como modelo de cáncer epitelial y primario y MDA-MB-231 como modelo triple negativo mesenquimal, para evaluar el efecto de LEAS en diferentes aspectos de la progresión del cáncer. El efecto de LEAS en la viabilidad y proliferación celular fue evaluado mediante ensayos de exclusión por azul tripano. Las células fueron tratadas con las concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50 y 60 $\mu\text{g/mL}$ de LEAS, el vehículo y actinomicina D como control positivo de muerte durante 24 h. LEAS disminuyó la viabilidad e inhibió la proliferación celular de manera dependiente de la concentración en comparación con el vehículo en las líneas celulares MCF-7 (Fig. 7a, b) y MDA-MB-231 (Fig. 8a, b). En el caso de la viabilidad, mediante un análisis de regresión lineal se determinó una IC_{50} de 37.17 $\mu\text{g/mL}$ para MCF-7 y una IC_{50} de 30.14 $\mu\text{g/mL}$ para MDA-MB-231.

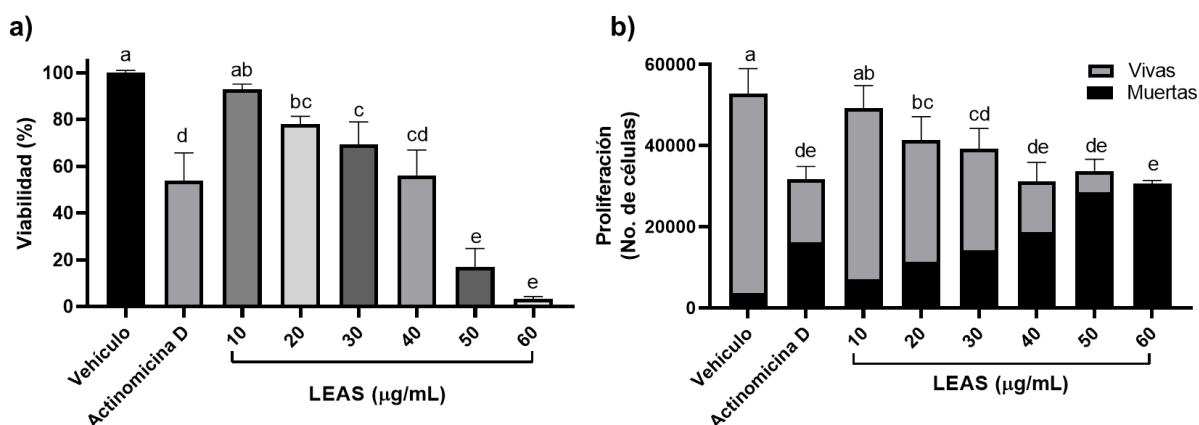


Figura 7. Efecto citotóxico del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano en las células MCF-7 de cáncer de mama. a) Viabilidad, b) proliferación celular. Las células fueron tratadas con LEAS (10, 20, 30, 40, 50 y 60 $\mu\text{g/mL}$), el vehículo (DMSO 0.1%) y actinomicina D (16 μM). El efecto citotóxico fue evaluado mediante ensayos de exclusión por azul tripano a las 24 h. La viabilidad celular se calculó respecto al vehículo y se estimó la concentración media inhibitoria mediante un análisis de regresión lineal. Los datos presentan la media \pm EE. ANOVA de una vía, post hoc Tukey ($p \leq 0.05$). Letras diferentes representan diferencias significativas. $n=9$

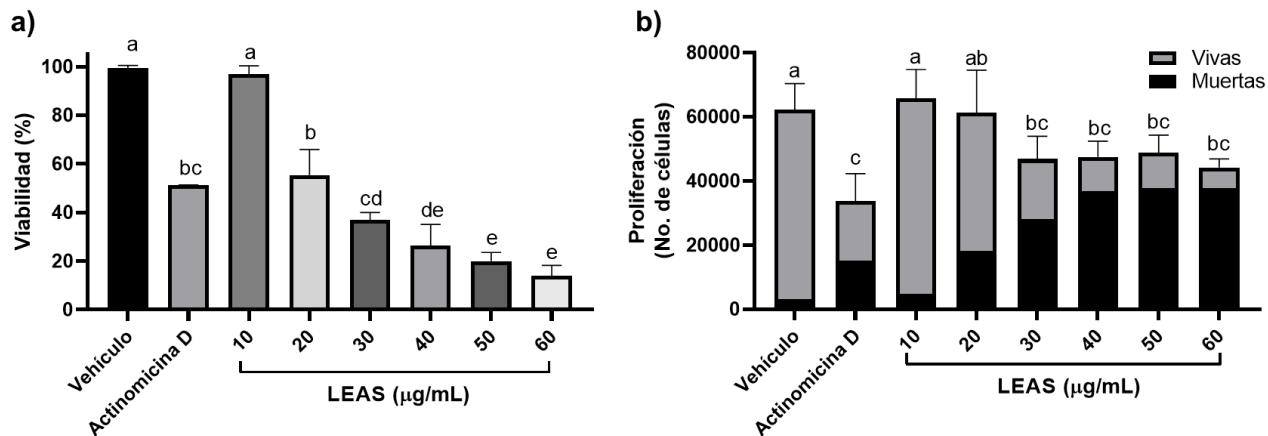


Figura 8. Efecto citotóxico del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano en las células MDA-MB-231 de cáncer de mama. a) Viabilidad, b) proliferación. Las células fueron tratadas con LEAS (10, 20, 30, 40, 50 y 60 µg/mL), el vehículo (DMSO 0.1%) y actinomicina D 16 µM. El efecto citotóxico fue evaluado mediante ensayos de exclusión por azul tripano las 24 h. La viabilidad celular se calculó respecto al vehículo y se estimó la concentración media inhibitoria mediante un análisis de regresión lineal. Los datos presentan la media ± EE. ANOVA de una vía, post hoc Tukey ($p \leq 0.05$). Letras diferentes representan diferencias significativas. n=9

9.3 Fraccionamiento del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano

El fraccionamiento del extracto lipídico de la semilla de aguacate se realizó mediante cromatografía en columna como se describió en materiales y métodos. Para identificar las bandas obtenidas se realizó una cromatografía en capa fina, se recuperaron cuatro fracciones (Fig. 9) con diferente factor de retención (RF: 0.80, 0.68, 0.53 y 0.40), las cuales corresponden a las bandas mayoritarias presentes en el extracto. Las fracciones obtenidas se secaron con nitrógeno gaseoso y se diluyeron en DMSO (2.5%) - etanol (2.5%) para obtener un stock de 100 µg/mL, los cuales se utilizaron para llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad.

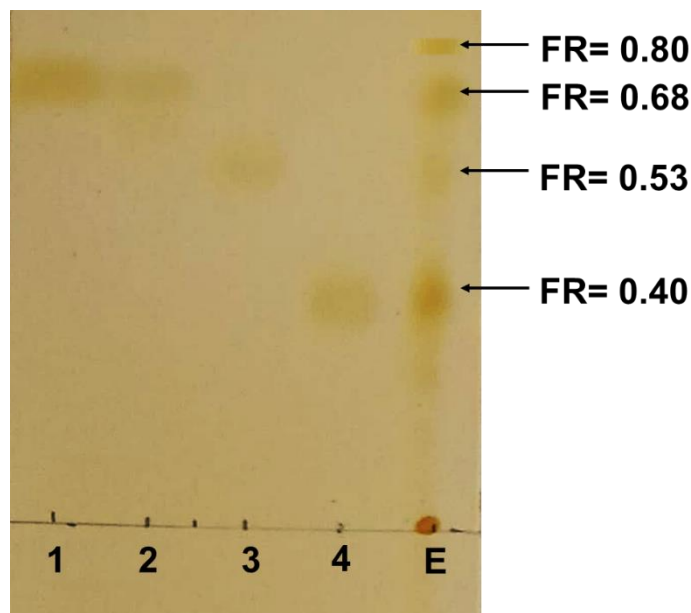


Figura 9. Cromatografía en capa fina (TLC) de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna del extracto lipídico de la semilla de aguacate. Se realizó una cromatografía en capa fina utilizando la mezcla de solventes hexano, acetato de etilo, isopropanol, ácido acético (40:20:5:1) para visualizar la composición de las fracciones recuperadas. Las placas secas fueron reveladas con yodo sublimado. Se reportan los valores de FR para cada banda. Los números en el eje de las X corresponden al número de la fracción. E= extracto LEAS.

9.4 Evaluación del efecto citotóxico de las fracciones del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano

9.4.1 Las fracciones del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano disminuyen la viabilidad e inhiben la proliferación celular de la línea celular cancerosa B16-F0

El efecto citotóxico de las fracciones obtenidas de LEAS se evaluó inicialmente en las células B16-F0 mediante ensayos de exclusión por azul tripano a las 24 h. Las células fueron tratadas con las fracciones 1 y 2 (10, 20, 30, 40, 50, 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y las fracciones 3 y 4 (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$), el vehículo (DMSO 0.05% y etanol 0.05%) y actinomicina D (2.5 μM) como control positivo de muerte celular. Los resultados mostraron que la fracción 1 no afectó la viabilidad celular (Fig. 10a) debido a que no se observó diferencia significativa en comparación al vehículo. Respecto a la fracción 2, esta disminuyó un 30% la viabilidad (Fig. 10b). Los efectos más significativos se observaron en las fracciones 3 (Fig. 10c) y 4 (Fig. 10d), donde se observó una

disminución de la viabilidad dependiente de la concentración, determinando una IC_{50} de $62.2 \mu\text{g/mL}$ y $61.14 \mu\text{g/mL}$ para la fracción 3 y 4, respectivamente. Para determinar si las fracciones de LEAS afectaban la proliferación celular, las células fueron tratadas con las fracciones 1, 2, 3 y 4 (Fig. 11 a-d) durante 24 h. La fracción 1 no afectó la proliferación. En el caso de la fracción 2 se observó un efecto a partir de la concentración de $20 \mu\text{g/mL}$. Sin embargo, el efecto fue más notorio con las fracciones 3 (Fig. 11c) y 4 (Fig. 11d), ya que estas provocaron una disminución en el número total de células de un 45 y 60%, respectivamente.

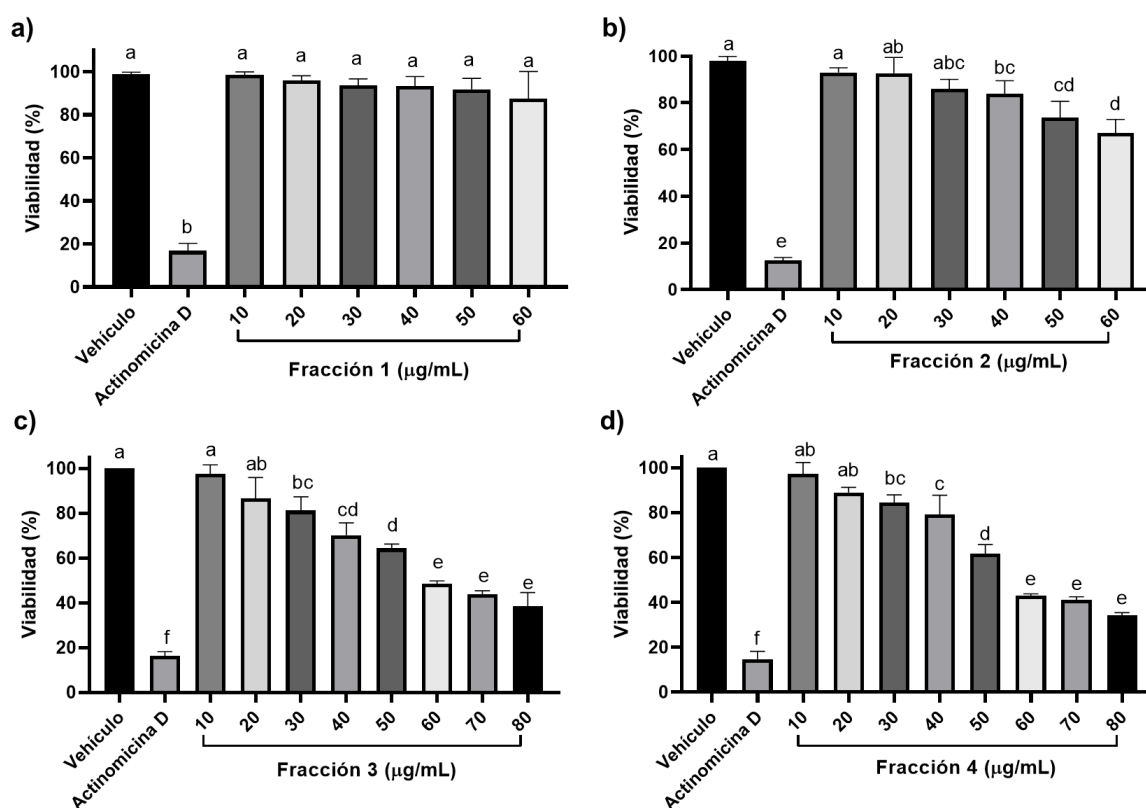


Figura 10. Efecto citotóxico de las fracciones del extracto lipídico de la semilla de aguacate en las células B16-F0. Las células fueron tratadas con la fracción 1 (a), 2 (b), 3 (c) y 4 (d) de LEAS a diferentes concentraciones. Se utilizó como vehículo DMSO 0.5% y etanol 0.5%, y como control positivo de muerte celular actinomicina D ($2.5 \mu\text{M}$). El efecto citotóxico fue evaluado mediante ensayos de azul tripano a las 24 h. La viabilidad celular se calculó respecto al vehículo. Los datos presentan la media \pm EE. ANOVA de una vía, post hoc Tukey ($p \leq 0.05$). Letras diferentes representan diferencias significativas. $n=9$

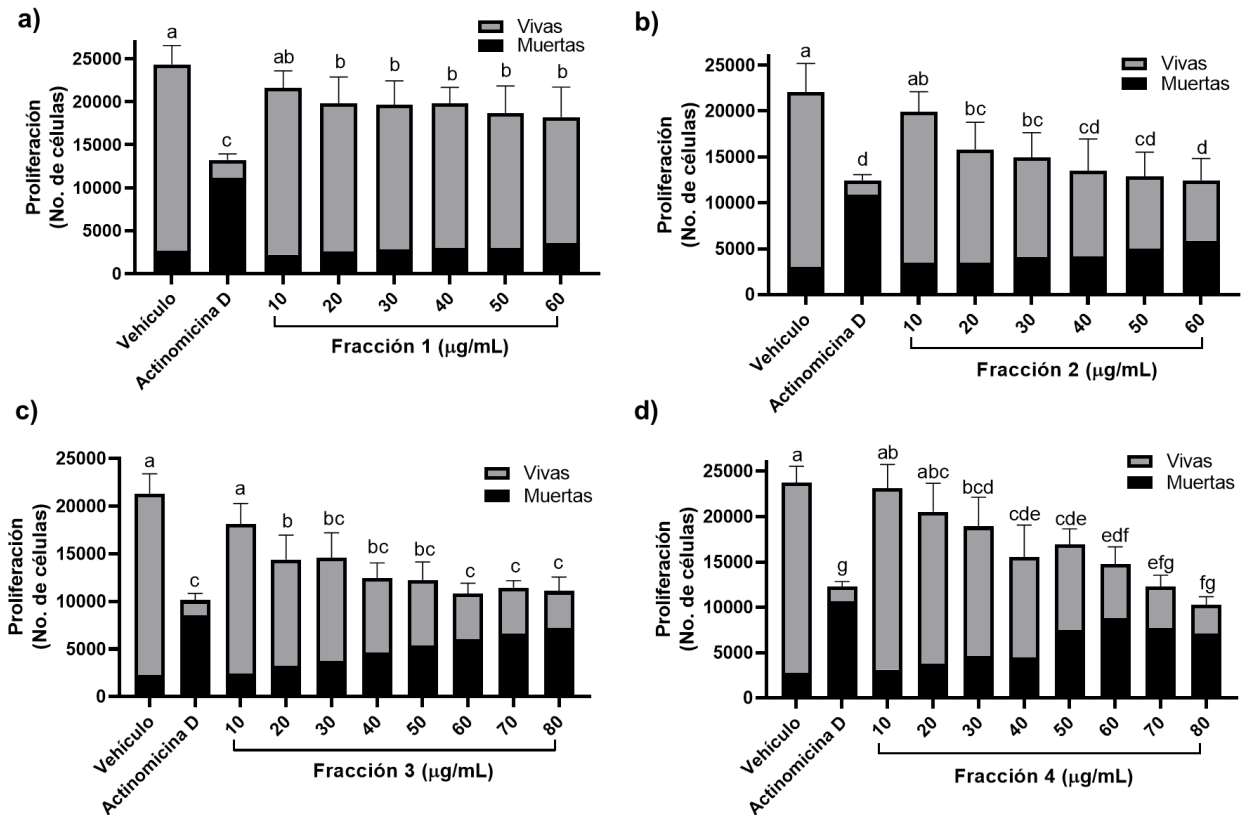


Figura 11. Las fracciones del extracto lipídico de la semilla de aguacate inhiben la proliferación de células B16-F0. Las células fueron tratadas con la fracción 1 (a), 2 (b), 3 (c) y 4 (d) de LEAS. Se utilizó como vehículo DMSO 0.05% y etanol 0.05% y como control positivo de muerte celular actinomicina D (2.5 µM). El efecto en la proliferación celular fue evaluado mediante ensayos de exclusión con azul tripano a las 24 h. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas. Los datos presentan la media ± EE. ANOVA de una vía, post hoc Tukey ($p \leq 0.05$). n=9

9.4.2 Las fracciones del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano disminuyen la viabilidad y la proliferación en células de cáncer de mama

Para determinar si las fracciones con efectos citotóxicos (fracción 3 y 4) en la línea celular B16-F0 de melanoma murino tienen propiedades citotóxicas en células cancerosas humanas, las fracciones fueron evaluadas en las líneas celulares de cáncer de mamá MCF-7 y MDA-MB-231.

El efecto de las fracciones en la disminución de la viabilidad y proliferación celular fue evaluado mediante ensayos de exclusión por azul tripano a las 48 h. Las células fueron tratadas con el vehículo (DMSO 0.05% y etanol 0.05%), actinomicina D como control positivo de muerte y las fracciones 3 y 4 a las concentraciones de 12.5, 25, 50, 75, y 100 $\mu\text{g/mL}$. Con respecto a la línea celular cancerosa MCF-7 la fracción 3 a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ disminuyó la viabilidad celular 40% con respecto al vehículo (Fig. 12a); mientras que la fracción 4 disminuyó la viabilidad hasta en 50% a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 12c). Además de afectar la viabilidad celular, también se demostró que las fracciones 3 (Fig. 13b) y 4 (Fig. 13d) inhiben la proliferación celular de las células MCF-7 en un 50% a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$. En esta línea celular no se pudo estimar una IC_{50} para las fracciones 3 y 4; sin embargo, se determinó una IC_{25} de 75 $\mu\text{g/mL}$ y de 50.8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

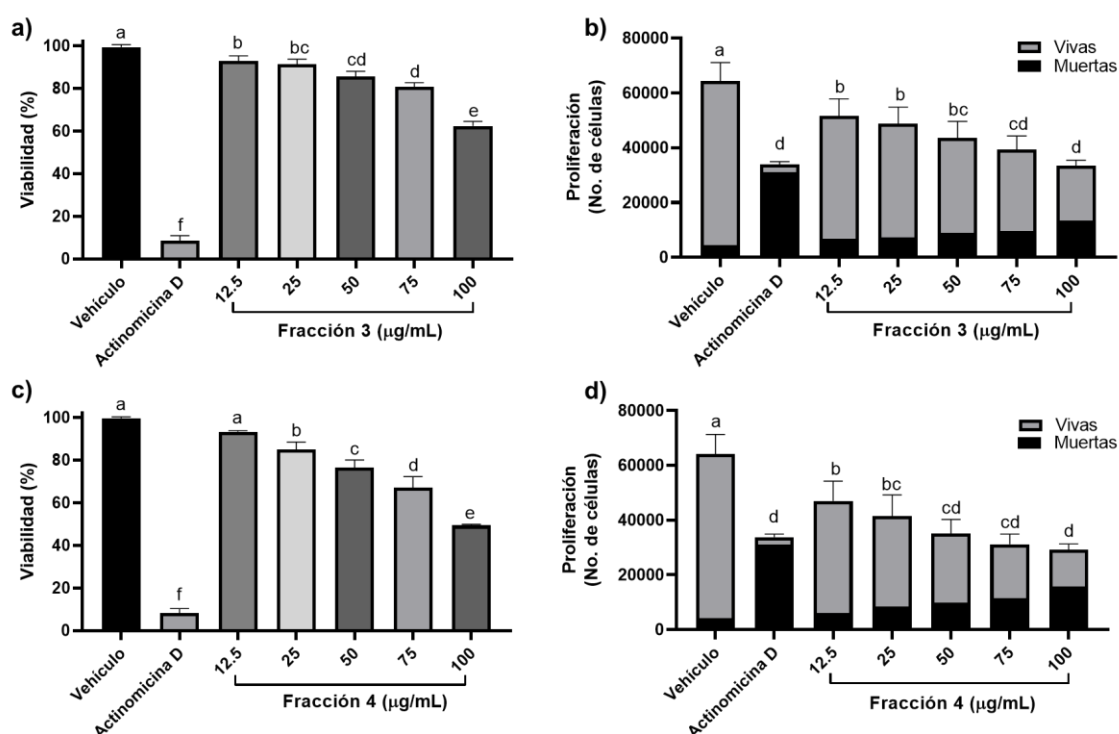


Figura 12. Efecto de las fracciones 3 y 4 del extracto lipídico de la semilla de aguacate sobre la viabilidad y proliferación de las células MCF-7. Las células fueron tratadas con las fracciones 3 (a,b), y 4 (c,d) a las concentraciones de 12.5, 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{g/mL}$. Se utilizó el vehículo DMSO 0.05%- etanol 0.05% y como control positivo de muerte celular actinomicina D (16 μM). El efecto sobre la viabilidad (a,c) y la proliferación celular (b,d) fue evaluado mediante ensayos de exclusión por azul tripano a las 48 h. La viabilidad celular se calculó respecto al vehículo. Los datos presentan la media \pm EE. ANOVA de una vía, post hoc Tukey ($p \leq 0.05$). Letras diferentes representan diferencias significativas. $n=9$

En la línea celular cancerosa MDA-MB-231 se determinó que la fracción 3 (Fig. 13a) disminuyó 40% la viabilidad celular a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la fracción 4 (Fig. 13c) disminuyó la viabilidad hasta 90% a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, determinando una IC_{50} de 55 $\mu\text{g/mL}$ para esta última fracción. Además se observó una disminución en la proliferación celular del 40% en comparación al vehículo en las células MDA-MB-321 tratadas con la fracción 3 (Fig. 13b) y una disminución en la proliferación del 50% en células tratadas con la fracción 4 a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 13d).

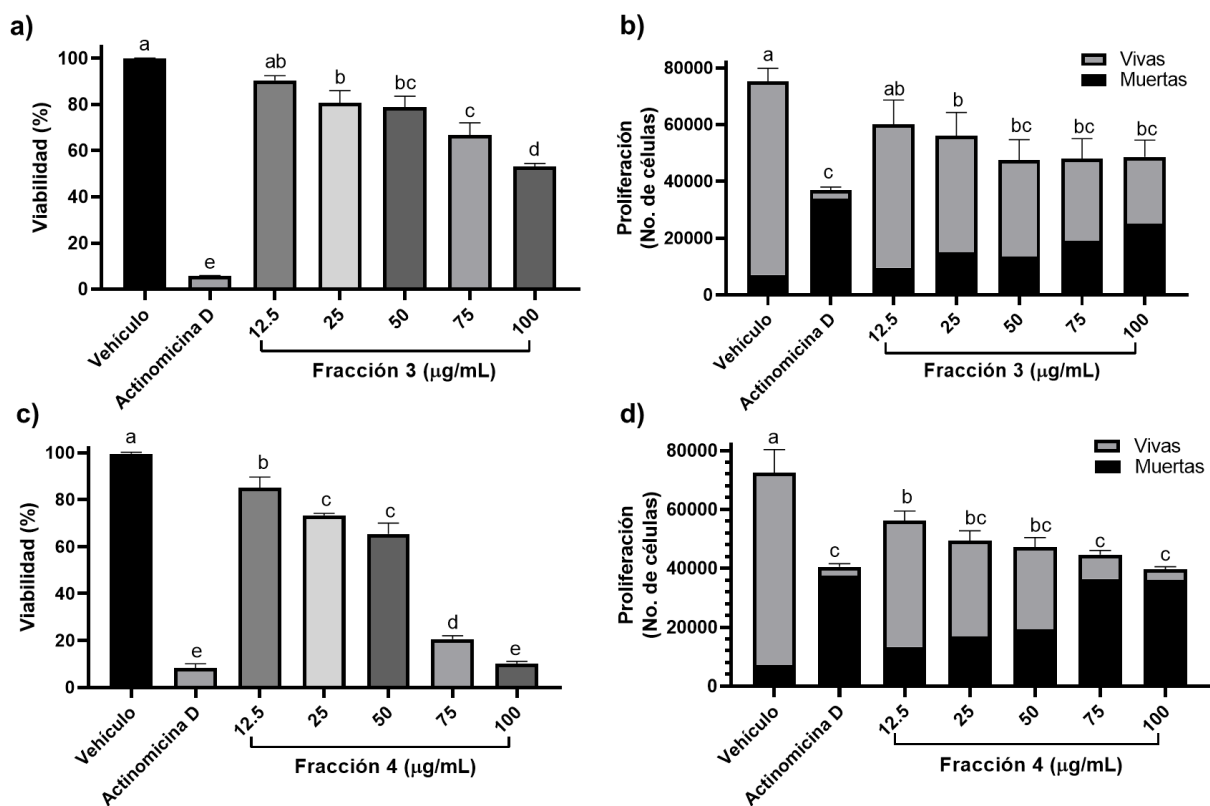


Figura 13. Efecto de las fracciones 3 y 4 del extracto lipídico de la semilla de aguacate sobre la viabilidad y proliferación de las células MDA-MB-231. Las células fueron tratadas con las fracciones 3 (a,b), y 4 (c,d) de LEAS a las concentraciones de 12.5, 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{g/mL}$. Se utilizó el vehículo (DMSO 0.05%- etanol 0.05%) y como control positivo de muerte celular actinomicina D (16 μM). El efecto sobre la viabilidad (a,c) y la proliferación celular (b,d) fue evaluado mediante ensayos de exclusión por azul tripano las 48 h. La viabilidad celular se calculó respecto al vehículo. Los datos presentan la media \pm EE. ANOVA post hoc Tukey ($p \leq 0.05$). Letras diferentes representan diferencias significativas. n=6

9.4.3 Las fracciones del extracto lipídico de la semilla de aguacate no tienen efectos citotóxicos en las células de epitelio mamario bovino

Para establecer si las fracciones de LEAS con efectos citotóxicos en células cancerosas afectan a células sanas, estas fueron evaluadas en las células de epitelio mamario bovino (CEMB). Las CEMB fueron tratadas con las fracciones 3 y 4 a las concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 y 100 $\mu\text{g/mL}$, el vehículo (DMSO 0.05%, etanol 0.05%) y actinomicina D (15 μM) como control positivo de muerte por 24 h. Mediante ensayos de exclusión por azul tripano, se determinó que las fracciones 3 (Fig. 14a) y 4 (Fig. 14b) no tienen efecto citotóxico en las CEMB a las concentraciones evaluadas, debido a que no se observó disminución de la viabilidad celular en comparación al vehículo, lo que sugiere selectividad hacia las células cancerosas.

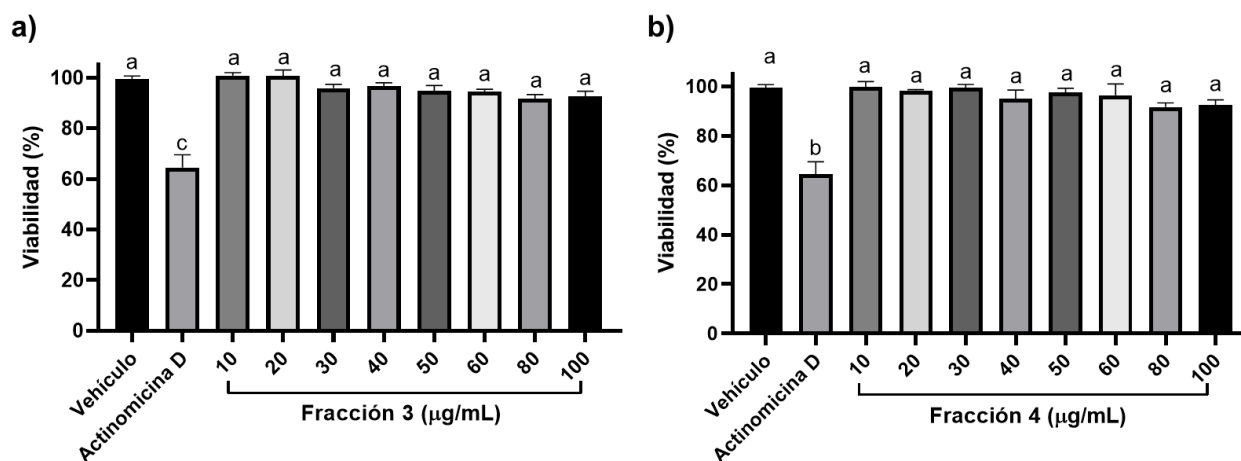


Figura 14. Las fracciones del extracto lipídico de la semilla de aguacate no afectan la viabilidad de las células de epitelio mamario bovino (CEMB). Las células se trataron con las fracciones 3 (a) y 4 (b) a las concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 y 100 $\mu\text{g/mL}$. Se utilizaron DMSO 0.05% y etanol 0.05% como vehículo, y actinomicina D (15 μM) como control positivo de muerte celular. El efecto citotóxico se evaluó mediante ensayos de exclusión con azul tripano a las 24 h. Los datos presentan la media \pm EE. ANOVA de una vía, post hoc Tukey ($p \leq 0.05$). Letras diferentes representan diferencias significativas. $n=9$

9.5 Las fracciones del extracto lipídico de la semilla de aguacate inducen apoptosis a través de la vía intrínseca en las líneas celulares cancerosas

Una vez determinado el efecto citotóxico de las fracciones 3 y 4 de LEAS en diferentes líneas celulares cancerosas, se realizaron ensayos de citometría de flujo para determinar el mecanismo de muerte inducido. Se utilizó anexina V como marcador de apoptosis. Para determinar la tasa de apoptosis en la línea celular B16-F0, las células se trataron con las IC₅₀ de LEAS, de la fracción 3 y la fracción 4 (Fig. 15). La fracción 3 aumentó la apoptosis ~ 3.5 veces, mientras que la fracción 4 indujo apoptosis ~ 3 veces después de 24 h de tratamiento.

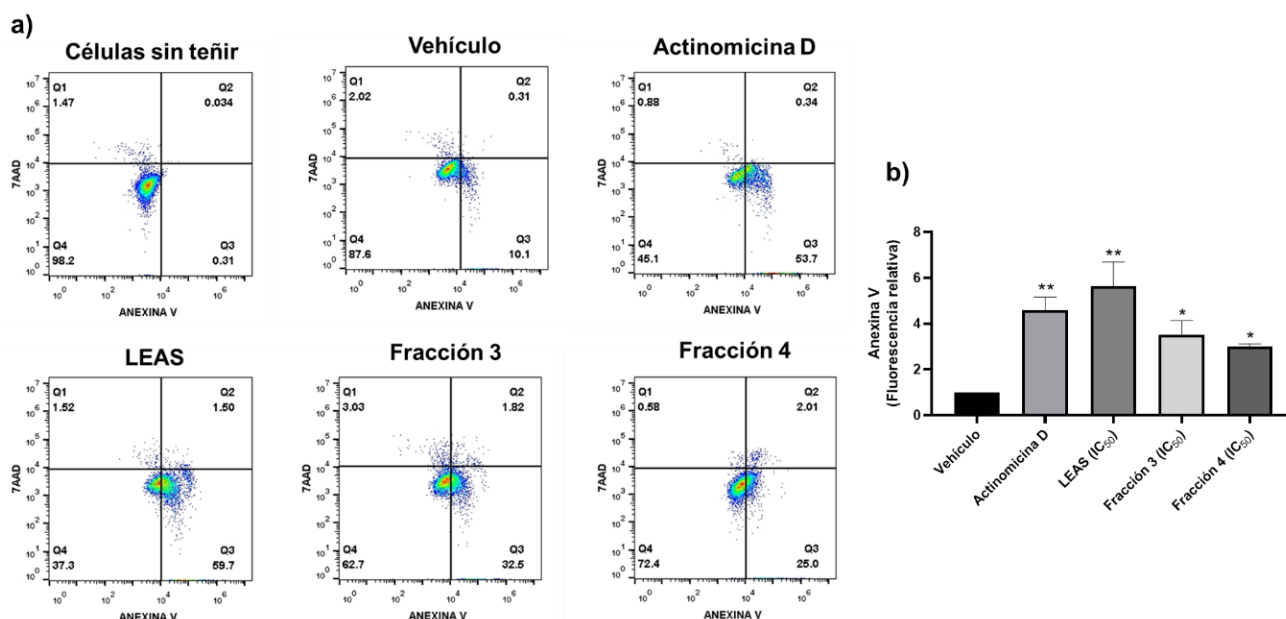


Figura 15. Las fracciones 3 y 4 del extracto lipídico de la semilla de aguacate inducen apoptosis en las células B16-F0. a) Las células se trataron con LEAS (IC₅₀ =25.3 µg/mL), la fracción 3 (IC₅₀ =62.2 µg/mL) y 4 (IC₅₀ =61.14 µg/mL), el vehículo (DMSO 0.05%-etanol 0.5%) o actinomicina D (2.5 µM) durante 24 h y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando tinción con anexina V y 7AAD para determinar la tasa de apoptosis. Los cuadrantes Q1, Q2, Q3 y Q4 corresponden a células necróticas, apoptosis tardía, apoptosis temprana y células vivas, respectivamente. **(b)** El gráfico muestran la intensidad relativa de fluorescencia de anexina V. ANOVA de una vía, post hoc Dunnett. * y ** indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo ($p \leq 0.05$). Los datos representan la media \pm EE de dos ensayos independientes por duplicado (n=4).

Posteriormente se realizaron ensayos de citometría de flujo para determinar la actividad de la caspasa 8 (Fig. 16a) y la caspasa 9 (Fig. 16b), las cuales son características de las vías extrínseca e intrínseca de apoptosis, respectivamente. A las 24 h de tratamiento se detectó que la fracción 3 activa la caspasa 8 y 9, mientras que la fracción 4 solo indujo la activación de la caspasa 9, indicando que se activa la vía intrínseca. Finalmente, LEAS indujo la activación de las caspasas 8 (~ 6 veces) y 9 (~ 7 veces).

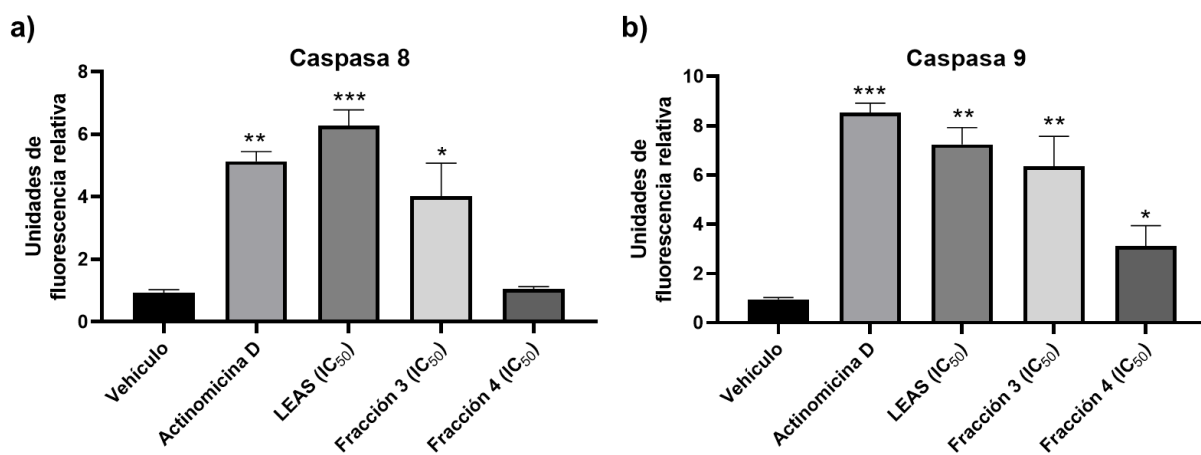


Figura 16. Las fracciones 3 y 4 del extracto lipídico de la semilla de aguacate activan la caspasa 9 en las células B16-F0. Las células se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la activación de la caspasa 8 (a) y la caspasa (9). Las células se trataron con el vehículo (DMSO 0.05%-etanol 0.05%), actinomicina D (16 μ M), LEAS (IC₅₀= 25.3 μ g/mL) y las fracciones 3 (IC₅₀= 62.2 μ g/mL) y 4 (IC₅₀= 61.14 μ g/mL) de LEAS durante 24 h. ANOVA de una vía, post hoc Dunnett. *, **, y *** indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo ($p \leq 0,05$). Los datos representan la media \pm EE de dos ensayos independientes por duplicado (n=4).

Adicionalmente, se analizó el mecanismo de muerte inducido en las células de cáncer de mama generado por el tratamiento con las fracciones de LEAS. Con respecto a las células MCF-7 (Fig. 17), se determinó que la fracción 3 aumentó la apoptosis 5 veces, y la fracción 4 aumentó la apoptosis ~ 6.5 veces a las 24 h. La evaluación de la actividad de caspasas en las células MCF-7 demostró que las fracciones 3 (Fig. 18a) y 4 (Fig. 18b) activan ~ 1.5 veces solo la caspasa 9, la cual es característica de la vía intrínseca.

En las células MDA-MB-231 (Fig. 19) la fracción 3 aumentó la apoptosis de manera similar a las células tratadas con LEAS (~ 3.5 veces), mientras que la fracción 4 aumentó la apoptosis ~ 2.5 veces a las 24 h. Además se estableció que se activa solo la caspasa 9 (~ 2.5 veces) en las células MDA-MB-231 al ser expuestas a la fracción 3 y la fracción 4 durante 24 h, activando la vía intrínseca de apoptosis (Fig. 20 a,b).

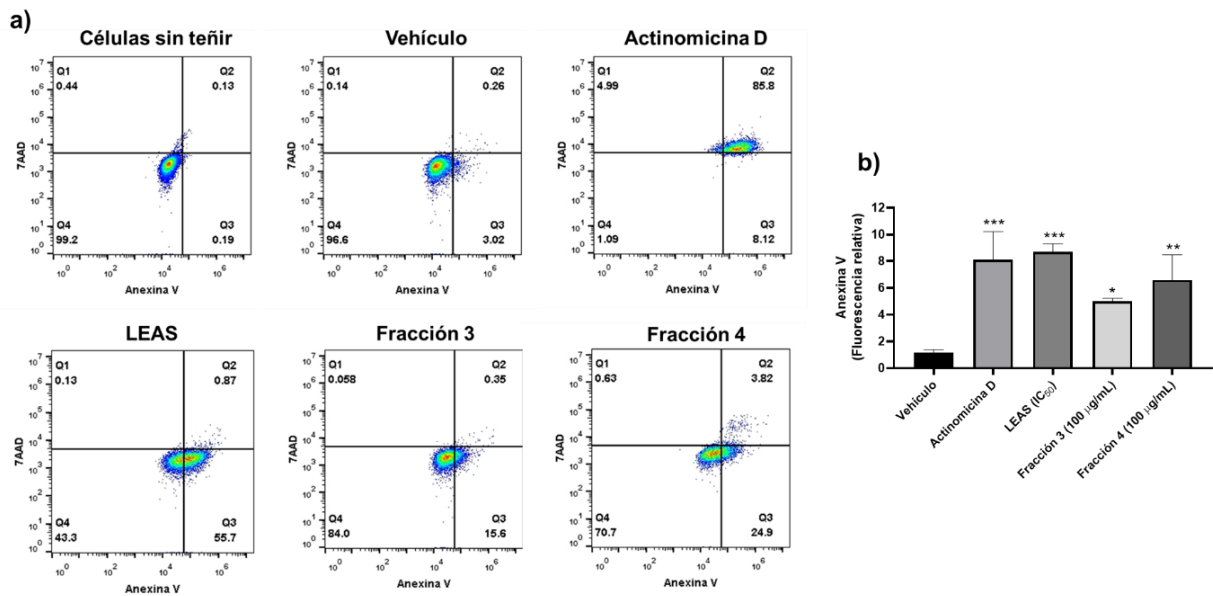


Figura 17. Efecto apoptótico de las fracciones 3 y 4 del extracto lipídico de la semilla de aguacate en las células MCF-7. a) Las células fueron tratadas con LEAS (IC₅₀=37.17 µg/mL), la fracción 3 y 4 a la concentración de 100 µg/mL, el vehículo (DMSO 0.05%-etanol 0.5%) o actinomicina D (16 µM) durante 24 h y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando la tinción con anexina V y 7AAD. Los cuadrantes Q1, Q2, Q3 y Q4 corresponden a células necróticas, apoptosis tardía, apoptosis temprana y células sin teñir, respectivamente. **(b)** El gráfico muestra la intensidad relativa de fluorescencia de anexina V. ANOVA de una vía, post hoc Dunnett. *, ** y *** indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo ($p \leq 0,05$). Los datos representan la media \pm EE de tres ensayos independientes por duplicado (n=6).

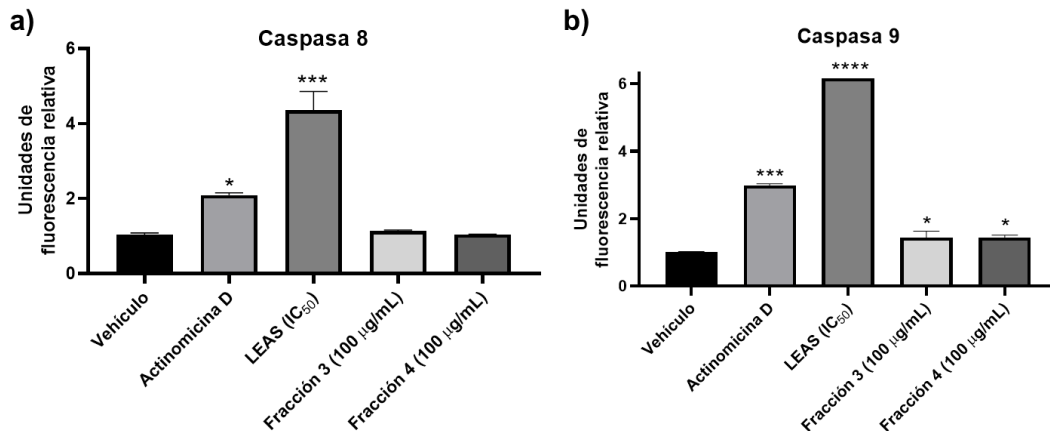


Figura 18. Las fracciones 3 y 4 del extracto lipídico de la semilla de aguacate activan la caspasa 9 en células MCF-7. Las células se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la activación de la caspasa 8 (a) y la caspasa (9). Las células se trataron con el vehículo (DMSO 0.05%-etanol 0.05%), actinomicina D (16 µM), LEAS (IC₅₀=37.17 µg/mL) y las fracciones 3 y 4 (100 µg/mL) durante 24 h. ANOVA de una vía, post hoc Dunnett. *, ***, y **** indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo ($p < 0,05$). Los datos representan la media ± EE de dos ensayos independientes por duplicado (n=4).

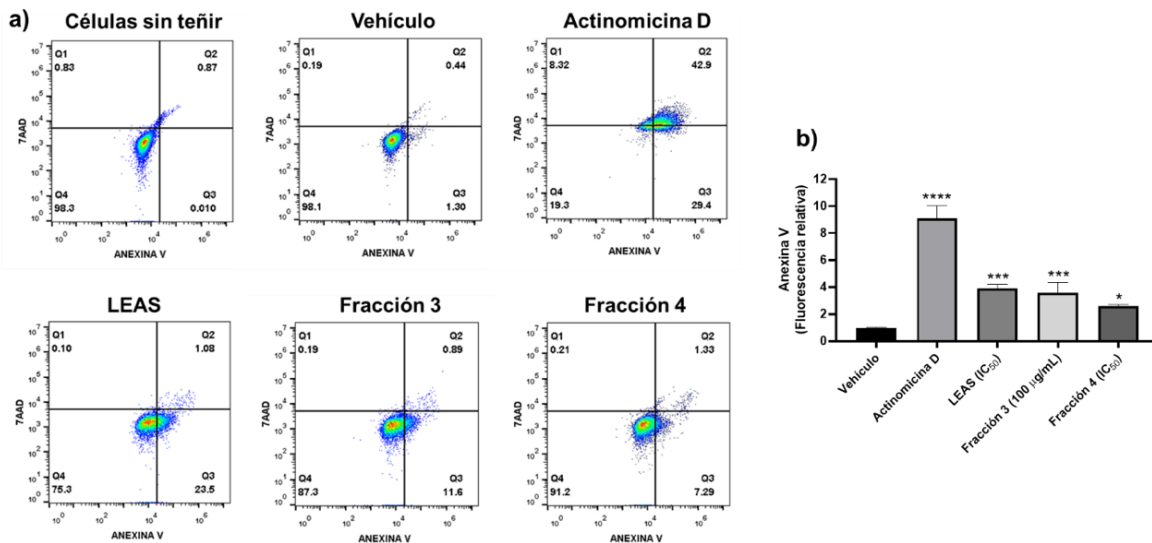


Figura 19. Efecto apoptótico de las fracciones 3 y 4 del extracto lipídico de la semilla de aguacate en células MDA-MB-231. a) Las células fueron tratadas con LEAS (IC₅₀=30.14 µg/mL), la fracción 3 (100 µg/mL) y 4 (IC₅₀: 55 µg/mL) el vehículo (DMSO 0.05%-etanol 0.5%) o actinomicina D (16 µM) durante 24 h y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando tinción con Anexina V y 7AAD. Los cuadrantes Q1, Q2, Q3 y Q4 corresponden a células necróticas, apoptosis tardía, apoptosis temprana y células sin teñir, respectivamente. (b) El gráfico muestran la intensidad relativa de fluorescencia de Anexina V. ANOVA de una vía, post hoc Dunnett. *, *** y **** indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo ($p \leq 0.05$). Los datos representan la media ± EE de dos ensayos independientes por duplicado (n=4).

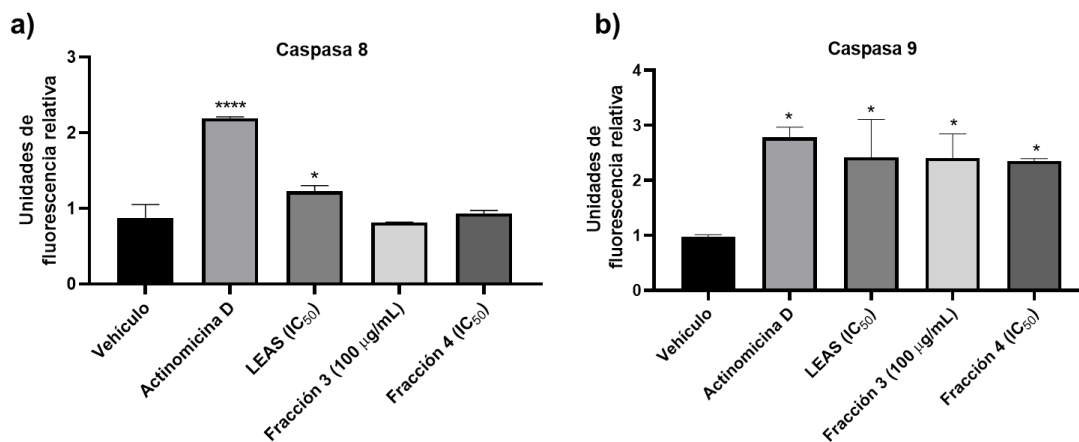


Figura 20. Las fracciones 3 y 4 de del extracto lipídico de semilla de aguacate activan la caspasa 9 en células MDA-MB-231. Las células se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la activación de la caspasa 8 (a) y la caspasa (9). Las células se trataron con el vehículo (DMSO 0.05%-etanol 0.05%), actinomicina D (16 µM), LEAS (IC₅₀= 30.14 µg/mL) y las fracciones 3 (100 µg/mL) y 4 (IC₅₀= 55 µg/mL) de LEAS durante 24 h. ANOVA de una vía, post hoc Dunnett. *, **, y *** indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo ($p < 0,05$). Los datos representan la media \pm EE de dos ensayos independientes por duplicado (n=4).

9.6 Identificación de los compuestos citotóxicos de las fracciones del extracto lipídico de la semilla de aguacate

Con el fin de analizar la composición de las fracciones 3 y 4, primero se realizó una derivatización por el método de metilación de ácidos grasos. Posteriormente, las fracciones se analizaron mediante CG-EM, la identificación de las moléculas se realizó utilizando las condiciones establecidas en el grupo de trabajo (Báez-Magaña *et al.*, 2019). Para la fracción 3 se obtuvo una molécula mayoritaria con un tiempo de retención de 18.86 y una abundancia del 40.7%, su espectro de masas sugiere que es una acetogenina de 17 C (C₁₉H₃₆O₄) con un peso molecular de 328.48 g/mol, la cual se muestra en la Fig. 21. La molécula correspondiente al tiempo de retención 14.94 con una abundancia de 31.5% se trata de otra acetogenina de 17 C de estructura similar. En la fracción 4 se obtuvo un pico mayoritario en el tiempo de retención de 13.03 con una abundancia de 52.21%, el espectro de masas obtenido sugiere que la molécula mayoritaria es una acetogenina de 21 C (C₂₃H₄₀O₄) con un peso molecular de 380.56 g/mol, la cual se muestra en la Fig. 22. El resto de los componentes de esta fracción corresponden a otras acetogeninas de 21 C.

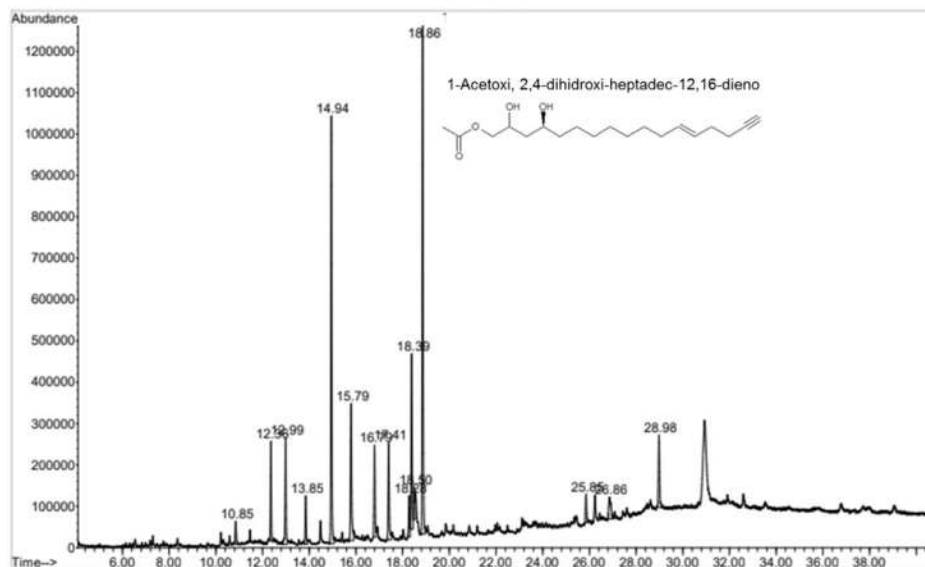


Figura 21. Cromatograma de CG-EM de la fracción 3 del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano. El pico mayoritario corresponde al tiempo de retención de 18.86, con una abundancia de 40.7%. La identificación de los compuestos se realizó comparando su espectro de masas y su tiempo de retención de acuerdo con la base de datos espectrales NIST/EPA/NIH. Se indica la estructura de la molécula mayoritaria (1-Acetoxy, 2,4-dihidroxi-heptadec-12,16-dieno).

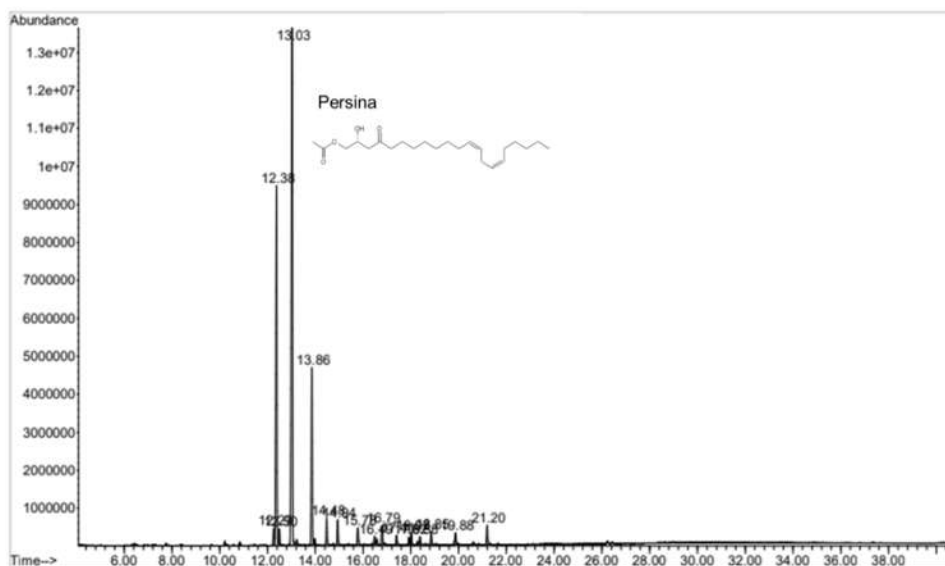


Figura 22. Cromatograma de CG-EM de la fracción 4 del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano. El pico mayoritario corresponde al tiempo de retención de 13.03 con una abundancia de 52.21%. La identificación de los compuestos se realizó comparando su espectro de masas y su tiempo de retención de acuerdo la base de datos espectrales NIST/EPA/NIH. Se indica la estructura de la molécula mayoritaria (persina).

X. DISCUSIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial (GLOBOCAN, 2022). No obstante, a pesar de la problemática de salud que ocasiona, las estrategias de tratamiento convencionales se asocian con una baja selectividad hacia las células cancerosas, el desarrollo de resistencia a los fármacos y por consecuencia efectos adversos graves (Alonso *et al.*, 2023). Esto genera la necesidad de encontrar compuestos con actividad citotóxica mejorada y específica contra las células cancerosas. En este sentido las plantas han sido ampliamente estudiadas con esta finalidad. Entre ellas el aguacate, planta en la que se han reportado actividades citotóxicas asociadas con más de 20 compuestos bioactivos, entre ellos los ácidos grasos (AG) y sus derivados (DAG) (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2021). En este trabajo se logró identificar las moléculas asociadas con el efecto citotóxico de un extracto de la semilla (LEAS) del aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*), las cuales pertenecen a acetogeninas de 17 y 21 C.

En estudios previos del grupo de trabajo se ha reportado la citotoxicidad de LEAS en diversas líneas celulares cancerosas de humanos, como la línea celular MCF-7 de cáncer de mamá (Solís-Avilés, 2021) y Caco-2 de cáncer de colon (Lara-Márquez *et al.*, 2020); y de animales, como la D-17 de osteosarcoma canino (Padilla-Arellanes *et al.*, 2021) y B16-F0 de melanoma murino (Garnica-Velázquez, 2023). Pero se desconocía la molécula responsable de esta toxicidad. LEAS es un extracto lipídico rico en AG de cadena larga y DAG como las acetogeninas alifáticas: avocatinas y ácidos grasos polihidroxilados de 17 C, pahuatinas de 19 C y persinas de 21 C. Cuando es analizado por TLC se observan 4 fracciones claramente separadas (Báez-Magaña *et al.*, 2019). Por ello, LEAS se fraccionó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, recuperando estas 4 fracciones con factores de retención de 0.80, 0.68, 0.53, 0.40 (Fig. 9).

Con el fin de identificar las fracciones citotóxicas, se realizó una selección dirigida evaluando su efecto citotóxico en las líneas B16-F0, MCF-7 y MDA-MB-231. Se determinó que solo las fracciones 3 (FR 0.53) y 4 (FR 0.40) tienen efectos citotóxicos a través de la inducción de la apoptosis por la vía intrínseca. Sin embargo,

el efecto citotóxico de las fracciones 3 y 4 es menor en todas las líneas celulares evaluadas en comparación con el efecto obtenido con LEAS. En las células B16-F0 las IC_{50} obtenidas con el tratamiento de las fracciones se incrementaron ~ 2 veces a las 24 h en comparación con la IC_{50} de LEAS. Mientras que en las células MCF-7 no se logró determinar una IC_{50} con ambas fracciones a las 48 h. Para el caso de las células MDA-MB-231 solo se determinó una IC_{50} (55 $\mu\text{g/mL}$) con la fracción 4 a las 48 h. Estos resultados sugieren que la actividad citotóxica de LEAS no está relacionada con la presencia de una sola molécula, sino al efecto combinando de moléculas, de ahí la relevancia de identificar las moléculas responsables de la actividad citotóxica. Sería interesante evaluar si la combinación de las fracciones 3 y 4 potencia el efecto citotóxico de las fracciones individuales y si estas recuperan la actividad de LEAS. Esto considerando que las dianas biológicas reportadas para las acetogeninas de 17 y 21 C son diferentes (Butt *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2015), y a que se ha observado que la bioactividad de las acetogeninas depende de la estructura de su cadena alifática (Rodríguez-López *et al.*, 2015).

Un punto para destacar es que las fracciones no afectaron la viabilidad de las CEMB, lo que sugiere que pueden ser específicas hacia las células cancerosas. Esto coincide con resultados previos del laboratorio, donde se había determinado que LEAS no afecta células sanguíneas sanas, mostrando especificidad hacia células cancerosas (Lara-Márquez *et al.*, 2020). Este resultado también es similar a lo reportado por Lee *et al.* (2015) donde la avocatina B fue selectiva en células de leucemia mieloide aguda (LMA); además, se ha demostrado que el consumo de la avocatina B no causa efectos tóxicos en pacientes sanos (Ahmed *et al.*, 2019). La selectividad de las fracciones obtenidas hacia las células cancerosas es un aspecto importante, debido a que los efectos adversos de los tratamientos contra el cáncer se asocian con una baja especificidad hacia estas células.

Por otra parte, los resultados mostraron que las fracciones tienen un efecto citotóxico distinto en las células cancerosas evaluadas y que no afectan las células sanas. En este estudio, las células B16-F0 fueron más susceptibles al tratamiento con las fracciones, en comparación con las líneas celulares de cáncer de mama. Las

células MCF-7 fueron las más resistentes ya que no se logró determinar una IC_{50} a las 48 h de tratamiento. Una posible explicación a este comportamiento diferencial podría ser la reprogramación del metabolismo lipídico en las células cancerosas (Havas *et al.*, 2017). Se conoce que la acetogenina avocatina B puede ingresar a las mitocondrias a través de la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1), donde altera la oxidación de ácidos grasos en células de LMA; además, el bloqueo de CPT1 anula los efectos citotóxicos de la avocatina B (Lee *et al.*, 2015). En este sentido, las células MCF-7 presentan niveles bajos de la conjugación de ácidos grasos de cadena larga con la carnitina para su transporte a las mitocondrias (Yadav *et al.*, 2020), lo cual se podría relacionar con la disminución del efecto citotóxico de las acetogeninas presentes en las fracciones. Adicionalmente en las células MCF-7 está sobreexpresada la sintasa de ácidos grasos, lo que se asocia con cánceres de mama más agresivos, esto debido a que la sobreexpresión de la sintasa de ácidos grasos es un mecanismo relacionado con la resistencia a fármacos contra el cáncer (Zeng *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha demostrado que el oncogén *MYC* altera el metabolismo de las células cancerosas, y la expresión de *MYC* está desproporcionadamente elevada en el cáncer de mama triple negativo (Carmada, *et al.*, 2016), lo que podría relacionarse con la disminución del efecto citotóxicos de las fracciones en las células MDA-MB-231.

La proliferación descontrolada de las células cancerosas es un factor clave en el crecimiento de un tumor y el desarrollo del cáncer (Roger, 2021), por lo que la inhibición de la proliferación es clave en la búsqueda de tratamientos contra el cáncer. En este estudio se determinó que LEAS inhibe la proliferación en las células B16-F0 (40%), MCF-7 (50%) y MDA-MB-231 (30%), lo cual concuerda con lo obtenido previamente con LEAS, donde se establece que inhibe la proliferación en células MCF-7 (Solís-Avíles, 2021) e induce la detención del ciclo celular en la fase G0/G1 en células Caco-2 de cáncer de colon y D-17 de osteosarcoma canino (Lara-Márquez *et al.*, 2021; Padilla-Arellanes *et al.*, 2021). De manera similar a lo obtenido con LEAS, las fracciones 3 y 4 inhibieron la proliferación celular de las líneas de cáncer. En las células B16-F0 la fracción 3 y 4 inhibieron la proliferación celular en un 45 y 60 % a las 24 h. Con respecto a las células MCF-7 se obtuvo la inhibición de la proliferación del 50%

con la fracción 3 y 4 a las 48 h; mientras que en las células MDA-MB-231 disminuyó en un 40 y 50% después del tratamiento por 48 h. En concordancia con estos resultados, D'Ambrosio *et al.* (2011) establecieron que las acetogeninas de 17 C inhiben la proliferación de células de cáncer oral 83-01-82CA. Mientras que la persina (21 C) inhibe la proliferación de distintas líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, MDAMB-231 y T-47D) mediante la detención del ciclo celular en la fase G2/M (Butt *et al.*, 2006). Resulta interesante evaluar en el futuro si el efecto antiproliferativo de las fracciones 3 y 4 de LEAS se deben a un arresto del ciclo celular en la fase G0/G1 como lo reportado para LEAS en la línea D-17 (Padilla-Arellanes *et al.*, 2021).

Una parte central de este trabajo fue la identificación de la o las moléculas responsables de la citotoxicidad de LEAS. A partir de las fracciones citotóxicas se obtuvieron los cromatogramas por CG-EM. Los resultados obtenidos por esta aproximación experimental, y su comparación con los estándares previamente establecidos por el grupo de trabajo (Baéz-Magaña *et al.*, 2019), sugieren que las moléculas mayoritarias de la fracción 3 son acetogeninas de 17 C (ej. 1-acetoxi, 2,4-dihidroxi-heptadec-12,16-dieno), mientras que las moléculas mayoritarias de la fracción 4 son acetogeninas de 21 C (ej. persina). Estos resultados coinciden con estudios previos que reportan que las moléculas mayoritarias de LEAS son las acetogeninas de 17 y 21 C (Báez-Magaña *et al.*, 2019; Lara-Márquez *et al.*, 2020). Además, la actividad citotóxica de la fracción 3 (rica en acetogeninas de 17 C) coinciden con el trabajo de Ding *et al.* (2009), quienes reportan la citotoxicidad de dos acetogeninas de 17 C obtenidas de un extracto del mesocarpio aguacate Hass en células de cáncer oral. Asimismo, se ha reportado que la avocatina B (una mezcla de avocadeno y avocadina, dos alcoholes grasos polihidroxilados de 17 carbonos) disminuye la viabilidad de las células de leucemia mieloide aguda (OCI-AML2 y TEX) (Lee *et al.*, 2015; Tcheng *et al.*, 2021). Interesantemente, Báez-Magaña (2019) reporta que una acetogenina de 17 C, denominada kupandina, es la responsable de las propiedades inmunomoduladoras del extracto, por lo que es necesario evaluar si estas moléculas en realidad son las mismas o son distintas. Resultaría muy atractivo determinar si la misma molécula es la responsable de la actividad inmunomoduladora y citotóxica de LEAS. Respecto a las actividades citotóxicas de la fracción 4 rica en

acetogeninas de 21 C (como la persina), en coincidencia Ding *et al.* (2006) reportan que la persina tiene efectos citotóxicos en células MCF-7 y MDA-MB-231.

Por otra parte, se ha determinado que el efecto citotóxico de LEAS está relacionado con la inducción de la apoptosis extrínseca e intrínseca en las células cancerosas Caco-2 y D-17 (Lara-Márquez *et al.*, 2020; Padilla-Arellanes, *et al.*, 2021). En este estudio en la línea celular B16-F0 se obtuvo un aumento de apoptosis de 5.5 veces, mientras que en las líneas de cáncer de mama se indujo apoptosis en ~8.5 y 3.5 veces en MCF-7 y MDA-MB-231, respectivamente. Además se determinó que LEAS activa la vía extrínseca e intrínseca de apoptosis en las células B16-F0, MCF-7 y MDA-MB-231. Si bien en este estudio no se determinaron los mecanismos asociados a la activación de caspasas en las líneas celulares evaluadas, ya se han establecido los mecanismos de LEAS en distintas células cancerosas. Lara-Márquez *et al.*, 2020 reportaron que LEAS ($IC_{50}= 28 \mu\text{g/mL}$) en células de cáncer Caco-2 inhibe la oxidación de ácidos grasos (45%), y promueve la producción de ROS mitocondriales (52%) causando estrés oxidativo, lo que conlleva a la pérdida en el potencial de la membrana mitocondrial (58.2%) y posteriormente la activación de apoptosis extrínseca e intrínseca. En concordancia con estos resultados, Padilla-Arellanes *et al.*, (2021) establecieron que LEAS ($IC_{50}= 15.5 \mu\text{g/mL}$) indujo la pérdida en el potencial de la membrana mitocondrial, ocasionado por la producción de O^{-2} y ROS mitocondriales, lo cual es consistente con la activación de apoptosis por vía intrínseca. Mientras que en células MCF-7 ($IC_{50}= 47 \mu\text{g/mL}$) la inducción de apoptosis se relacionó con la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (41.5%). Estos resultados en conjunto sugieren que la actividad anticancerosa de LEAS se relaciona con un efecto directo sobre las mitocondrias. Adicional a esto, la inducción intrínseca de apoptosis en células cancerosas es un factor clave en la búsqueda de compuestos citotóxicos ya que podría restaurar la sensibilidad de las células cancerosas a los tratamientos de radioterapia o quimioterapia (Pazo, 2011), por lo que las moléculas con propiedades citotóxicas de LEAS podrían ser utilizadas en modelos *in vivo* de cáncer o en combinación con compuestos citostáticos.

La vía intrínseca de apoptosis es activada por estímulos internos, como daño al ADN, reprogramación metabólica o estrés oxidante, lo que provoca la pérdida de la integridad de la membrana externa mitocondrial, la formación de poros mitocondriales y la liberación del citocromo c, lo que resulta en la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa 9 (Grasso *et al.*, 2020). Las alteraciones en la regulación de la apoptosis son críticas en el desarrollo y supervivencia de las células cancerosas y en la resistencia al tratamiento. La inhibición de la apoptosis es esencial en la progresión del cáncer y es un punto clave en el desarrollo de fármacos antitumorales (Delgado-Waldo *et al.*, 2024). En este estudio se determinó que las fracciones 3 y 4 de LEAS inducen apoptosis mediante la activación de la caspasa 9 en células B16-F0, MCF-7 y MDA-MB-231, lo que sugiere la inducción de la vía intrínseca; sin embargo, hacen falta más estudios para determinar las vías o mecanismos asociados a la activación de apoptosis. Previamente se determinó que la avocatina B induce apoptosis en células leucémicas por la liberación de las proteínas mitocondriales AIF y citocromo c, además de inhibir la oxidación de ácidos grasos, lo que causó una reducción de NADPH y GSH, producción de ROS y muerte celular (Lee *et al.*, 2015); por lo que se podría hipotetizar que la fracción 3 (acetogeninas 17 C) induce apoptosis mediante cambios en el metabolismo energético mitocondrial. Los ácidos grasos de 16 a 20 C pueden ingresar a la mitocondria mediante la CTP1, y acumularse en ellas causando efectos lipotóxicos, debido a que los ácidos grasos de cadena impar pueden bloquear o reducir la eficiencia de la oxidación de ácidos grasos (Zeng, 2016; Tchong, 2021). Con base a esto, la selectividad de la fracción 3 hacia las células cancerosas podría deberse al fenotipo mitocondrial de estas células, ya que las células cancerosas tienen mayor masa mitocondrial en comparación con las células normales (Boland, 2013).

Por otro lado, se ha reportado que las persinas inducen apoptosis dependiente de caspasas en células de cáncer de mama (MCF-7, T-47D y MDA-MB-231) activando la vía extrínseca e intrínseca. La activación de la muerte celular de las células tratadas con la persina sugiere que la apoptosis es inducida a través de un mecanismo dependiente de la expresión de Bim, exclusiva de BH3, la cual es una proteína proapoptótica que induce apoptosis debido a alteración en la integridad de los

microtúbulos (Butt *et al.*, 2006). De manera contraria en este estudio se estableció que la persina induce apoptosis en las células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, solo por la activación de la vía intrínseca, siendo las células MDA-MB-231 más susceptibles a la activación de la caspasa 9 después del tratamiento con la fracción 4. No obstante hacen faltan estudios para determinar este fenómeno, ya que en estudios previos Ding *et al.*, (2007) reportaron que el efecto de la persina es independiente del estado del receptor de estrógeno, p53 y Bcl-2 en las células cancerosas, lo que resalta el potencial de las acetogeninas de 21 C como tratamiento terapéutico contra el cáncer.

XI. PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES

- Determinar la estructura química de las moléculas de las fracciones 3 y 4.
- Establecer los mecanismos o vías relacionadas con la inducción de apoptosis intrínseca.
- Determinar la fase del ciclo celular que se inhibe con el tratamiento de las fracciones 3 y 4.
- Evaluar el efecto citotóxico conjunto de las fracciones 3 y 4 en células cancerosas.

XII. CONCLUSIONES

Las acetogeninas de 17 y 21 C son las responsables del efecto citotóxico del extracto lipídico de la semilla del aguacate nativo mexicano en las líneas celulares B16-F0, MCF-7 y MDA-MB-231, a través de la inhibición de la proliferación celular y la inducción de la apoptosis por vía intrínseca.

XIII. LITERATURA CITADA

1. Ahuja, N., Harma, A., y Baylin, S. (2016) Epigenetic therapeutics: A new weapon in the war against cancer. *Annual Review of Medicine* 67; 73-89.
2. Ahmed, N., Tchong, M., Roma, A., Buraczynski, M., Jayanth, P., Rea, K., Akhtar, T., y Spagnuolo P. (2019). Avocatin B protects against lipotoxicity and improves insulin sensitivity in diet-induced obesity. *Molecular Nutrition Food Research* 63(24).
3. ASC. (2022). Oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN. American Cancer Society. Recuperado 20 de marzo de 2025 (<https://www.cancer.org/es/cancer>).
4. Báez-Magaña, M., Ochoa-Zarzosa, A., Alva-Murillo, N., Salgado-Garciglia, R., & López-Meza, J. E. (2019). 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. *Journal of Immunology Research*. 2019
5. Bock, F., y Tait, S. (2020). Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 21, 85-100.
6. Bock, F., y Riley, J. (2023). When cell death goes wrong: inflammatory outcomes of failed apoptosis and mitotic cell death. *Cell Death & Differentiation*. 30, 293-303.
7. Boland, M., Chourasia, M. y Macleod, K. (2013). Mitochondrial dysfunction in cancer. *Frontiers in Oncology*. 3(292); 1:28.
8. Butt, J., Roberts, C., Seawright, A., Oelrichs, P., Macleod, J., Liaw, T., y Sutherland, R. (2006). A novel plant toxin, persin, with in vivo activity in the mammary gland, induces Bim-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 5(9); 2300-2309.
9. Camarda, R., Zhou, A., Kohnz R., Balakrishnan, S., Mahieu. C., Anderton, B., Eyob, H., Kajimura, S., Tward, A., Krings, G., Nomura, G., y Goga, A. (2016). Inhibition of fatty acid oxidation as a therapy for MYC-overexpressing triple-negative breast cancer. *Nature Medicine*. 22; 427–432
10. Cáncer. (s/f). Paho.org. Recuperado el 3 de enero de 2023, de <https://www.paho.org/es/temas/cancer>.
11. Cervantes-Paz, B., y E. Yahia. (2021). Avocado oil: Production and market demand, bioactive components, implications in health, and tendencies and potential uses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 20 (4); 4120-4158.
12. Cid-Pérez, T., Hernández-Carranza, P., Ochoa-Velasco, C., Ruiz-López, I., Nevárez-Moorillón, G., y Ávila-Sosa, R. (2021). Avocado seeds (*Persea americana* cv. Criollo sp.): Lipophilic compounds profile and biological activities. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 28(6), 3384-3390.
13. Colin-Oviedo, A., Garza-Aguilar, S., Marín-Obispo, L., Rodríguez-Sánchez, D., Trevino, V., Hernández-Brenes, C., Díaz de la Garza, R. (2022). The enigmatic aliphatic acetogenins and their correlations with lipids during deed germination and leaf development of avocado (*Persea americana* Mill.). *Frontiers in Plant Science*. 13; 1-17.

14. Collignon, T., Webber, K., Piasecki, J., Rahman, A., Mondal, A., Barbalho, S., y Bishayee, A. (2023). Avocado (*Persea americana* Mill.) and its phytoconstituents: potential for cancer prevention and intervention. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1 (21).
15. D'Ambrosio, S., Han, C., Pan, L., Kinghorn, A., y Ding, H. (2011). Aliphatic acetogenin constituents of avocado fruits inhibit human oral cancer cell proliferation by targeting the EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK1/2 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 409(3); 465-469.
16. Dabas, D., Shegog, R. M., Ziegler, G. R., y Lambert, J. D. (2013). Avocado (*Persea americana*) seed as a source of bioactive phytochemicals. *Current Pharmaceutical Design*. 19(34); 6133-6140.
17. de León, J., y Pareja, A. (2018). Inmunología del cáncer I: bases moleculares y celulares de la respuesta inmune antitumoral. *Horizonte Médico*. 18(3); 80-89.
18. Delgado-Waldo, I., Dokudovskaya, S., Loissell-Baltazar, Y., Pérez-Arteaga, E., Coronel-Hernández, J., Martínez-Vázquez, M., Pérez-Yépez, E., Lopez-Saavedra A., Jacobo-Herrera, N., y Pérez-Plasencia C. (2024). Laherradurin inhibits colorectal cancer cell growth by induction of mitochondrial dysfunction and autophagy induction. *Cells*, 13.
19. Ding, H., Chin, Y., Kinghorn, D., y D'Ambrosio, S. (2007). Chemopreventive characteristics of avocado fruit. *Seminars in Cancer Biology*. 17; 386-394.
20. Donohoe, D., Collins, L., Wali, A., Bigler, R., Sun, W., y Bultman, S. (2012). The warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Molecular Cell*. 48(4).
21. Elinos, M., Maldonado, V., y Meléndez, J. (2003). Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gaceta Médica de México*. 139(2); 493-499.
22. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., y Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*. 149(4), 778-789.
23. Figueroa, J., Borrás, I., Lozano J., y Segura, A. (2018) Comprehensive identification of bioactive compounds of avocado peel by liquid chromatography coupled to ultra-high-definition accurate-mass Q-TOF. *Food Chemistry*. 245; 707-716.
24. Flores, L., Guzmán, J., López, R., Salgado, R., Ochoa, A., y López, J. (2018). PaDef defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) is cytotoxic to K562 chronic myeloid leukemia cells through extrinsic apoptosis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 99; 10-18.
25. Garnica-Velázquez D. (2023). Efecto antitumoral de un extracto rico en lípidos de la semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) en un modelo *in vivo* de melanoma murino. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
26. GLOBOCAN (2022). Global cancer observatory. *International Agency for Research on Cancer*.
27. Gómez C., Lara I., Sánchez A., y Herzberg A. (2022). Epigenética en el cáncer. *Revista de la academia mexicana de ciencias*. 73(4); 34-41.
28. Grasso, D., Zampieri, L., Capelôa, T., Van de Velde, J., y Sonveaux, P. (2020). Mitochondria in cancer. *Cell stress*. 4(6); 114-146.

29. Gutiérrez-Díaz, A., Martínez, J., García-Zambrano, E., Iracheta-Donjuan, L., Ocampo-Morales, J., y Cerda-Hurtado, I. (2009). Estudio de diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 32(1); 9-18.
30. Guzmán-Rodríguez, J. J., López-Gómez, R., Salgado-Garciglia, R., Ochoa-Zarzosa, A., y López-Meza, J. E. (2016). The defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 82; 620-627.
31. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer Discovery*. 12(1); 31-46.
32. Hassan, M., Moneim, S., Mahmoud, E., y Mohamed D. (2022). Antioxidant, anti-cancer and anti-arthritic activities of acetogenin-rich extract of avocado pulp. *Egyptian Journal of Chemistry*. 65(2); 539-550.
33. Havas, K., Milchevskaya, V., Radic, K., Alladin, A., Kafkia, E., Garcia, M., Stolte, J., Klaus, B., Rotmensch, N., Gibson, T., Burwinkel, B., Schneeweiss, A., Pruner, G., Patil, K., Sotillo, R., y Jechlinger, M. (2017). Metabolic shifts in residual breast cancer drive tumor recurrence. *The Journal of Clinical Investigation*. 127(6); 2090-2105.
34. Hernández-Martínez, M. A., Suárez-Rodríguez, L. M., López-Meza, J. E., Ochoa-Zarzosa, A., Salgado-Garciglia, R., Fernández-Pavía, S. P., y López-Gómez, R. (2022). Antifungal activity of avocado seed recombinant GASA/snakin PaSn. *Antibiotics (Basel)*. 11(11); 1558.
35. Jayasankar, V., Vrdoljak, N., Roma, A., Ahmed, N., Tchong, M., Minden, D., y Spagnuolo, P. (2022). Novel mango ginger bioactive (2,4,6-trihydroxy-3,5-diprenyldihydrochalcone) inhibits mitochondrial metabolism in combination with avocatin B. *ACS Omega*. 7(2); 1682-1693.
36. Khalifa, N. S., Barakat, H. S., El-Hallouty, S., y Salem, D. (2013). Effect of the water extracts of avocado fruit and cherimoya leaf on four human cancer cell lines and *Vicia faba* root tip cells. *Journal of Agricultural Science*. 5(7).
37. 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.
38. 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. (2020). Lipid-rich extract from Mexican avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) induces apoptosis and modulates the inflammatory response in Caco-2 human colon cancer cells. *Journal of Functional Foods*; 64(103658).
39. Lee, E., Angka, L., Rota, S., Hanlon, T., Mitchell, A., Hurren, R., Wang, X., Gronda, M., Boyaci, E., Bojko, B., Minden, M., Sriskanthadevan, S., Datti, A., Wrana, J., Edginton, A., Pawliszyn, J., Joseph, J., Quadrilatero, J., Schimmer, A., y Spagnuolo, P. (2015). Targeting mitochondria with avocatin B induces selective leukemia cell death. *Cancer Research*. 75(12), 2478-2488.
40. Lima, L., Alves, T., Zani, C., Júnior, P., Romanha, A., Johann, S., Cisalpino P. S., Pimenta L., y Boaventura, M. (2014). In vitro cytotoxic, antifungal, trypanocidal and leishmanicidal activities of acetogenins isolated from *Annona*

- cornifolia* A. St.-Hil. (Annonaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 86; 829-839.
41. Ma, C., Wang, Q., Shi, Y., Li, Y., y Wang X. (2017) Three new antitumor annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. *Natural Product Research*. 1(6).
 42. Moghadamtousi, S., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H., y Kadir, H. A. (2015). *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional use, isolated acetogenins and biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*. 7; 15625-15658.
 43. Muñoz, D., y Cuca, L. (2016). Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). *Revista Colombiana de Cancerología*. 20(3); 124-134.
 44. NIH, (2015). Chemotherapy to Treat Cancer. *National Cancer Institute* Recuperado 20 de enero de 2024 (<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/chemotherapy>).
 45. NIH, (2019). Radiation Therapy to Treat Cancer. *National Cancer Institute* Recuperado 01 de febrero de 2024 (<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy>).
 46. NIH. (2021). What is cancer. *National Cancer Institute*. Recuperado 20 de mayo de 2023 (<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>).
 47. Ochoa-Zarzosa, A., Báez-Magaña, M., Guzmán-Rodríguez, J. J., Flores-Alvarez, J., Lara-Márquez, M., Zavala-Guerrero, B., Salgado-Garciglia, R., López-Gómez, R. & López-Meza, J. (2021). Bioactive molecules from native mexican avocado fruit (*Persea americana* var. *drymifolia*): A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*. 76(2); 133-142.
 48. OMS. (2022). Cáncer. *Organización Mundial de la Salud*. Recuperado 03 de junio de 2023 (<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>).
 49. Ospina. M., y Muñeton, C. (2011). Alteraciones del gen c-Myc en la oncogénesis. *Lateria*. 24(4); 389-401.
 50. Padilla-Arellanes, S., Salgado-Garciglia, R., Báez-Magaña, M., Ochoa-Zarzosa, A., y López-Meza, J. (2021). 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*. 26(14); 4178.
 51. Parra-Soto, S., Petermann-Rocha, F., Martínez-Sanguinetti, M., Leiva-Ordeñez, A., Troncoso-Pantoja, C., Ulloa, N., Díaz-Martínez, X., y Celis-Morales, C. (2020). Cancer in Chile and worldwide: an overview of the current and future epidemiological context. *Revista Médica de Chile*. 148(10); 1489-1495.
 52. Pazo, R., Álvarez, M., Cebollero, A., Agustín, M., Martínez, L., Anel, A., Pérez, J., y Antón, A. (2012). Apoptosis. Cáncer & Co. *Revista Internacional de Grupos de Investigación en Oncología*. 1(1); 23-26.
 53. Peña, A., y García, A., (2018). Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis. *The FEBS Journal*. 285(3); 416-431.
 54. Recillas (2022). Regulación epigenética: conceptos generales. *Revista de la Universidad de México*. 73(4); 8-13.
 55. Ríos Leal, J., Zavala, V., Garrido, F., Zolezzi, J., Barake, M. F., Labbé, T., Roje, D., & García-Bloj, B. (2021). Biological bases of cancer: a proposal of minimum

- contents for health schools. *International Journal of Medical and Surgical Sciences*. 8(3); 1-11.
56. Rodríguez-López, C., Hernández-Brenes, C., Treviño, V., y Díaz de la Garza, R. (2017). Avocado fruit maturation and ripening: Dynamics of aliphatic acetogenins and lipidomic profiles from mesocarp, idioblasts and seed. *BMC Plant Biology*. 17; 9-12.
 57. Rodríguez-Martínez, B., Ferreira-Santos, B., Gullón, J., Teixeira, C., Botelho, y Yáñez. R. (2021). Exploiting the potential of bioactive molecules extracted by ultrasounds from avocado peels-food and nutraceutical applications. *Antioxidants*. 10 (9); 1475.
 58. Rodríguez-Sánchez, D., Silva-Platas, C., Rojo, R., García, N., Cisneros-Zevallos, L., García-Rivas, G., y Hernández-Brenes, C. (2013). Activity-guided identification of acetogenins as novel lipophilic antioxidants present in avocado pulp (*Persea americana*). *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 942(943), 37–45.
 59. Roger, L., Tomas, F., y Gire, V. (2021). Mechanisms and regulation of cellular senescence. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(23); 1-42
 60. Rosenblat, G., Meretski, S., Segal, J., Tarshis, M., Schroeder, A., Zanin-Zhorov, A., Lion, G., Ingber, A., Hochberg, M., 2011. Polyhydroxylated fatty alcohols derived from avocado suppress inflammatory response and provide non-sunscreen protection against UV-induced damage in skin cells. *Archives of Dermatological Research*. 303; 239-246.
 61. Sánchez, N. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 24(4); 553-562.
 62. Schile-Guzmán, M., González-Esquinca, A., y Luna-Cazarez, L., (2009). Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 8(4); 246-257.
 63. Shoujun, Y., y Haoyu, C. (2019). Mathematical rules for synergistic, additive, and antagonistic effects of multi-drug combinations and their application in research and development of combinatorial drugs and special medical food combinations. *Food Science and Human Wellness*. 8(2).
 64. Solís-Avilés, D. (2021). Citotoxicidad de un extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) sobre la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Morelia.
 65. Tan, S., Hu, R., Tan, Y., Liu, J., y Liu, W. (2014). Promoter methylation-mediated downregulation of PRDM5 contributes to the development of lung squamous cell carcinoma. *Tumor Biology*. 35(5), 4509-16.
 66. Tcheng, M., Samudio, I., Lee, E., Minden, D., y Spagnuolo, P. (2017). The mitochondria target drug avocatin B synergizes with induction chemotherapeutics to induce leukemia cell death. *Leukemia & Lymphoma*. 58(4); 986-988.
 67. Tcheng, M., Minden, M., 2, y Spagnuolo, S., (2021). Avocado-derived avocadyne is a potent inhibitor of fatty acid oxidation. *Journal of Food Biochemistry*. 46(3); e13895.

68. Tentolouris, N., Arapostathi, D., Perrea, D., Kyriaki, C., Revenas, y Katsilambros, N. (2008). Differential effects of two isoenergetic meals rich in saturated or monounsaturated fat on endothelial function in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 31(12); 2276-2278.
69. Teodor, E., Moroeanu, V., y Radu, G. (2020). Lignans from medicinal plants and their anticancer effect. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 20; 1083-1090.
70. Villarreal-Lara, R., Rodríguez-Sánchez, D., Díaz De La Garza, R., García-Cruz, M., Castillo, A., Pacheco, A., y Hernández-Brenes C. (2019). Purified avocado seed acetogenins: Antimicrobial spectrum and complete inhibition of *Listeria monocytogenes* in a refrigerated food matrix. *Journal of Food*. 17(1); 228-239
71. Vivero S., Valenzuela B., Valenzuela B., y Morales, G. (2019). Palta: compuestos bioactivos y sus potenciales beneficios en salud. *Revista Chilena de Nutrición*. 46(4); 491-498.
72. Waldmann, T., y Schneider R. (2013) Targeting histone modifications epigenetics in cancer. *Current Opinion in Cell Biology*. 25(2); 184-189.
73. Wang, G., Yu, Y., Wang, Y., Wang, J., Guan, R., Sun, Y., Shi, F., Gao, J., y Fu, X. (2019). Role of SCFAs in gut microbiome and glycolysis for colorectal cancer therapy. *Journal of Cellular Physiology*. 234(10); 17023-17049.
74. Wang, L., Tao, L., Hao, T., Stanley, K., Huang, J., Lambert, Y., y Kris-Etherton, P. (2020). A moderate-fat diet with one avocado per day increases plasma antioxidants and decreases oxidation of small, dense LDL in adults with overweight and obesity: A randomized controlled trial. *The Journal of Nutrition*. 150(2); 276-84.
75. Wong, R. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 30(1); 1-14.
76. Yu, Y., Zhao, H., Wang, R., Chen, Y., Ouyang, X., Li, W., Sun, Y., y Peng, A. (2024). Cancer epigenetics: from laboratory studies and clinical trials to precision medicine. *Cell Death Discovery*. 10(24); 1-12.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



-+

A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas	
Título del trabajo	Identificación de moléculas citotóxicas del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo mexicano	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	María Guadalupe Pérez Esquivel	2330749b@umich.mx
Director	Joel Edmundo López Meza	elmeza@umich.mx
Codirector	Alejandra Ochoa Zarzosa	alejandra.ochoa@umich.mx
Coordinador del programa	Rodolfo López Gómez	rodolfo.lopez.gomez@umich.mx


Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	No	

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo




Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	No	
Traducción a otra lengua	No	
Revisión y corrección de estilo	No	
Análisis de datos	No	
Búsqueda y organización de información	No	
Formateo de las referencias bibliográficas	No	
Generación de contenido multimedia	No	
Otro	No	

Datos del solicitante	
Nombre y firma	María Guadalupe Pérez Esquivel 
Lugar y fecha	Morelia, Michoacán. 13 de mayo de 2025

María Guadalupe Pérez Esquivel

IDENTIFICACIÓN DE MOLÉCULAS CITOTÓXICAS DEL EXTRACTO LIPÍDICO DE LA SEMILLA DE AGUACATE NATIVO ...

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:460680193

Fecha de entrega

19 may 2025, 3:41 p.m. GMT-6

Fecha de descarga

19 may 2025, 3:48 p.m. GMT-6

Nombre de archivo

IDENTIFICACIÓN DE MOLÉCULAS CITOTÓXICAS DEL EXTRACTO LIPÍDICO DE LA SEMILLA DE AGUA....pdf

Tamaño de archivo

3.5 MB

79 Páginas




19.062 Palabras

102.661 Caracteres

34% Overall Similarity

The combined total of all matches, including overlapping sources, for each database.

Top Sources

- 34%  Internet sources
- 13%  Publications
- 0%  Submitted works (Student Papers)

Integrity Flags

0 Integrity Flags for Review

No suspicious text manipulations found.

Our system's algorithms look deeply at a document for any inconsistencies that would set it apart from a normal submission. If we notice something strange, we flag it for you to review.

A Flag is not necessarily an indicator of a problem. However, we'd recommend you focus your attention there for further review.