



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas
Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología**

TESIS

**MECANISMOS DE CITOTOXICIDAD INDUCIDOS POR MOLÉCULAS
LIPÍDICAS DE CADENA LARGA DE LA SEMILLA DE AGUACATE NATIVO
MEXICANO (*Persea americana* var. *drymifolia*) EN CÉLULAS DE CÁNCER
DE COLON**

Que presenta:

Biol. Mónica Lara Márquez

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Área temática: Biotecnología Pecuaria

ASESOR:

Dr. Joel Edmundo López Meza

COASESORA:

Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa



**FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

Morelia, Michoacán, Marzo de 2018.

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 asesoría del Dr. Joel Edmundo López Meza y la co-asesoría 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 14.5) y del CONACyT (proyecto CB-2013-221363 y beca 598445).

La educación científica de los jóvenes es al menos tan importante, quizá incluso más, que la propia investigación”.

-Glenn Theodore Seaborg

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mi asesor el Dr. Joel Edmundo López Meza, por la paciencia, motivación y el apoyo incondicional. Usted supo cuando presionarme para que lograra más de lo que yo creía que podía, guiarme y estar ahí cuando lo necesitaba pero también dándome la libertad y confianza para dejarme volar sola cuando sabía que lo podía hacer.

A la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa, por siempre estar disponible para sus estudiantes a pesar de estar ocupada. Gracias por abrirme las puertas del laboratorio y permitirme ser parte de su grupo de trabajo. Le agradezco su confianza y todo el apoyo que me ha brindado en estos años.

A los miembros de mi comité evaluador, la Dra. Rocío Montoya, el Dr. Rafael Salgado y el Dr. Carlos Cortés. Sin su apoyo y observaciones este trabajo no hubiera evolucionado como lo hizo. Gracias por el tiempo y la disponibilidad que siempre me brindaron.

Gracias al Dr. Paul Spagnuolo, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme tener una de las experiencias más importantes en mi vida académica y personal. También me gustaría agradecer a todos los miembros del laboratorio Spagnuolo, su tiempo, calidez y amistad quedarán siempre en mí.

Especialmente a todos mis compañeros de laboratorio, me enorgullece formar parte de este grupo de trabajo. Gracias por siempre enseñarme cosas y trabajar en equipo.

Gracias a las personas especiales que han estado en mi vida y que valoro tanto. Especialmente a mi Kenia, que aunque no siempre estás de acuerdo con mis decisiones, siempre estás ahí para apoyarme y divertirnos como sólo nosotras sabemos. Adrián, gracias por recordarme que la única persona que me limita soy yo, hemos aprendido a motivarnos mutuamente y a emocionarnos por la vida.

DEDICATORIA

A mi familia

En esta tesis se refleja el apoyo y el amor que mi familia siempre me ha dado. Esta tesis es nuestra. A mis padres Alicia y Francisco, ustedes son mi ejemplo a seguir. Gracias por confiar en mí y darme las herramientas para lograr todo lo que me he propuesto. Me han mostrado lo valioso e importante que es la educación.

A mis hermanas, Alicia y Elizabeth. Siempre me han ayudado a ver únicamente lo importante y a dejar de lado lo negativo. Gracias por siempre estar ahí para mí y por entenderme cuando más lo necesito, por reírse conmigo y por todo lo que nos hace hermanas.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1. GENERALIDADES DEL CÁNCER	5
2.1.1. <i>Estrategias de la célula cancerosa</i>	7
2.1.1.1. Proliferación celular	7
2.1.1.2. Evasión de la muerte celular	9
2.1.1.3. Alteraciones metabólicas en células cancerosas	13
2.1.1.4. Inflamación promotora de tumores	15
2.1.2. <i>Cáncer de colon</i>	19
2.1.2.1. Carcinogénesis colorrectal	20
2.2. LAS PLANTAS COMO FUENTE DE COMPONENTES ANTICANCEROSOS	22
2.2.1. <i>Ácidos grasos y derivados de ácidos grasos</i>	24
2.2.2. <i>Propiedades del aguacate</i>	25
2.2.3. <i>Componentes bioactivos de la semilla de aguacate</i>	28
2.2.3.1. Moléculas lipídicas de la semilla de aguacate	30
2.2.3.2. Efectos citotóxicos de los lípidos de cadena larga de aguacate.....	31
2.2.3.3. Efectos antiinflamatorios de los lípidos de cadena larga de aguacate.....	32
2.3. ANTECEDENTES DIRECTOS	34
3. JUSTIFICACIÓN	35
4. HIPÓTESIS	36
5. OBJETIVO GENERAL	36
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	37
7. RESULTADOS	38
7.1. CHAPTER I. AVOCADO SEED LONG-CHAIN LIPIDS INDUCES APOPTOSIS AND MODULATE THE INFLAMMATORY RESPONSE IN HUMAN COLON CANCER CELLS CACO-2	39
7.2. CAPÍTULO II. CITOTOXICIDAD DE ÁCIDOS GRASOS Y DERIVADOS DE ÁCIDOS GRASOS DE LA SEMILLA DE AGUACATE NATIVO MEXICANO (<i>PERSEA AMERICANA</i> VAR. <i>DRYMIFOLIA</i>) SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON HCT 116	76
8. DISCUSIÓN GENERAL	87

9. CONCLUSIÓN GENERAL	90
10. REFERENCIAS COMPLEMENTARIAS	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figuras de los antecedentes

Figura 1. Estimación de la incidencia de cáncer en México para el año 2020.....	5
Figura 2. Esquema general de las vías extrínseca e intrínseca de apoptosis	12
Figura 3. Modelo de carcinogénesis colorrectal secuencia adenoma-carcinoma.	21
Figura 4. Estrategia experimental.....	37

Figuras del capítulo I

Figure 1. Cytotoxic effect of long-chain lipids (LCL) from Mexican native avocado seed on Caco-2 cells.....	67
Figure 2. The effect of long-chain lipids (LCL) from Mexican native avocado seed on Caco-2 cell viability.....	68
Figure 3. Apoptotic effect of long-chain lipids (LCL) from Mexican native avocado seed on Caco-2 cells.....	69
Figure 4. Long-chain lipids (LCL) from Mexican native avocado seed induce caspase activation in Caco-2 cells.. ..	70
Figure 5. Mexican native avocado seed long-chain lipids (LCL) generates the loss of mitochondrial membrane potential in Caco-2 cells.	71
Figure 6. Mexican native avocado seed long-chain lipids (LCL) do not change the intracellular calcium level in Caco-2 cells.	72
Figure 7. ROS production in Caco-2 cells is induced by Mexican native avocado seed long-chain lipids (LCL).....	72
Figure 8. Mexican native avocado seed long-chain lipids (LCL) induce cell cycle arrest in Caco-2 cells.....	73
Figure 9. Mexican avocado seed long-chain lipids (LCL) regulate the expression of genes related to the cell cycle.. ..	74
Figure 10. Mexican native avocado seed long-chain lipids (LCL) inhibit fatty acid oxidation.	74
Figure 11. Proposed model of the cytotoxic mechanism of the lipid molecules of the Mexican native avocado seed on Caco-2 cells.....	75

Figuras del capítulo II

Figura 1. Efecto citotóxico de las moléculas lipídicas de semilla de aguacate nativo mexicano sobre células HCT 116.. ..	85
Figura 2. Las moléculas lipídicas de la semilla de aguacate nativo mexicano inhiben la viabilidad de las células HCT 116.	86

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadros de los antecedentes	
Cuadro 1. Diferencias morfológicas principales entre el proceso de apoptosis y necrosis.....	9
Cuadro 2. Composición de la pulpa de aguacate.....	26
Cuadro 3. Efectos de compuestos bioactivos de la semilla de aguacate en diferentes modelos de estudio.....	28
Cuadro 4. Composición de moléculas lipídicas de cadena larga de la semilla de aguacate nativo mexicano.....	30
Cuadros del capítulo I	
Table 1. Sequences of primers used in this study.....	65
Table 2. Long chain lipids content of Mexican native avocado seed.....	65
Table 3. Interleukins secreted by Caco-2 cells treated with the Mexican native avocado seed long-chain lipids.	66

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CRC) es el tercer tipo de cáncer con mayor incidencia y la cuarta causa de muerte en el mundo, siendo responsable de cerca de 700,000 muertes al año. La quimioterapia utilizada actualmente en pacientes con CRC se asocia con efectos secundarios severos y un bajo índice terapéutico. En la búsqueda de alternativas, el uso de combinaciones de compuestos naturales favorece las posibilidades de encontrar blancos terapéuticos. En este sentido, el aguacate es una fuente importante de metabolitos secundarios con potencial anticanceroso, de manera especial, el aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) es un fruto rico en lípidos, las cuales son biomoléculas con citotoxicidad hacia las células cancerosas ya que afectan la viabilidad celular. Interesantemente la semilla de aguacate ha cobrado atención debido a que posee una mayor cantidad de compuestos lipídicos selectivos hacia las células cancerosas. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto citotóxico de las moléculas lipídicas de cadena larga de la semilla de aguacate nativo mexicano sobre células de cáncer de colon Caco-2 y HCT 116. Además, en las células Caco-2 se determinó el efecto sobre el ciclo celular y la inducción de apoptosis, así como en la regulación de la respuesta inflamatoria y en el metabolismo de ácidos grasos (AG). El extracto lipídico fue citotóxico para las células Caco-2 y HCT 116 con una IC₅₀ de 28 µg/mL y 8 µg/mL, respectivamente. En las células Caco-2 se observó la activación simultánea de las caspasas 8 y 9, una pérdida de potencial mitocondrial (68%), así como la inhibición de la oxidación de ácidos AG (45%) y un aumento en la producción de O₂⁻ (30%) y especies reactivas de oxígeno (ERO) mitocondrial (52%). Adicionalmente, se detectó detención en la fase G0/G1 del ciclo celular y una modulación en la expresión de las citocinas IL-6, IL-8 IL-10 e IL-1β. En conclusión, las moléculas lipídicas de cadena larga de la semilla de aguacate nativo mexicano son citotóxicos en células de cáncer de colon, en el caso particular de las células Caco-2 inhibieron la oxidación de AG favoreciendo la producción de ERO y la pérdida de potencial mitocondrial, lo que permite la inducción de apoptosis dependiente de caspasas. Además estas moléculas inducen la detención del ciclo celular y la modulación de la expresión de moléculas relacionadas con la respuesta inflamatoria.

Palabras clave: moléculas lipídicas, cáncer de colon, aguacate nativo mexicano, ácidos grasos, derivados de ácidos grasos

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the third type of cancer with the highest incidence and the fourth cause of death in the world, responsible for nearly 700,000 deaths per year. The chemotherapy currently used in patients with CRC is associated with severe side effects and a low therapeutic index. In the search for alternatives, the use of combinations of natural compounds increases the chances of finding therapeutic targets. In this sense, avocado is an important source of secondary metabolites with anticarcinogenic potential, especially the Mexican native avocado (*P. americana* var. *drymifolia*) is a fruit rich in lipids, biomolecules with cytotoxicity towards cancer cells that affect the proliferation and cell viability. Interestingly, the avocado seed has received attention because it has a greater amount of selective lipid compounds towards cancer cells. The objective of this study was to determine the cytotoxic effect of the long-chain lipids of the Mexican native avocado seed on Caco-2 and HCT 116 colon cancer cells. In addition, in the Caco-2 cells the effect on the cell cycle and the induction of apoptosis, as well as the regulation of the inflammatory response and the metabolism of fatty acids was evaluated. The lipid extract was cytotoxic for Caco-2 and HCT 116 cells with an IC₅₀ of 28 and 8 µg/mL, respectively. In the Caco-2 cells, it was detected the simultaneous activation of caspases 8 and 9, loss of mitochondrial potential (68%), inhibition of fatty acid oxidation (45%) and an increase in the O₂⁻ production (30%) and mitochondrial ROS (52%). Additionally, arrest was detected in the G₀/G₁ phase of the cell cycle and a modulation in the expression of the cytokines IL-6, IL-8 IL-10 and IL-1β. In conclusion, the long-chain lipid molecules from Mexican native avocado seed are cytotoxic towards colon cancer cells, in the particular case of the Caco-2 cells it inhibits the oxidation of fatty acids that favors the production of ROS and the loss of mitochondrial potential, which allows the induction of caspase-dependent apoptosis. In addition, these molecules induce the arrest of the cell cycle and the modulation of the expression of molecules related to the inflammatory response.

Key words: long-chain lipids, colorectal cancer, Mexican native avocado, fatty acids, fatty acid derivatives

1. INTRODUCCIÓN

En México, el aguacate (*Persea americana* Mill.) tiene gran importancia ya que es un alimento con alto valor nutritivo que es producido y exportado alrededor del mundo para su consumo, generando importantes ganancias económicas para el país. Además de poseer una gran variedad de minerales, vitaminas, ácidos grasos (AG) y proteínas que le dan su valor nutritivo, en el aguacate se han estudiado diversas propiedades entre las que destacan las antiinflamatorias, antidiabéticas, antihipertensivas, antimicrobianas, insecticidas y anticancerosas (Dabas *et al.*, 2013). La propiedad anticancerosa está dada por más de 20 grupos de fitoquímicos, entre ellos se encuentran los flavonoides, las cumarinas, los terpenoides glucósidos, AG y derivados de ácidos grasos (DAG) (Ding *et al.*, 2007).

El fruto de aguacate es particularmente rico en moléculas de naturaleza lipídica, ya que posee un alto contenido y variedad de AG y DAG como las acetogeninas alifáticas (Bora *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2007). Entre las variedades y cultivares de aguacate, destaca especialmente la variedad nativa mexicana (*P. americana* var. *drmyifolia*) debido a que posee un porcentaje mayor de aceites (20-30%) en comparación con la variedad americana (*P. americana* var. *americana*) (5-15%) y la variedad guatemalteca (*P. americana* var. *guatemaltensis*) (15-20%) (Baraona & Sancho, 2000). Estas moléculas lipídicas tienen efectos citotóxicos contra células cancerosas conduciendo a las células a una muerte celular programada (proceso conocido como apoptosis) e incluso a la detención del ciclo celular (Oberlies *et al.*, 1998; Llor *et al.*, 2003). Cabe enfatizar que las acetogeninas alifáticas además de ser citotóxicas, han demostrado poseer efectos antiinflamatorios, inmunomoduladores y modifican la tasa metabólica (Rosenblat *et al.*, 2011; Báez-Magaña, 2014; Lee *et al.*, 2015).

Los efectos citotóxicos asociados a las moléculas lipídicas de la semilla del aguacate nativo mexicano cobran relevancia en la búsqueda de alternativas para el control del cáncer, debido a que afectan algunas de las características de las células cancerosas que les permiten sobrevivir y diseminarse, y hacia las cuales se ha dirigido la evaluación de nuevas terapias. Entre estas características se encuentran la señalización sostenida de la proliferación y por lo tanto la evasión del control de

la proliferación celular, su capacidad ilimitada de división, la inducción de angiogénesis, la capacidad de metástasis, la resistencia a la apoptosis y la obtención más eficaz de energía a través de modificaciones en el metabolismo. Adicionalmente, la inflamación juega un papel importante en el desarrollo del cáncer, favoreciendo la presencia de factores de crecimiento y de moléculas que aceleran el proceso mutagénico (Hanahan & Weinberg, 2011).

En la terapia actual, las células cancerosas pueden ser eliminadas por los métodos convencionales (cirugía, radioterapia y quimioterapia), pero también es común que algunas células malignas que persistieron después del tratamiento vuelvan a proliferar y con ello se presente el resurgimiento de la enfermedad. Esto debido a que es poco probable deshacerse de todas las células cancerosas, dada la poca especificidad de los tratamientos, o incluso a que algunas células pueden ser resistentes; por lo tanto, existe la necesidad de búsqueda de moléculas que sean más efectivas y con mayor especificidad contra células cancerosas (Alberts *et al.*, 2002).

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto citotóxico de las moléculas lipídicas de cadena larga de la semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) sobre dos líneas celulares de cáncer de colon (Caco-2 y HCT 116). En el caso de las células Caco-2 se determinó la inducción de apoptosis y la afectación del ciclo celular, además se evaluó el efecto de estas moléculas lipídicas sobre la expresión de moléculas anti- y pro-inflamatorias y en la oxidación de AG.

2. ANTECEDENTES

2.1. GENERALIDADES DEL CÁNCER

La Organización Mundial de la Salud define la palabra cáncer como el conjunto de enfermedades caracterizadas por la actuación de células malignas que pierden el control normal sobre la proliferación celular y que son capaces de propagarse más allá de sus límites logrando llegar a otros tejidos, esto último es conocido como metástasis (WHO, 2015). Estas enfermedades representan un problema a nivel mundial, ya que en el 2012 vivían cerca de 32 millones de personas con cáncer, con un incremento de 14.1 millones de casos nuevos y la defunción de 8.2 millones de personas. En México, en el mismo año la incidencia fue de 147,985 casos, siendo los de mayor impacto el cáncer de mama, próstata, cérvico-uterino, colorrectal, pulmón y estómago. Se prevé que para el 2020 este número ascenderá a 192,011 casos (Fig. 1) (GLOBOCAN, 2012).

Una parte importante en el estudio del cáncer es conocer las causas que lo favorecen u ocasionan, donde las condiciones ambientales, el estilo de vida y los factores genéticos heredados tienen gran relevancia (Ruddon, 2007). Se ha estimado que cerca del 85-90% de los casos de cáncer están influenciados por las condiciones bajo las que se encuentra el individuo, mientras que en el 5-10% de los casos los factores genéticos tienen un papel importante (Anand *et al.*, 2008).

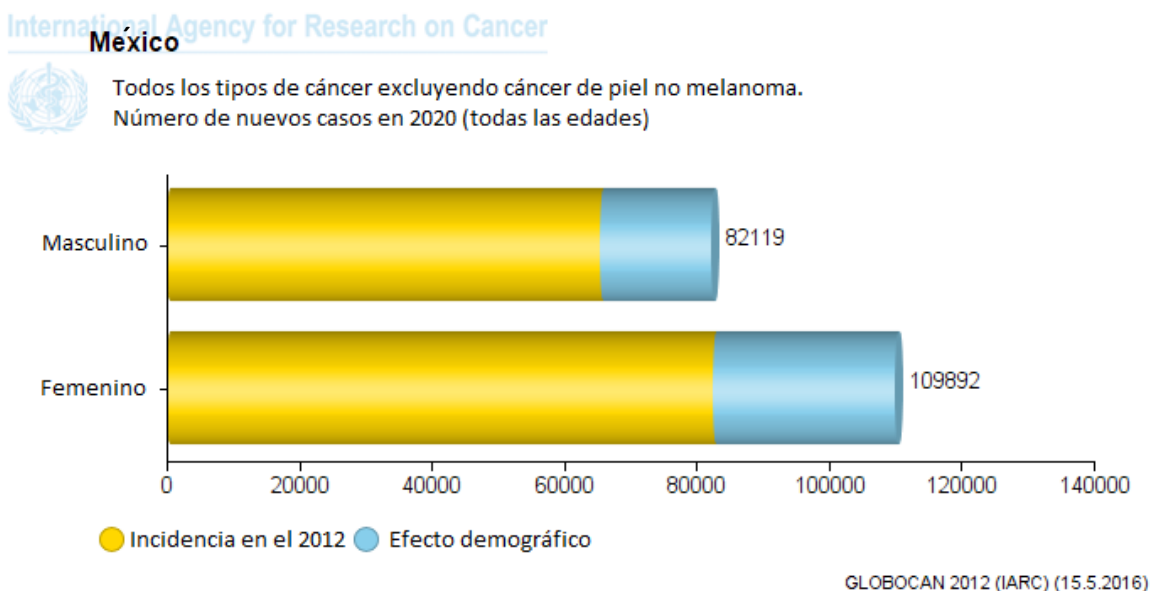


Figura 1. Estimación de la incidencia de cáncer en México para el año 2020. (GLOBOCAN, 2012).

En el humano, el estilo de vida ha favorecido en gran medida el desarrollo de estas enfermedades. Por ejemplo, el tabaco contiene una gran cantidad de carcinógenos que aumentan el riesgo de desarrollar más de 10 tipos de cáncer diferentes (Hecht, 1999; Anand *et al.*, 2008). Además, la producción de radicales libres como consecuencia del consumo excesivo de alcohol se ha relacionado con el cáncer de hígado, esófago, laringe y orofaringe (Anand *et al.*, 2008; Khambete & Kumar, 2014); así como algunas sustancias mutagénicas presentes en alimentos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos en productos ahumados, aflatoxinas (generadas por *Aspergillus flavus* encontradas en legumbres, arroz, leche, etc.), fumonisinas (toxina producida por *Fusarium verticillioides* que contamina al maíz), entre otros (Khambete & Kumar, 2014). Existe también una relación estrecha entre la obesidad y el desarrollo de cáncer (se calcula que es la responsable del 20% de los casos reportados), esta correlación está dada por una mala regulación hormonal (ej. insulina), un ambiente inflamatorio constante y el aumento en la producción de lípidos para la síntesis de las membranas citoplasmáticas y para señalización, lo que favorece el desarrollo del tumor (Hecht, 1999; Louie *et al.*, 2013).

Existen también algunos agentes infecciosos que están asociados a tumores malignos, entre ellos: bacterias, protozoos, algunos helmintos, hongos y virus. Estos agentes pueden afectar la expresión y la actividad de enzimas que pueden favorecer la activación de carcinógenos u ocasionando inflamación y la generación de radicales libres provocando un daño al ADN (Anand *et al.*, 2008; Kutikhin *et al.*, 2013). Asimismo, se han identificado también otros agentes mutagénicos, que además son contaminantes físicos y químicos, producto de los gases que emiten los autos y la quema de basura, como los ya señalados hidrocarburos policíclicos aromáticos, el dióxido de carbono, el dióxido de nitrógeno o también plaguicidas como el DDT, compuestos organoclorados como las dioxinas, metales pesados, entre otros (Belpomme *et al.*, 2007; Irigaray *et al.*, 2007).

Por último, la radiación también puede inducir cáncer, ya sea por exposición a sustancias radioactivas o con luz ultravioleta. Se sabe que elementos como el radio y uranio aumentan el riesgo de generar cáncer gástrico. En el caso del cáncer de mama, los rayos-X incrementan el riesgo de desarrollar esta enfermedad. Por

otro lado, la exposición a los rayos ultravioleta es un riesgo para desarrollar cáncer de piel. Todos estos factores representan un peligro para la salud debido al daño que pueden ocasionar en el ADN (Anand *et al.*, 2008).

2.1.1. Estrategias de la célula cancerosa

Debido al proceso de carcinogénesis las células cancerosas presentan características únicas que favorecen su propagación y el desarrollo del cáncer (Muñoz, 1997). Entre éstas se encuentran la señalización sostenida de la proliferación, la evasión de la estimulación negativa de la proliferación celular, su capacidad ilimitada de división, la inducción de angiogénesis, la capacidad de metástasis, la resistencia a la apoptosis y el sobrevivir en un ambiente inflamatorio crónico (Hanahan & Weinberg, 2011). A continuación, se describen algunas de estas características que son de gran relevancia para el desarrollo de la enfermedad.

2.1.1.1. Proliferación celular

La característica más notable de la célula cancerosa es la capacidad de dividirse de forma aparentemente descontrolada y rápida (Hanahan & Weinberg, 2011). En un tejido normal, los factores de crecimiento (FC), que son moléculas de naturaleza peptídica, actúan como señales que interactúan con los receptores de membrana de células blanco para así funcionar como reguladores del ciclo celular, manteniendo un número basal de células que permite el correcto funcionamiento del tejido (Campbell & Reece, 2007). Esta es una interacción de tipo paracrina que sucede de forma regulada en tiempo y espacio. Sin embargo, se ha observado que una vez que una célula normal es transformada, es esencial la presencia de los FC para su expansión, esta necesidad conduce a la célula a adquirir la capacidad de producir sus propios FC, teniendo como consecuencia una estimulación autocrina y por lo tanto un crecimiento descontrolado del tejido (Ruddon, 2007; Hanahan & Weinberg, 2011; Witsch *et al.*, 2011).

Dentro de la gran variedad de FC que existe, algunos están implicados en la contribución de la proliferación de células malignas; como la familia de los TGF- β (factor de crecimiento transformante β), cuyos integrantes poseen un papel dual, ya

que participan principalmente como supresores de tumores, ya que están implicados en procesos de control de la división, diferenciación y muerte celular. Por otro lado, cuando se encuentran en cantidades excesivas en el tejido provocan una disminución en la capacidad de adhesión y promueven la angiogénesis (Witsch *et al.*, 2011; Lebrun, 2012) . Adicionalmente, las proteínas IGF (factor de crecimiento insulínico tipo 1) se expresan en la mayoría de los tumores estimulando a receptores cinasas de tirosinas, iniciando cascadas de fosforilación que finalmente resultan en la proliferación celular (Samani *et al.*, 2007), similar a lo observado para los factores de crecimiento epitelial (EGF) (Witsch *et al.*, 2011).

Además de la producción excesiva de los FC existe otra estrategia presente en las células malignas, que involucra en una mayor expresión y cantidad de los receptores de membrana. Además, mutaciones en genes que codifican para los receptores de actividad intrínseca cinasas de tirosinas relacionados con la proliferación celular pueden provocar que estos se mantengan activos de manera constitutiva (Hanahan & Weinberg, 2011; Lodish *et al.*, 2013). Por ejemplo, el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), es un receptor cinasa de tirosinas que una vez estimulado por su ligando inicia una cascada de señalización que resulta en la proliferación celular; sin embargo, en diferentes tipos de cáncer (principalmente cáncer colorrectal) este receptor suele sobre expresarse hasta cinco veces más que en células normales, además de que algunas mutaciones permiten que se mantenga activo constitutivamente (Saasaki *et al.*, 2013).

Las células cancerosas también pueden evadir la estimulación negativa de la proliferación celular mediante la inactivación de los genes supresores de tumores (Hanahan *et al.*, 2011), dentro de los cuales destacan la pérdida de función de genes que regulan el ciclo celular, que inducen la muerte celular y reparan el ADN, como el gen *Rb* para el retinoblastoma, el gen *APC* y *p53* en el cáncer colorrectal, o *BRCA1* para cáncer de mama (Lodish *et al.*, 2013). Debido a lo anterior, la célula pierde la capacidad de evitar la acumulación de nuevas mutaciones (Sherr, 2004).

2.1.1.2. Evasión de la muerte celular

El proceso de muerte celular programada, denominado apoptosis, está dirigido por fenómenos moleculares que ocurren de forma ordenada y controlada, los cuales van a generar cambios morfológicos y bioquímicos específicos que como resultado final conducen a la degradación de sus componentes y por lo tanto la muerte celular. Este tipo de muerte, sucede de manera normal bajo ciertas condiciones y estímulos; por ejemplo, durante el desarrollo de los organismos, para mantener un determinado número de células en los tejidos, como mecanismo de defensa bajo condiciones extremas de estrés y cuando se ve comprometida la integridad del ADN (Elmore, 2007; Lodish *et al.*, 2013). Se puede diferenciar este tipo de muerte celular de otros como la necrosis y es posible identificarlos rápidamente por sus características morfológicas (cuadro 1).

Cuadro 1. Diferencias morfológicas principales entre el proceso de apoptosis y necrosis.

Apoptosis	Necrosis
Afecta a células individuales o pequeños grupos	Afecta a grandes cantidades de células contiguas
Encogimiento de las células	Aumento del volumen celular
Picnosis y cariorrhexis	Cariolisis, picnosis y cariorrhexis
Membrana celular intacta	Pérdida de integridad de la membrana celular
Citoplasma aislado en cuerpos apoptóticos	Liberación del citoplasma
No hay respuesta inflamatoria	Respuesta inflamatoria

Modificado de Elmore, 2007

La apoptosis es un proceso evolutivamente conservado que involucra proteínas igualmente conservadas. De manera general, en mamíferos se ha observado la participación primordial de proteínas denominadas caspasas y otras pertenecientes a la familia Bcl-2. Dentro del grupo de las caspasas se identifican principalmente los grupos de las iniciadoras (caspasa 2, 8, 9, 10), las efectoras

(caspasa 3, 6 y 7) y las inflamatorias (caspasa 1, 4 y 5) (McIlwain *et al.*, 2015). Dentro de las Bcl-2, se encuentran proteínas con efectos pro-apoptóticos como Bak, Bax, Bad, Bcl-XS, Bid, Bik, Bim y Hrk, y anti-apoptóticos como Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1 (Harada & Grant, 2003; Ouyang *et al.*, 2012). Existen dos alternativas o vías principales que pueden llevar a una célula al proceso de apoptosis, la vía intrínseca y la extrínseca (Fig. 2).

Vía extrínseca. Para que se pueda desencadenar esta vía es necesaria la presencia de receptores de membrana que sean capaces de recibir estímulos externos y así amplificarlos hacia el interior de la célula (Ouyang *et al.*, 2012). Existen seis receptores de la familia TNF (factor de necrosis tumoral) denominados receptores de muerte que poseen un dominio de muerte citosólico importante en el inicio de la apoptosis: Fas, DR2, DR3, DR4, DR5 y DR6 (Gaur & Aggarwal, 2003). Todo inicia cuando algún ligando como TNF- α , el ligando de Fas (FasL) o el ligando inductor de apoptosis relacionado a factores (TRAIL), establece interacción con su receptor específico que tiene como consecuencia la oligomerización de tres moléculas receptoras, que permite la unión de alguna proteína como FADD o TRADD en el dominio de muerte, estos adaptadores permiten el reclutamiento de dos pro-caspasas 8 (Lee *et al.*, 2012). Este complejo proteico de señalización de muerte celular (DISC) propicia la activación auto-catalítica de la caspasa 8 (proteína característica de esta vía). Este punto marca el fin de la fase de inicio de la apoptosis y comienzan a actuar las caspasas ejecutoras que concluirán la muerte celular (Elmore, 2007; Lodish *et al.*, 2013).

Vía intrínseca. La mitocondria tiene uno de los papeles principales en la vía intrínseca de la apoptosis y actúa de acuerdo a señales originadas dentro de la célula (Wang & Youle, 2009) . Esta vía puede activarse por diferentes estímulos, como cuando el ADN se daña seriamente y no es posible repararlo, proteínas sensoras como PUMA (moduladora de apoptosis regulada por p53) mandan señales a la mitocondria para que se inicie el proceso, también un daño en el citoesqueleto de la célula puede activar esta ruta, donde la proteína Bim es el mensajero (Lodish *et al.*, 2013). Finalmente, la radiación, toxinas, hipoxia,

hipertermia, infecciones virales y la presencia de radicales libres son otros factores que pueden estimular a la mitocondria, favoreciendo así la liberación de factores pro-apoptóticos como el factor inductor de apoptosis (IAF) o el citocromo c (Cit c) (Elmore, 2007; Ouyang *et al.*, 2012).

En la membrana exterior de la mitocondria se encuentran proteínas intramembranales pertenecientes a la familia de las Bcl-2 pro-apoptóticas; Bax y Bak, que estimuladas por los casos mencionados anteriormente se homo-oligomerizan formando poros permitiendo la liberación del Cit c (Harada & Grant, 2003). Es en este paso donde la asociación de la procaspasa 9, de la proteína Apaf-1 y del Cit c, se forma un complejo proteico denominado apoptosoma, que permite la activación de la caspasa 9 (proteína característica de esta vía) y por lo tanto propicia la activación de las caspasas ejecutoras (Cain *et al.*, 2002). En contraste, las proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-xL) evitan la formación del poro en la membrana externa de la mitocondria (Harada & Grant, 2003).

En las células cancerosas, este proceso de muerte puede alterarse en algún punto de la vía de señalización, obteniendo la capacidad de evitar la muerte celular y lograr así su objetivo de proliferar de manera anormal. Lo anterior se logra por la pérdida de la regulación y el equilibrio entre las moléculas pro- y anti-apoptóticas, disminuyendo y aumentando su expresión y/o activación, respectivamente (Elmore, 2007; Hanahan & Weinberg, 2011). En este sentido, uno de los elementos más estudiados es el proto-oncogen p53 que está asociado con el control sobre el daño al ADN y de reacción frente a ambientes de estrés. Se sabe que una mala regulación del mismo resulta en alteraciones con consecuencias graves en el control de apoptosis en células cancerosas, además de que suele verse alterado en la mayoría de los tipos de cáncer (Freed-Pastor & Prives, 2012).

Una característica importante de la célula cancerosa es que acumula un mayor número de mutaciones debido a que no muere a pesar de poseer daño en el ADN, teniendo como consecuencia anormalidades cromosomales e inestabilidad genética (Hanahan & Weinberg, 2011).

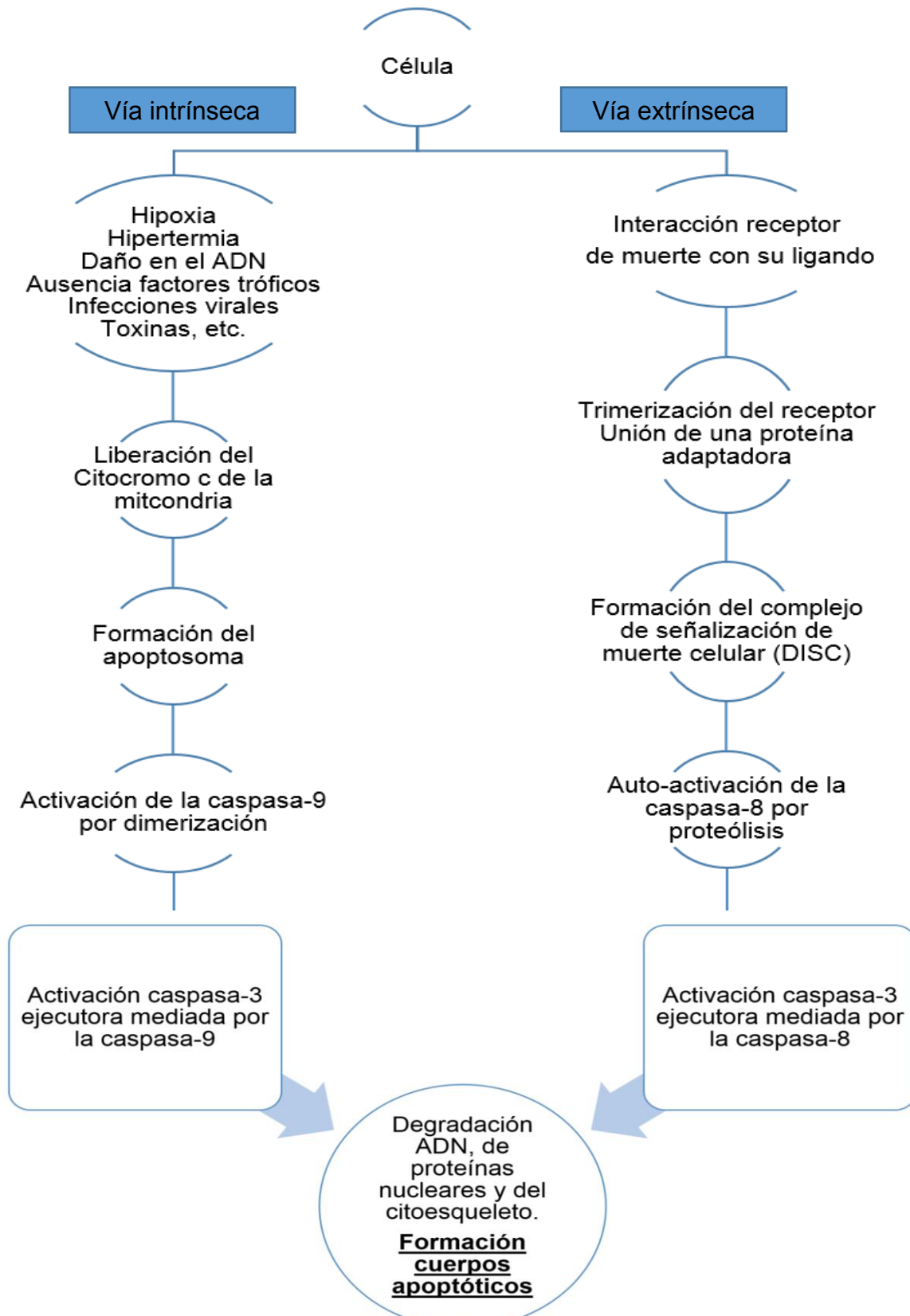


Figura 2. Esquema general de las vías extrínseca e intrínseca de apoptosis (Elmore, 2007).

2.1.1.3. Alteraciones metabólicas en células cancerosas

La reprogramación metabólica es un proceso que no sólo colabora con la proliferación y la supervivencia de células cancerosas, sino que también participa en procesos relacionados con metástasis e invasión. En general, existen 3 vías metabólicas principales que pueden verse alteradas en células cancerosas:

Glucólisis. En 1920, Otto Warburg describió el efecto de Warburg, que menciona que aunque la mitocondria de las células cancerosas permanece funcional y haya concentraciones normales de oxígeno, la tasa glucolítica se eleva preferencialmente para satisfacer las necesidades energéticas y disminuye considerablemente la fosforilación oxidativa (proceso denominado glucólisis aerobia) (Dakubo, 2010). Mientras que las células normales utilizan hasta un 18% de la glucosa disponible, las células cancerosas consumen cerca del 70% de lo cual más del 60% es transformado a lactato por fermentación láctica, esto por el un aumento en el ingreso de glucosa a la célula cancerosa. Aunque la glucólisis (2 ATP/glucosa) es un proceso más ineficiente para la obtención de energía en comparación con la respiración aeróbica (36 ATP/glucosa), es más rápido y responde de una forma mejor a demandas urgentes de energía a diferencia de la fosforilación oxidativa (Hirschey *et al.*, 2015). Adicionalmente, el incremento de fuente de carbono en la célula provee de intermediarios para la biosíntesis de proteínas, lípidos y nucleótidos demandados para el crecimiento y la división celular, logrado a través de la interacción con otras vías metabólicas. Cabe mencionar, que la acidificación del ambiente tumoral generado por la liberación de lactato, favorece el potencial metastásico, altera la producción de ERO y modifica la compactación de la cromatina (Liberti & Locasale, 2016).

Metabolismo de lípidos. Se han descrito alteraciones en el metabolismo de lípidos de células cancerosas en diferentes niveles (síntesis, almacenamiento o degradación), lo cual contribuye a la obtención de altas cantidades de energía en condiciones de estrés (Luo *et al.*, 2017). La síntesis de AG suele verse alterada por la participación de la sintasa de ácidos grasos (FASN) y por la regulación transcripcional en la cual participan las proteínas de unión a los elementos

reguladores del esteroles (SREBP), independientemente de la disponibilidad de AG exógenos. Los AG sintetizados contribuyen a la división celular, siendo los componentes primordiales de las membranas y de orgánulos, proveyendo sustratos para la obtención de energía y participando en la transducción de señales como moléculas de señalización o siendo claves en la activación de otras moléculas a través de la acilación de proteínas. Asimismo, favorecen la modificación celular y la migración a otros tejidos, la angiogénesis y el escape de la inmunovigilancia (Röhrig & Schulze, 2016).

Los AG que se producen en exceso en la célula cancerosa son almacenados en “droplets” o “gotitas” de lípidos, y se ha observado un contenido alto en células cancerosas a diferencia de células normales, lo cual es un marcador de un tumor agresivo y de respuesta baja a los quimioterapéuticos. Adicionalmente, estas gotas de lípidos evitan que la célula sufra lipotoxicidad (Beloribi-Djefaflija *et al.*, 2016; Tirinato *et al.*, 2017).

Por otro lado, se ha observado que la oxidación de AG exógenos produce la reprogramación en las células cancerosas sometidas a condiciones de estrés, presentando tasas altas de oxidación en células cancerosas no glucolíticas debido a que se pueden obtener altas cantidades de energía (130 moléculas de ATP/palmitato), NADH, FADH y NADPH (Qu *et al.*, 2016). La oxidación de lípidos también participa en la promoción de la supervivencia celular ya que inhibe la formación de poros mitocondriales dependiente de Bax y Bak, evitando la lipotoxicidad y elevando la producción de NADPH, lo cual inhibe el estrés oxidativo y favorece la división celular (Carracedo *et al.*, 2013). El gen de la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT I) ha sido identificado como un proto-oncogen que limita la velocidad de ingreso de los AG del citoplasma a la mitocondria, y en células cancerosas es sobre expresado, que se relaciona con la supervivencia bajo condiciones hipóxicas y con la quimiorresistencia, por lo que se ha propuesto la inhibición de AG como estrategia para sensibilizar a las células a las terapias (Qu *et al.*, 2016).

Metabolismo de la glutamina. La glutamina es el aminoácido más abundante en el plasma, a partir de éste se obtiene el carbono y nitrógeno necesario para la

biosíntesis de aminoácidos como alanina, aspartato, serina y glicina, además de ser fuente importante de α -cetoglutarato para el ciclo de Krebs (Scalise *et al.*, 2017). Adicionalmente, la conversión de glutamina a lactato (glutaminólisis) y la anaplerosis del oxalacetato, genera el NADPH suficiente para la biosíntesis y alimenta al ciclo de Krebs, respectivamente (Deberardinis *et al.*, 2007). El metabolismo de la glutamina suele alterarse en las células cancerosas, un ejemplo son las glutaminasas, enzimas encargadas de catalizar la reacción a través de la cual la glutamina dona el nitrógeno convirtiéndose en glutamato, manteniendo una actividad constante. Esta ruta metabólica se activa preferencialmente frente a la escasez de glucosa y en aquellas células con mitocondrias disfuncionales, que en general favorece a una mayor alteración metabólica (aumentando el ingreso de glucosa a la célula), manteniendo activas las rutas de señalización celular relacionadas con la proliferación y la resistencia a la muerte celular (Hensley *et al.*, 2013). La alta demanda de glutamina genera la sobreexpresión de los transportadores que ingresan el aminoácido al interior de la célula (Scalise *et al.*, 2017).

2.1.1.4. Inflamación promotora de tumores

La inflamación es una respuesta del sistema inmune innato provocada por agentes patógenos o daño en el tejido, su función principal es limitar y reparar el daño, que se logra con la participación de células del sistema inmune y de moléculas mediadoras, además de la inducción de la coagulación sanguínea y favoreciendo el regreso a la homeostasis del tejido (Murphy & Weaver, 2017). Suele ser una respuesta rápida caracterizada por hinchamiento, rubor, calor y dolor en la zona afectada. Su objetivo principal es reconocer el agente dañino, posteriormente por la señalización de quimiocinas y citocinas inflamatorias, se reclutan células del sistema inmune capaces de fagocitar el material invasivo además de liberar ERO y especies reactivas de nitrógeno (ERN) para dañar biomoléculas (Barton, 2008).

Además de ser un mecanismo de defensa, la inflamación es un proceso importante en el desarrollo de diferentes enfermedades como la artritis reumatoide, esclerosis, diabetes tipo I, cáncer, entre otras, donde el problema principal es la mala regulación en la expresión de las moléculas mediadoras o fallas en la

transducción de señales (Turner *et al.*, 2014). Se ha encontrado una fuerte relación entre infecciones crónicas e inflamación con la aparición de la enfermedad. Cuando el sistema inmune reconoce un patógeno, se activa la respuesta inflamatoria; sin embargo, si el patógeno no es eliminado o no hay resolución adecuada de la inflamación, la inflamación crónica puede favorecer al desarrollo de un tumor (Lin & Karin, 2007). No sólo una célula cancerosa puede sobrevivir en un ambiente inflamatorio, sino que éste favorece la angiogénesis, la presencia de factores de crecimiento y de moléculas que aceleran el proceso mutagénico (Hanahan & Weinberg, 2011). Es importante destacar que la respuesta inmune inflamatoria es un factor que suprime a la respuesta inmune antitumoral debido a mediadores que son producidos principalmente por células cancerosas, células inflamatorias y células asociadas a tumores presentes en el microambiente del tumor, como las citocinas, prostaglandinas, ERO y ERN, influyendo en la promoción y progresión de tumores, así como la metástasis (Lin & Karin, 2007; Shalapour & Karin, 2015).

De manera específica, las células que intervienen en el proceso de la inflamación son aquellas de origen mieloide como los granulocitos (neutrófilos, monocitos, basófilos, células dendríticas y mastocitos), así como células de linaje linfoide como las células B y T; sin embargo, es necesaria la correcta señalización y su regulación donde intervienen moléculas encargadas de mediar el reclutamiento y la activación de estas células (Murphy & Weaver, 2017). Las citocinas son moléculas de naturaleza proteica que regulan las respuestas del sistema inmune, existen citocinas clave en la respuesta inflamatoria como las interleucinas IL-1 β , IL-10, IL-8 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Jun-Ming & Jianxiong, 2009; Turner *et al.*, 2014).

La interleucina pro-inflamatoria IL-1 β pertenece a la familia de péptidos IL-1, producidas principalmente por monocitos y macrófagos. Inicialmente son sintetizados en una forma inactiva y debido a un corte proteolítico generado por un complejo proteico denominado inflamósoma, la IL-1 β es activada y secretada (Turner *et al.*, 2014). Esta interleucina cuando interactúa con alguno de sus receptores caracterizados por poseer un dominio citosólico TIR (receptor toll-IL-1), IL-RI o IL-RII, desencadena una vía de señalización que activa al factor de

transcripción NF- κ B, teniendo como resultado la expresión de otras moléculas pro-inflamatorias como la IL-2 que activa células natural killer (NK), macrófagos, polimorfonucleares y linfocitos T y B (Commins *et al.*, 2010), la IL-8, que favorece el reclutamiento de células o el VEGF (factor de crecimiento endotelio vascular) para la inducción de angiogénesis (Lewis *et al.*, 2006). Asimismo, la IL-1 β aumenta la expresión de la ciclooxigenasa 2 y la sintasa de óxido nítrico inducible, generando fiebre, anorexia sueño y facilita la extravasación de leucocitos (Apte *et al.*, 2006). Su papel en el cáncer está relacionado con cáncer de mama, colon, pulmón, cabeza, cuello y próstata (Ricote *et al.*, 2004; Lewis *et al.*, 2006). Su sobreexpresión genera inflamación exacerbada que conlleva al daño en tejido, la promoción de angiogénesis y alteraciones hematológicas (anemia, leucocitosis). Además del efecto autocrino sobre las mismas células cancerosas, la IL-1 β puede actuar de manera paracrina, afectando a la médula ósea para la producción de citocinas inflamatorias o induciendo diferenciación neuroendócrina (Apte *et al.*, 2006).

El factor de necrosis tumoral α o TNF- α es una proteína soluble o unida a la membrana citoplasmática que de manera activa se encuentra como homotrímero. Es expresada por una diferentes tipos celulares como neutrófilos, linfocitos, células NK, endotelio, mastocitos, pero principalmente por monocitos y macrófagos (Turner *et al.*, 2014). Sus funciones son muy amplias y radican en el aumento de la expresión de citocinas proinflamatorias, ON (óxido nítrico) y ERO, activación del endotelio, proliferación de células sanas, citotoxicidad de células anormales, diferenciación celular, metabolismo de lípidos, angiogénesis o en altas concentraciones genera la necrosis de los nuevos vasos sanguíneos (Bertazza & Mocellin, 2010; Commins *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha demostrado que puede funcionar como un promotor de tumores de ovario, colon, esófago, próstata, vejiga y piel, debido a que es expresada también en células cancerosas o inflamatorias asociadas al tumor de manera anormal, provocando la proliferación y la supervivencia celular, aumentando la expresión de moléculas asociadas con el ciclo celular. Además puede aumentar la producción de moléculas mutagénicas como ERO y ON , y de incrementar el potencial metastásico (Bertazza & Mocellin, 2010).

Por otro lado, la IL-10 es una interleucina antiinflamatoria expresada principalmente en linfocitos T, B y en monocitos, su función destacada es la de inhibir la activación de linfocitos T, así como la inhibición de la expresión de citocinas pro-inflamatorias de células NK, fagocitos y linfocitos, además de modular la apoptosis y la angiogénesis (Lin & Karin, 2007; Turner *et al.*, 2014). Cabe mencionar que esta citocina es importante en el equilibrio y resolución de la respuesta inflamatoria, debido a que disminuye la expresión de moléculas pro-inflamatorias como IL-6, TNF- α , IL-12, IL-1 β (Commins *et al.*, 2010). A pesar de que la IL-10 es una citocina antiinflamatoria por excelencia con potencial antitumoral, existe evidencia de que puede tener un papel pro-tumorgénico en linfomas y melanomas, debido a que logra activar STAT3 (transductor de señales y activador de la transcripción 3), llevando a la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia de las Bcl-2. Adicionalmente, la sobreexpresión de IL-10 en el microambiente tumoral conlleva a una supresión del sistema inmune que permite que el tumor no sea atacado y pueda persistir (Lin & Karin, 2007).

Dentro de las citocinas se encuentra un grupo particular de moléculas denominadas quimiocinas, que son péptidos pequeños (8-12 kDa) con 3 ó 4 residuos conservados de cisteínas, expresados en el tejido dañado que, mediante la quimiotaxis, son reclutadoras y activadoras de células del sistema inmune. La interleucina-8 (IL-8) es una quimiocina que se une a receptores acoplados a proteína G específicos: CXCR1 Y CXCR2 (Waugh & Wilson, 2008). Su función principal es la de atraer neutrófilos, monocitos, linfocitos y células polimorfonucleares, además de ser un factor angiogénico (Commins *et al.*, 2010; Turner *et al.*, 2014). La IL-8 es un quimio-atrayente que se sobreexpresa en células cancerosas de próstata, endometrio, colon, mama, pulmón y de vejiga (Yuan *et al.*, 2005; Todorovic-Rakovic & Milovanovic, 2013) que también participa en la respuesta angiogénica, proliferativa, quimiorresistente y aumenta el potencial metastásico, activando factores de transcripción como HIF-1, NF- κ B y STAT3 (Waugh & Wilson, 2008).

2.1.2. Cáncer de colon

El cáncer colorrectal (CRC) es el tercer tipo de cáncer con mayor incidencia y la cuarta causa de muerte en el mundo, responsable de cerca de 700,000 muertes al año (Arnold *et al.*, 2016). El riesgo de desarrollar la enfermedad se calcula que para los hombres es de 1 de cada 21 y 1 de cada 23 para las mujeres (ACS, 2017). Los países desarrollados poseen tasas de incidencia seis veces más altas que aquellos en vías de desarrollo; sin embargo, únicamente en el 2012 en México se registraron 8,651 casos, de los cuales 4,694 se reportaron como defunciones (GLOBOCAN, 2012). Esta enfermedad consiste en el crecimiento de células malignas en el colon y/o recto. Existen diferentes factores que pueden favorecer el desarrollo de la enfermedad:

Factores ambientales. Los hábitos alimenticios influyen en el desarrollo de CRC hasta en un 70%. Las dietas ricas en grasas saturadas, carnes rojas y bajas en fibra facilitan la carcinogénesis. Por otro lado, el sobrepeso y la baja actividad física están relacionados con una mala función intestinal, disminución en la eficiencia metabólica y desórdenes metabólicos que contribuyen en gran medida al proceso mutagénico. Como se mencionó anteriormente, el tabaquismo está directamente asociado con este proceso, siendo el responsable del 12% de las muertes por cáncer de colon, si a esto se le adiciona el consumo excesivo de alcohol, la reparación del ADN es menos eficiente y el proceso mutagénico es más agresivo (Anand *et al.*, 2008; Haggard *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2013).

Factores no modificables. Dentro de los factores de riesgo que el individuo no puede cambiar o controlar, el principal es la edad, encontrándose la mayor cantidad de casos (90%) en personas mayores de 50 años (Ruddon, 2007). Asimismo, existen dos síndromes heredables que dan predisposición a desarrollar CRC, la poliposis adenomatosa familiar (FAP) y el cáncer de colon no poliposo hereditario (HNPCC) o el síndrome de Lynch. La FAP puede comenzar a manifestarse durante la niñez, es una condición caracterizada por la aparición de miles de lesiones precancerosas denominadas adenomas, localizados en el recto y colon. La mayoría de los pacientes que sufren de FAP suelen desarrollar CRC a los 50 años de edad (Half

et al., 2009). Esta condición resulta de una mutación en el gen de la poliposis adenomatosa (*APC*), que funciona como un regulador negativo de la vía de señalización Wnt (Rodríguez *et al.*, 2003). Por otro lado, el HNPCC es ocasionado por mutaciones en alguno de los genes del sistema de reparación del ADN “mismatch” (MMR): *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* o *PMS2*. Lo anterior, favorece la inestabilidad microsatelital (MSI), lo cual aumenta en un 80% el riesgo de desarrollar CRC (Sehgal *et al.*, 2014).

Finalmente, la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn son enfermedades pertenecientes a la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) que aumentan el riesgo de desarrollar CRC. La inflamación crónica en el sistema digestivo tiene un papel esencial en la carcinogénesis, generando un microambiente ideal para CRC (Hagggar *et al.*, 2009; Z. Wang & Fang, 2014).

2.1.2.1. Carcinogénesis colorrectal

Las células cancerosas tienen un origen monoclonal, es decir, todas derivan de la misma célula. Entonces, como el inicio depende de una célula, es necesaria una acumulación de alteraciones genéticas en ésta para que el cáncer se pueda presentar. La carcinogénesis consiste en las modificaciones genéticas, competencia y selección celular que sufre una célula normal hacia la transformación a maligna, lo cual está dado por procesos extrínsecos e intrínsecos de la célula (Muñoz, 1997; West *et al.*, 2015). El CRC ha sido un modelo ideal para el estudio de los cambios morfológicos y genéticos que ocurren durante el desarrollo de esta enfermedad. Se calcula que cerca del 75% de los casos de CRC son esporádicos y no están relacionados con alguna condición hereditaria, su desarrollo consiste en una secuencia de modificaciones que dan lugar a que el epitelio intestinal normal se transforme en un carcinoma con capacidad metastásica (Frank, 2007).

La forma clásica de carcinogénesis colorrectal se le conoce como secuencia adenoma-carcinoma (Fig. 3). El proceso suele comenzar con una proliferación anormal de las células epiteliales que se encuentran en las criptas del intestino grueso, cerca del 80% de los casos poseen una mutación en el gen supresor de tumores *APC*, que participa en apoptosis, control del ciclo celular y adhesión celular

(Zhang *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2003). Durante este estadio temprano crecen tumores benignos o lesiones denominados pólipos adenomatosos o adenomas de menos de 1 cm. Otro tipo de lesiones menos comunes son los pólipos hiperplásicos o los hamartomas (Frank, 2007; Tanaka, 2009). En el siguiente paso de la carcinogénesis el gen *K-RAS* sufre mutaciones que permite que la proteína se mantenga activa y se conserve constante la estimulación de la vía de señalización de proliferación RAS-RAF-MEK-ERK y de la vía PI3K que participa en la supresión de apoptosis. Se ha observado la mutación de este gen en adenomas intermedios de más de 1 cm de tamaño (Arends & Hons, 2013).

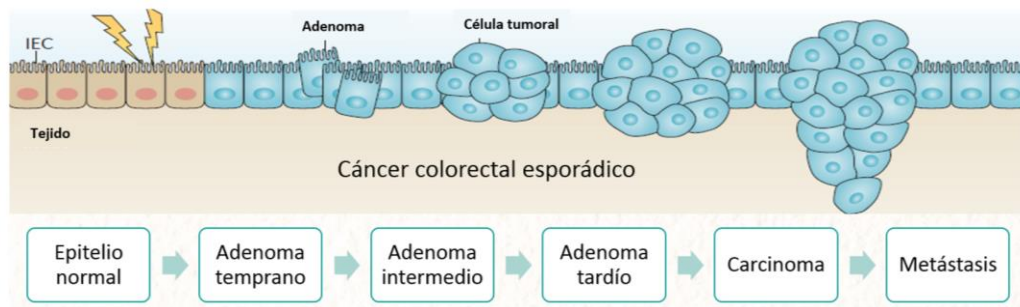


Figura 3. Modelo de carcinogénesis colorrectal secuencia adenoma-carcinoma. Modificado de West *et al.*, 2015.

La inestabilidad cromosomal tiene un papel importante, se calcula que en cerca del 60% de los adenomas tardíos se pierde el brazo largo del cromosoma 18 (18q), lo que genera pérdida de la heterocigosidad (LOH) de *DCC* (Deleted in Colorectal Cancer) y de genes de la familia de *SMAD*. El gen *DCC* participa en procesos de adhesión celular y diferenciación, y suele verse mutado en estadios tardíos de diferentes tipos de cáncer, principalmente CRC y cáncer de ovario (Khan *et al.*, 2011). Por otro lado, los genes *SMAD* participan en la inhibición del crecimiento regulando la expresión de genes a través de la vía de señalización TGF- β y pueden sufrir mutaciones que afectan la estructura tridimensional, estabilidad de la proteína y la interacción con otras proteínas o el ADN. *SMAD4* y *SMAD2* son los genes que suelen perderse con mayor frecuencia por LOH (54 y 53%,

respectivamente) especialmente en etapas avanzadas de CRC (Fleming *et al.*, 2013).

Por último, mutaciones en el gen *p53* son las que suelen marcar el paso de adenoma a adenocarcinoma, ya que permite la evasión de apoptosis, favorece la inestabilidad genética y el potencial metastásico. Este gen está encargado de asegurar la integridad del ADN, induciendo detención del ciclo celular o apoptosis durante algún tipo de estrés dentro de la célula. Algunas mutaciones de este gen o LOH pueden presentarse en cerca del 75% de los CRC (Rodríguez *et al.*, 2003; Frank, 2007).

2.2. LAS PLANTAS COMO FUENTE DE COMPONENTES ANTICANCEROSOS

Las plantas han sido utilizadas a lo largo de la historia de la humanidad para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades. En una primera aproximación, en los 90's del siglo pasado se encontró una relación estrecha entre la dieta rica en frutas y vegetales con datos epidemiológicos que apuntaban a un potencial protector contra el cáncer. En la actualidad es conocido que los constituyentes de las plantas poseen efectos benéficos en la prevención y tratamiento de este grupo de enfermedades (Johnson, 2007). Los principales protagonistas son los denominados fitoquímicos o metabolitos secundarios de plantas, moléculas orgánicas producto del metabolismo secundario que no poseen una función directa en procesos relacionados con la fotosíntesis, respiración, flujo de nutrientes y síntesis de macromoléculas, que suelen estar restringidos a grupos taxonómicos, además de una limitación espacial y temporal. Se ha establecido que estos compuestos están implicados en funciones ecológicas como en la interacción con otros organismos, competencia, comunicación, defensa contra patógenos y parásitos, tolerancia a estrés abiótico, como atrayente o repelentes de otros organismos, como agentes transportadores de metales, hormonas sexuales, excreción de productos, efectores de diferenciación celular, reserva de energía, entre otras (Seigler, 2002).

De acuerdo a lo anterior, se ha dirigido la atención a los organismos vegetales ricos en compuestos activos con propiedades anticancerígenas como aquellas que no permiten la iniciación de los tumores o anticancerosas que logran suprimir la progresión de tumores (Johnson, 2007). Entre ellos, los terpenos son la clase de metabolitos secundarios más numerosos formados a partir de unidades de moléculas de 5 carbonos denominados isoprenos, específicamente han demostrado poseer efectos citotóxicos contra células de cáncer de hígado HepG2, como el monoterpeno geraniol o el diterpeno oridonina de *Rabdosia rubescens*, el triterpeno ácido asiático de *Centella asiatica* así como el tetraterpeno fucoxantina extraído de varias especies de algas marinas (Thoppil & Bishayee, 2011).

Otro grupo de fitoquímicos muy relevantes son los alcaloides, compuestos activos sintetizados a partir de aminoácidos aromáticos caracterizados por su contenido de nitrógeno. Los alcaloides denominados vinca son extraídos de *Catharanthus roseus* y en este grupo se encuentra la vinblastina, vinorelbina, la vincristina y la vindesina, compuestos que son conocidos por su gran actividad anticancerosa contra ciertos tipos de cáncer como adenocarcinoma mamario, osteosarcoma, cáncer de pulmón, carcinoma testicular, linfomas, entre otros, logrando inhibir la proliferación celular uniéndose a los microtúbulos, ocasionando un bloqueo mitótico y apoptosis (Moudi *et al.*, 2013).

Los compuestos fenólicos poseen la característica principal de presentar anillos aromáticos hidroxilados, son derivados de la ruta biosintética del ácido shikímico y del ácido malónico, y han sido ampliamente estudiados por su capacidad antioxidante y antiinflamatoria. De manera especial, *Curcuma longa* es utilizada como especia y es la fuente principal de la curcumina, polifenol que es selectivamente citotóxico a casi todos los tipos de células cancerosas. Su actividad se le atribuye a su capacidad para inducir apoptosis intrínseca y extrínseca, detención del ciclo celular, actividad antiinflamatoria, daño en el ADN, inducción de autofagia, entre otros (Ravindran *et al.*, 2009).

De manera especial, un grupo muy diverso de metabolitos secundarios denominados policétidos poseen actividad anticancerosa. Estos son compuestos que derivan o se sintetizan de manera muy similar a los AG, básicamente por

condensación de grupos de malonato con acetato (Seigler, 2002). La síntesis de estos compuestos no está completamente dilucidada; sin embargo, es conocido que las enzimas policétido sintetasas son las encargadas de los procesos de generación y modificación de la cadena carbonada.

2.2.1. Ácidos grasos y derivados de ácidos grasos

Los AG son biomoléculas formadas por un grupo carboxilato hidrofílico y por una cadena hidrocarbonada hidrófoba normalmente alifática que puede ser de 2 hasta 36 carbonos y puede tener varios grados de saturación. Se pueden encontrar derivados en los que las cadenas poseen anillos de 3 carbonos, grupos hidroxilo o metilo. De acuerdo a la longitud de la cadena los AG se clasifican en: 1) De cadena corta (<6 carbonos), 2) De cadena media (8-12 carbonos), y 3) De cadena larga (>14 carbonos). Las propiedades de estas moléculas están definidas por la longitud y por las insaturaciones a lo largo de la cadena, influyendo en los puntos de fusión. Son un grupo diverso de moléculas que además pueden formar parte de lípidos más complejos tienen diferentes funciones como almacenamiento de energía, forman parte de la estructura de membranas, cofactores, hormonas, segundos mensajeros, acarreadores de electrones, entre otras (Nelson & Cox, 2008; Stadler, 2008).

Un grupo de moléculas lipídicas que han demostrado poseer una gran importancia biotecnológica son los AG ω -3 y ω -6, que además de poseer propiedades nutritivas, logran inducir apoptosis, modificar los niveles de AG y estrés oxidativo en células cancerosas de próstata, colon y neuroblastoma (Xu & Qian, 2014). Por ejemplo, el aceite de almendra posee un gran porcentaje de AG de cadena larga como el ácido oleico, palmítico y linoleico que disminuyen la viabilidad de distintas líneas celulares cancerosas de colon (Merikli *et al.*, 2017). Interesantemente, moléculas análogas de los AG generadas sintéticamente poseen potencial anticanceroso importante, siendo moléculas más activas que las parentales como la doxorubicina, la citarabina o el panaxadiol, además de ser moléculas más estables metabólicamente y más selectivas hacia células cancerosas (Murray *et al.*, 2015).

Los DAG o las acetogeninas son un subgrupo de policétidos o moléculas lipídicas de cadena larga restringidos a las familias Lauraceae y Annonaceae, se ha detectado que uno de sus efectos principales es la de proteger contra herbívoros y plagas. Aquellas derivadas de la familia Annonaceae han sido estudiadas ampliamente y están caracterizadas por tener cadenas de 35 a 37 carbonos, una lactona y uno o varios grupos tetrahidrofuranos (THF) (Qayed *et al.*, 2015). Se desconoce la ruta de biosíntesis de estas moléculas; sin embargo, se hipotetiza que para la síntesis de acetogeninas anonáceas, como la goniocina o la gigantecina, se requiere de un intermediario triepóxido derivado de un ácido de cadena muy larga (Alali *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2011). Dentro de las aplicaciones más relevantes, se ha demostrado la capacidad citotóxica en diferentes modelos cancerosos y se sabe que logran inducir la detención del ciclo celular y la apoptosis en distintos tipos celulares de cáncer de colon, hígado, vejiga y glioblastoma (Lee *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2003).

Las acetogeninas provenientes de la familia Lauraceae son sintetizadas en células especializadas o idioblastos en etapas tempranas del desarrollo; sin embargo, no se tiene clara la ruta de síntesis (Rodríguez-Saona, 2000). Se ha relacionado su síntesis con la ruta de biosíntesis de AG de cadena larga, y se proponen a distintos AG insaturados como precursores, entre ellos los ácidos esteárico, oleico, linoleico o linolénico (Rodríguez-Saona, 2000). La estructura de las acetogeninas de lauráceas se caracterizan por poseer cadenas hidrocarbonadas de más de 17 carbonos con un grupo acetoxi y varios grupos hidroxilo a lo largo de la cadena (Rosenblat *et al.*, 2011). Estas moléculas han sido menos abordadas, sin embargo, continúan siendo moléculas activas importantes que han llamado la atención en los últimos años. A continuación, se describe más a detalle el aguacate, la fuente más importante de acetogeninas alifáticas, así como los efectos anticancerosos de estos compuestos.

2.2.2. Propiedades del aguacate

El aguacate es originario de Centroamérica y México, es una angiosperma perteneciente a la familia Lauraceae y al género *Persea* donde se clasifican cerca

de 50 especies (Bergh & Ellstrand, 1986). De manera general, se reconocen tres variedades botánicas: el aguacate guatemalteco (*P. americana* var. *guatemaltensis*), el antillano (*P. americana* var. *americana*) y el nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*), las cuales han sido domesticadas y han dado origen a los más de 800 cultivares de aguacate (Bergh & Ellstrand, 1986; Baraona & Sancho, 2000). Su importancia radica en que el fruto aporta gran cantidad de elementos nutritivos (cuadro 2) y es ampliamente consumido alrededor del mundo. México es el primer productor a nivel mundial ya que aporta el 30.9% del total de la producción mundial de aguacate, generando cerca de 1,316,104 toneladas anuales, de las cuales Michoacán contribuye con el 85.9%, posicionándose como el primer lugar nacional de producción (SAGARPA, 2015).

Cuadro 2. Composición de la pulpa de aguacate Hass.

Nutriente/fitoquímico	Cantidad/100 g	Nutriente/fitoquímico	Cantidad/100 g
Agua (g)	72.3	Vitaminas C, A, E y K (mg)	10
Energía (kcal)	167	Fitoquímicos	
Energía (kcal) fibra insoluble	148	Tiamina (mg)	0.08
Proteína (g)	1.96	Riboflavina (mg)	0.14
Lípidos (g)	15.4	Niacina (mg)	1.91
Fibra (g)	6.8	Colina (mg)	14.2
Carbohidratos (g)	0.3	Carotenos (µg)	87
Almidón (g)	0.11	Tocoferol (mg)	0.38
MINERALES (mg)		Ácido pantoténico (mg)	1.46
Potasio	507	Betaína (mg)	0.7
Fósforo	54	Criptoxantina (µg)	27
Magnesio	29	Luteína + zeaxantina (µg)	271
Calcio	13		

Modificado de USDA, 2011.

Además de su valor como alimento, el aguacate ha sido utilizado en la medicina tradicional para tratar diferentes enfermedades como parásitos intestinales, problemas digestivos, enfermedades del cuero cabelludo, la disentería

(Hernández & Gally, 1981) y para ayudar a disminuir la resequedad e inflamación en la piel (White & Foster, 2004). Adicionalmente, se utilizan infusiones de hoja de aguacate para tratar la diabetes y disminuir el colesterol en la sangre (INECOL, 2015).

En la actualidad existen diversos estudios que demuestran algunas propiedades medicinales del aguacate, incluso se han llegado a determinar las moléculas responsables. Por ejemplo, su potencial antioxidante se ha relacionado con la presencia de polifenoles (Gorinstein *et al.*, 2010). Asimismo, el tratamiento de pacientes con osteoartritis con una mezcla de componentes no saponificables de aguacate y soya permitió la disminución del dolor, debido a que favorece la síntesis de colágeno y proteoglicano y a la disminución de citocinas pro-inflamatorias, NO y de PGE₂ en condrocitos (Kucharz, 2003); además estos componentes no saponificables de aguacate poseen un efecto antiinflamatorio en monocitos THP-1 (Au *et al.*, 2007).

Adicionalmente, se ha observado que el extracto de hoja de aguacate tiene propiedades analgésicas y antiinflamatorias en ratones y ratas, efecto comparable con el de la morfina y el ácido acetilsalicílico (Adeyemi *et al.*, 2002). Por otro lado, en pacientes hipertensos se demostró que un extracto de hoja prensada de aguacate disminuye la presión arterial y se observó una baja considerable del colesterol total (CT) y el colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL), lo cual se relacionó con el contenido de taninos, alcaloides, flavonoides, entre otros (Folaranmi, 2014). Interesantemente, ratas diabéticas (inducidas por sacarosa) cuyo alimento fue suplementado con aceite de aguacate mostraron un menor aumento de peso y una disminución de la resistencia a insulina (Toro-Equihua *et al.*, 2016). En el mismo sentido, un extracto etanólico de hoja de aguacate disminuyó la glucosa en sangre en ratas diabéticas, lo cual se asoció con un aumento de la expresión de la proteína cinasa B (PKB), que permite la translocación de la glucosa al interior de las células por el receptor GLUT-4, además de que mostró un efecto protector del hígado ante los daños generados por la diabetes (debido al aumento de aminotransferasas) (Lima *et al.*, 2012). De manera similar, en ratas a las cuales se les generaron heridas, el tratamiento con un extracto

de la pulpa de aguacate rico en AG saturados e insaturados favoreció un proceso más rápido de curación y restauración del epitelio (Oliveira *et al.*, 2013).

2.2.3. Componentes bioactivos de la semilla de aguacate

La pulpa y la hoja del aguacate han sido ampliamente estudiados; sin embargo, en la semilla también se han encontrado diferentes propiedades, dentro de las cuales se encuentran la actividad antiinflamatoria, antidiabética, antihipertensiva, antimicrobiana, insecticida y anticancerosa (cuadro 3), atribuidas a la gran variedad de compuestos que poseen como AG, polifenoles, fitoesteroles, triterpenos, ácido furanoicos, ácido abscísico, proanticianidinas, entre otros (Dabas *et al.*, 2013). Su potencial anticanceroso se ha asociado con más de 20 grupos de componentes bioactivos, entre ellos se han reportado terpenoides glucósidos, flavonoides, cumarina, AG y DAG (Ding *et al.*, 2007).

Cuadro 3. Efectos de compuestos bioactivos de la semilla de aguacate en diferentes modelos de estudio.

Efecto	Modelo	Extracto/dosis	Efecto principal
<i>Anticanceroso</i>	MDA-MB-231 células de cáncer de mama	Extracto metanólico. < 100 µg/mL	Inducción de la apoptosis medida por el incremento de la caspasa 3, caspasa 7 y poli (ADP ribosa) polimerasa (PARP) de escisión
<i>Antiinflamatorio</i>	Secreción de PLA ₂	Poliolios lipídicos	Actividad inhibitoria de PLA ₂
	Queratinocitos <i>in vitro</i>	Acetogeninas alifáticas aisladas de pulpa y semilla	Disminución de mediadores pro-inflamatorios IL-6, PGE ₂ y dímeros de pirimidina ciclobutano después de la radiación con UVB
<i>Antidiabético</i>	Ratas diabéticas inducidas con aloxan	Extracto acuoso de semilla 400 y 900 mg/kg peso corporal/14 días	Reduce los niveles de glucosa en sangre de 47-55%. Restauración en islotes pancreáticos

<i>Antihipertensivo</i>	Ratas hipertensas	Extracto acuoso de semilla de cultivar Fuerte. 200-700 mg/kg peso	Reduce los niveles de presión, colesterol, glucosa, urea, los niveles de sodio y del ritmo cardíaco
<i>Hipocolesterolémico</i>	Ratón	125, 250, y 500 mg ASF/kg de harina de semilla de aguacate seca durante 6 días	Reducción significativa en TC y c-LDL
<i>Usos dermatológicos</i>	Queratinocitos <i>in vitro</i>	PFA de un extracto de semilla con hexano. Cultivar Ettinger. < 5 µg/mL	Aumento de la proliferación y viabilidad celular. Protege contra daño por rayos UV
	Humanos	Aceite mineral de semilla aplicado en el cuero cabelludo	Evita la caída de cabello
<i>Antimicrobiano</i>	Bacterias Gram + y Gram –, Hongos	Extracto etanólico de semilla. 125-250 µg/mL	Efectos antimicrobianos y antifúngicos
<i>Insecticida</i>	<i>Trypanosoma cruzi in vitro</i>	Extracto metanólico. < 500 µg/mL	Actividad moderada contra la movilización de epimastigotes y trypomastigotes

Modificado de Dabas *et al.*, 2013.

El aguacate Hass es el cultivar que más se produce y se comercia en el mundo. Esto ha contribuido a que muchos de los estudios demostrando sus propiedades bioactivas estén enfocados en este y otros cultivares importantes como el Fuerte o el Ettinger (Rosenblat *et al.*, 2011; Dabas *et al.*, 2013). Otros cultivares y variedades no han sido abordadas, como es el caso de la variedad *drymifolia*, de los cuales no existen reportes. El aguacate *Persea americana* var. *drymifolia* es originario de México y posee características importantes y únicas; puede sobrevivir en altitudes que van hasta los 2000 msnm además de mediana resistencia a heladas, alto contenido lipídico (20-30%) (Baraona & Sancho, 2000) y una alta cantidad de

derivados de ácidos grasos en comparación con otras variedades y cultivares (Rodríguez-López *et al.*, 2015). De aquí la importancia del estudio detallado de esta variedad que no ha sido explorada.

2.2.3.1. Moléculas lipídicas de la semilla de aguacate

El aguacate nativo mexicano es rico en moléculas de naturaleza lipídica ya que posee numerosos AG y DAG (cuadro 4). Se ha reportado una gran variedad de estos compuestos en la semilla de aguacate, siendo los más abundantes los ácidos saturados hexadecanoico (C16:0), pentadecanoico (C15:0), heptadecanoico (C17:0) y octadecanoico (C18:0); también contiene AG insaturados como los ácidos 9-octadecenoico (C18:1), 11-eicosenoico (C20:1), 9-hexadecenoico (C16:1) y también AG poli-insaturados como los ácidos 9,12-octadecadienoico (C18:2), 9,12,15-octadecatrienoico (C18:3), entre otros (Báez-Magaña, 2014; Bora *et al.*, 2001).

Cuadro 4. Composición de moléculas lipídicas de cadena larga de la semilla de aguacate nativo mexicano.

Grupo	Compuesto	µg/g de extracto
<i>Derivados de AG (acetogeninas alifáticas)</i>	Avocatinas	32.28
	Perseninas	10.12
	Pahuatinas	4.26
	Ácidos grasos polihidroxilados	24.26
<i>Ácidos grasos de cadena larga</i>	Ácido tetradecanoico (ác. mirístico)	2.49
	Ácido hexadecanoico (ác. palmítico)	7.1
	Ácido 9,12-Octadecadienoico (ác. linoleico)	4.06
	Ácido 9-Octadecenoico (ác. oleico)	5.32
	Ácido octadecanoico (ác. esteárico)	5.06
	Ácido eicosanoico (ác. araquídico)	2.39
	Ácido 13-docosenoico (ác. erúcico)	2.44
	Ácido docosanoico (ác. behénico)	3.63
	Ácido 15-tetracosenoico (ác. nervónico)	2.88
	Ácido tetracosanoico	4.29

Modificado de Báez-Magaña, 2014.

Un aspecto importante de las acetogeninas, en cuanto a su contenido y distribución en el fruto, es que se ha reportado que entre la pulpa y la semilla se presentan cantidades similares; sin embargo, en pulpa se encuentra un contenido mayor de acetogeninas de 21 carbonos como persenona A y persina, mientras que en semilla las moléculas mayoritarias son de 17 carbonos como 1-Acetoxi-2,4-dihidroxi-heptadec-12-eno-16-ino y 1-Acetoxi-2,4-dihidroxi-heptadec-16-eno (Rodríguez-López *et al.*, 2015).

2.2.3.2. Efectos citotóxicos de los lípidos de cadena larga de aguacate

Además de sus propiedades nutricionales, se sabe que los AG tienen efectos citotóxicos hacia diversos tipos celulares, muchos de ellos asociados a la inducción de la apoptosis. Por ejemplo, los ácidos palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) inducen apoptosis en células ováricas granulosa humana de manera concentración-dependiente, mediante la inducción de la vía intrínseca por disminución de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y el aumento de la proteína pro-apoptótica Bax (Mu *et al.*, 2001). Un mecanismo similar se ha observado en hepatocitos de rata tratados con estos AG, además de la detención del ciclo celular (Ji *et al.*, 2005). Asimismo, el ácido palmítico induce apoptosis en células productoras de insulina RINm5F de ratón mediante estrés oxidativo y daño al ADN generado por la peroxidación de estas moléculas (Beeharry *et al.*, 2003). Otros AG de cadena larga como el oleico (C18:1) y el linoleico (C18:2) inducen apoptosis en células de adenocarcinoma de colon humano HT-29 y Caco-2, sin embargo el mecanismo no ha sido descrito (Llor *et al.*, 2003).

Respecto a las acetogeninas alifáticas presentes en aguacate, los primeros estudios han reportado que un extracto etanólico del fruto de aguacate inmaduro, rico en estas moléculas, posee actividad citotóxica contra seis distintas líneas celulares: células de carcinoma de pulmón (A549), de riñón (A498), de páncreas (PaCa2), adenocarcinoma de mama (MCF-7), de colon (HT-29) y de próstata (PC-

3); sin embargo, no se estableció el mecanismo (Oberlies *et al.*, 1998). Por otro lado, se ha observado que la persina inhibe la proliferación de distintas líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231 y T-47D), específicamente induciendo la detención del ciclo celular en la fase G2-M debido a una disminución en la expresión de las ciclinas A, D1 y B1 (que participan en la promoción del ciclo celular), y por el aumento en la expresión de p21 y p27, moléculas que participan en la detención del ciclo celular inhibiendo las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), además de la inducción de la apoptosis como respuesta al daño a los microtúbulos (Butt *et al.*, 2006). En otro estudio, dos acetogeninas alifáticas (17 C) obtenidas a partir de un extracto clorofórmico del mesocarpo de aguacate cultivar Hass, actúan de forma sinérgica en la inhibición de la proliferación de células de cáncer oral 83-01-82CA mediante la afectación de la vía EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK1/2, disminuyendo la expresión y fosforilación de sus componentes (D'Ambrosio *et al.*, 2011). Previamente se había reportado que esta misma mezcla de acetogeninas C17 favorecía la inducción de apoptosis de manera selectiva en células de cáncer oral, y no en células sanas, mediante la activación de las dos vías de inducción (intrínseca y extrínseca), como respuesta a la liberación de ERO de la mitocondria (Ding *et al.*, 2009). De manera similar, recientemente se reportó que la mezcla de dos acetogeninas de 17 carbonos, denominada avocatina B, afecta de manera específica la viabilidad de células de leucemia mieloide aguda mediante apoptosis intrínseca inducida por ERO (Lee *et al.*, 2015).

2.2.3.3. Efectos antiinflamatorios de los lípidos de cadena larga de aguacate

Como se ha mencionado antes, al aguacate se le atribuye una capacidad antiinflamatoria generada por una gran variedad de compuestos. De manera específica, las moléculas lipídicas han sido reportadas como agentes antiinflamatorios y la semilla de aguacate es rica en estas moléculas. La producción de ERO es alta en ambientes inflamatorios, lo que suele generar daño en las biomoléculas sobre todo daños severos en el ADN, lo cual puede representar ventajas a las células cancerosas. Se sabe que el ácido linoleico es capaz de proteger al daño en la célula mediante la inhibición del estrés oxidativo, incluso

mejor que otros antioxidantes como el ácido α -lipoico y el 3,3-metoxisalenoMn(III) (*N,N*-bis(3-metoxysalicilideno)-etilenediamina)Mn(III) (Beeharry *et al.*, 2003).

Las acetogeninas de aguacate también tienen propiedades antioxidantes (Rodríguez-Sánchez *et al.*, 2013). En un estudio en el que utilizaron células RAW 264.7 de macrófagos de leucemia de ratón tratadas con moléculas lipídicas de la pulpa de aguacate (persenona A y B), proponen que estas moléculas actúan como agentes antioxidantes que pueden ser utilizados para evitar la inflamación asociada a procesos neoplásicos, logrando inhibir la generación de superóxido y ON (Kim *et al.*, 2000). Por otro lado, las acetogeninas presentes en un extracto hexánico de la semilla de aguacate cultivar Ettinger, tienen un efecto foto-protector ya que disminuyen el daño en el ADN evitando la formación de los dímeros de timina mediante la reparación por escisión de nucleótidos, y también un efecto queratinocitos expuestos a rayos UV (Rosenblat *et al.*, 2011).

Estos efectos asociados a las moléculas lipídicas de la semilla del aguacate cobran relevancia, debido a que se sabe que las células cancerosas tienen características únicas que les permiten sobrevivir y diseminarse, y hacia ellas se ha dirigido el estudio de nuevas terapias, lo cual se describirá a continuación.

2.3. ANTECEDENTES DIRECTOS

Cabe mencionar que en nuestro grupo de trabajo en un estudio previo se observó una disminución de la viabilidad y proliferación (~80%) de 3 líneas celulares cancerosas (HeLa, Caco-2 y MCF-7) y una línea celular normal de células de epitelio mamario bovino (CEMB), cuando éstas fueron tratadas con un extracto hexánico de la semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) rico en AG y DAG. Este efecto se asoció con la inducción de apoptosis en las células Caco-2 y CEMB (Lara, 2015). Sin embargo, la vía por la cual se induce la apoptosis aún no se conoce. Adicionalmente, se ha observado que en las CEMB estas moléculas disminuyen la expresión de genes de la respuesta proinflamatoria (citocinas y quimiocinas), además de favorecer el aumento en la expresión de la citocina IL-10, por lo que se les atribuye una actividad antiinflamatoria (Báez-Magaña *et al.*, 2014). Sin embargo, se desconoce si estas moléculas pueden estar regulando la respuesta inflamatoria en células cancerosas.

3. JUSTIFICACIÓN

Los tratamientos convencionales suelen ser efectivos contra células cancerosas; sin embargo, debido a que no eliminan todas las células cancerosas, la enfermedad puede resurgir. Por esta razón, se ha incrementado la importancia del estudio de nuevas alternativas que resulten más agresivas y selectivas para las células cancerosas y a su vez menos dañinas para las células sanas. En este sentido, el cáncer de colon es uno de los tipos de cáncer más relevantes en México, donde las terapias actuales poseen muchos efectos secundarios severos y a los que se suele desarrollar resistencia.

México es el principal productor y consumidor de aguacate, donde Michoacán ocupa el primer lugar como productor, por lo que el estudio del aguacate y sus propiedades tienen gran relevancia. De manera especial, el aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) es un fruto rico en moléculas lipídicas, y en la búsqueda de biomoléculas que dañen a las células cancerosas se ha documentado que algunos AG y DAG de cadena larga suelen afectar la proliferación y viabilidad celular. Debido a esto, en este trabajo se evaluaron los efectos citotóxicos e inmunomoduladores de las moléculas lipídicas de cadena larga obtenidos de la semilla de aguacate nativo mexicano sobre células cancerosas de colon, así como los mecanismos que pudieran estar participando como la apoptosis y la detención del ciclo celular.

4. HIPÓTESIS

Las moléculas lipídicas de cadena larga de la semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) son citotóxicos para células de cáncer de colon mediante la inducción de apoptosis y la detención del ciclo celular.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de las moléculas lipídicas de cadena larga de la semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) sobre el ciclo celular y la inducción de apoptosis en células de cáncer de colon.

5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Evaluar los efectos de las moléculas lipídicas de cadena larga de la semilla de aguacate sobre la inducción de apoptosis en células de cáncer colon.
- 2) Analizar los mecanismos de citotoxicidad de las moléculas lipídicas de cadena larga de la semilla de aguacate inducido en células de cáncer de colon.
- 3) Determinar el efecto de las moléculas lipídicas de cadena larga de la semilla de aguacate sobre el ciclo celular en células de cáncer colon.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

A continuación, en la figura 4 se presenta la estrategia metodológica.

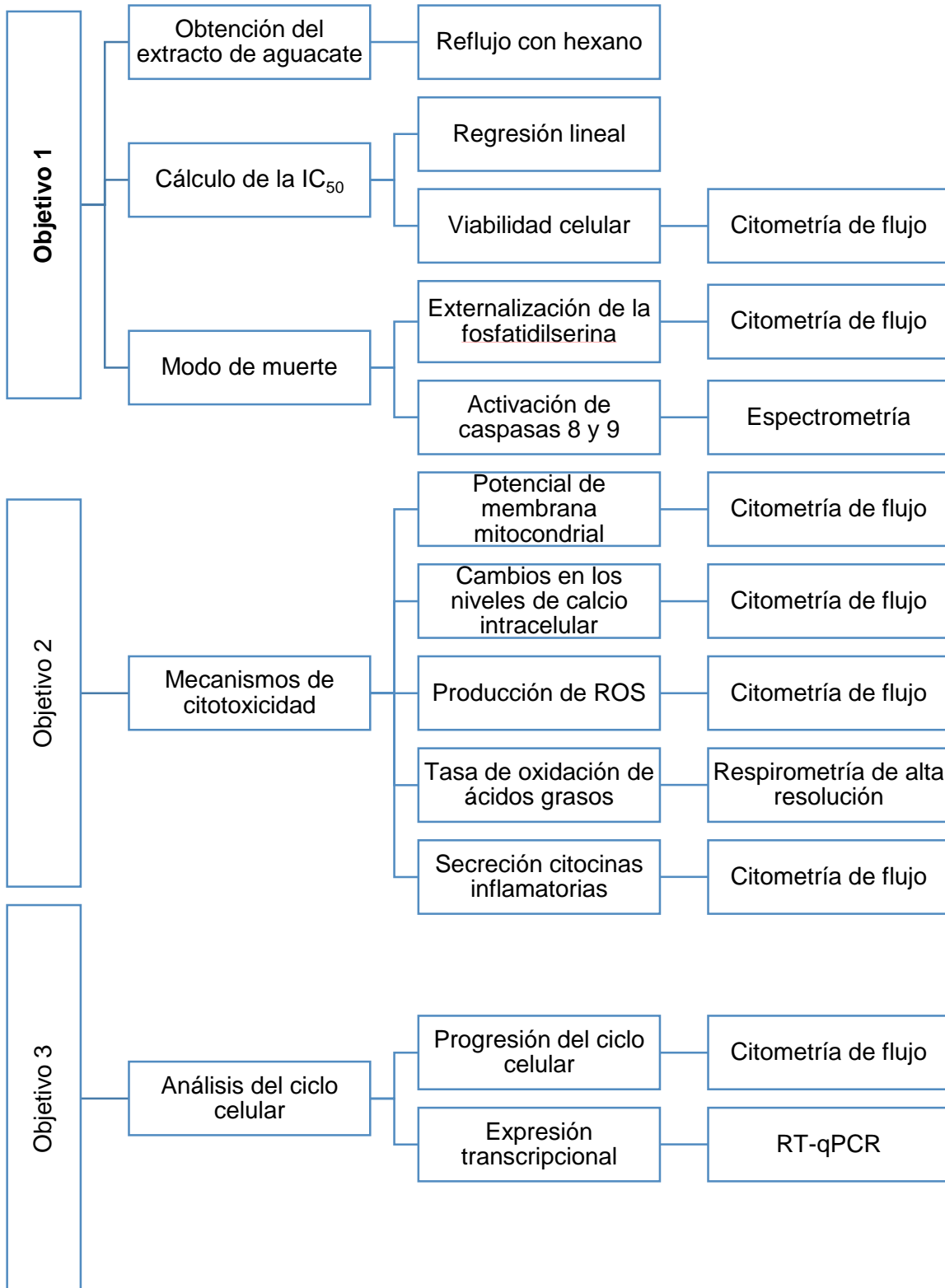


Figura 4. Estrategia experimental

7. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se presentan en dos capítulos:

En el capítulo I se muestran los datos generados con la línea celular Caco-2.

Capítulo I. **Avocado seed long-chain lipids induces apoptosis and modulate the inflammatory response in human colon cancer cells Caco-2**

En el capítulo II, se presentan los datos generados con la línea celular HCT 116.

Capítulo II. **Citotoxicidad de ácidos grasos y derivados de ácidos grasos de la semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) sobre células HCT 116.**

7.1. CHAPTER I. AVOCADO SEED LONG-CHAIN LIPIDS INDUCES APOPTOSIS AND MODULATE THE INFLAMMATORY RESPONSE IN HUMAN COLON CANCER CELLS CACO-2

Lara-Márquez Mónica¹, Báez-Magaña Marisol¹, Spagnuolo Paul A.², Salgado-Garciglia Rafael³, Ochoa-Zarzosa Alejandra¹ and López-Meza Joel E.¹

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro. Posta Veterinaria, P.C. 58893, Morelia, Michoacán, México.

²Food Science Department. University of Guelph. 50 Stone Rd. East. N1G2W1. Guelph, Ontario, Canada.

³Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Gral. Francisco J. Múgica SN, Felicitas del Río, P.C. 58040, Morelia, Michoacán, México.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the third most common type of cancer and the fourth leading cause of death in the world, accounting for about 700,000 deaths a year. Chemotherapy currently used in patients with CRC is associated with severe side effects. As alternative, the search of natural compounds extends the possibilities of therapeutic targets. Long chain lipids (LCL) molecules have been shown to have anticancer activities and have been proposed as chemo-therapeutic adjuvants. The aim of this work was to determine the cytotoxic effect of an extract rich in long chain lipids from Mexican native avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) on colon cancer cells Caco-2. The results showed that the LCL from avocado seed were cytotoxic towards Caco-2 cells in a concentration-dependent manner ($IC_{50}=28\mu\text{g/mL}$), inducing apoptosis in Caco-2 cells through the activation of the caspases 8 and 9. Also, LCL induced the loss of membrane mitochondrial potential (68%), inhibited the fatty acids oxidation (45%) and increased the production of superoxide (30%) and mitochondrial ROS (52%). In addition, LCL induced the cell cycle arrest in the G1/G0 phase and modulated cytokines expression, IL-6, IL-8 and IL-10 were up-regulated whereas IL-1 β expression was down-regulated. In conclusion, LCL from Mexican native avocado seed were cytotoxic towards Caco-2 colon adenocarcinoma cells, inhibiting the oxidation of fatty acids which increases ROS production and thus favoring the loss of membrane mitochondrial potential that allows the induction of caspase-dependent apoptosis. In addition, these molecules

induce arrest of the cell cycle and the modulation of cytokines related to the inflammatory response.

Key words: Colon cancer, long-chain lipids, apoptosis, avocado

1. Introduction

Cancer represents a worldwide problem, in 2012 about 32 million people were living with cancer and 8.2 million deaths were reported (GLOBOCAN, 2012). Colorectal cancer (CRC) is the third most common type of cancer and the fourth leading cause of death in the world, accounting for about 700,000 deaths a year (Arnold *et al.*, 2016). Chemotherapy currently used in patients with CRC is associated with severe side effects including hematological toxicity, nausea, vomiting, pain, diarrhea, nervous system depression, allergic reactions, alopecia, among others. These toxic effects are usually more severe in women than in men (Braun & Seymour, 2011; Wiela *et al.*, 2015). Additionally, it is estimated that 90% of metastatic cancer cases acquire resistance to chemotherapeutic agents (Longley & Johnston, 2005). For this reason, it is important to search for new cytotoxic compounds more selective and aggressive towards cancer cells. In this sense, the plants have been used historically for the treatment of a great variety of diseases. There is a close relationship between fruit and vegetable rich diet with epidemiological data pointing to a protective potential against cancer (Johnson, 2007). It is now known that plant constituents have beneficial effects in prevention and treatment of cancer, essentially the phytochemicals or secondary metabolites, which are organic molecules product of secondary metabolism (Wang *et al.*, 2012).

Avocado (*Persea americana* Mill.) is considered one of the most nutritious commercial fruits and is widely consumed around the world (USDA, 2011). Avocado possesses medicinal properties such as antioxidant potential (Gorinstein *et al.*, 2010), analgesic, anti-inflammatory (Adeyemi *et al.*, 2002; Rosenblat *et al.*, 2011), hypocholesterolemic properties (Folaranmi, 2014), also decreases blood glucose levels and has a protective effect on the liver and kidneys in diabetic rats (Ortiz-Avila *et al.*, 2013; Toro-Equihua *et al.*, 2016; Ortiz-Avila *et al.*, 2015), facilitates the process of healing and restoration of the epithelium (Oliveira *et al.*, 2013) and has anti-cancer

properties (Ding *et al.*, 2007). The avocado anti-cancer activities have been associated with more than 20 groups of bioactive compounds, among them long chain lipid (LCL) molecules, such as long chain fatty acids and its derivatives (avocatin, pahuatin, persenin and polyhydroxylated fatty alcohols) (Rodríguez-Saona, 2000; Bora *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2007 and Rosenblat *et al.*, 2011). These compounds independently have been shown to have anti-cancer effects (Llor *et al.*, 2003; D'Ambrosio *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2015). In particular, long chain fatty acids have shown anticancer properties on colon cancer cell lines and have been proposed as chemo-therapeutic adjuvants (Fauser *et al.*, 2011). In this sense, the use of natural compound combinations extends the possibilities of therapeutic targets in order to activate apoptosis (Aung *et al.*, 2017). The main objective of this work was to determine the cytotoxic effect of LCL molecules from Mexican native avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) on Caco-2 cancer cells.

2. Materials and methods

2.1. Long-chain lipid (LCL) molecules from avocado seed

Physiologically mature fruits of Mexican native avocado (*P. americana* var. *drymifolia*) were collected in Tingambato, Michoacán, Mexico. Frozen seeds were crushed and extracted in a Soxhlet apparatus for 14 h using hexane as the solvent (C₆H₁₄, J.T. Baker). The obtained extract was filtered using Whatman filter paper and subjected to freezing for 12 h at -18°C to obtain the crystals rich with LCL molecules. The crystals were resuspended in 5% DMSO (dimethylsulfoxide, Sigma) (Rosenblat *et al.*, 2011). Identification of the compounds was performed by using GC-MS and HPLC/MS-EIC analysis, and data were compared with previously reported information taking into account its mass spectrum and retention time, according to the spectral data base NIST/EPA/NIH, "Chem Station" Agilent Technologies Rev. D.04.00 2002 (Velázquez-Becerra *et al.* 2013). LCL concentrations evaluated were 1, 5, 10, 20, 50, 75, 100 and 150 µg/mL.

2.2. Cell culture

The colon adenocarcinoma cancer cell line Caco-2 (ATCC® HTB-37™) was routinely cultured in Dulbecco's modified Eagle's Medium/nutrient F-12 Ham (Sigma-

Aldrich) supplemented with 10% FBS (Corning), 100 U/mL penicillin and streptomycin (Gibco), and 1 µg/mL amphotericin B (Invitrogen). The Caco-2 cells were grown in 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

2.3. Growth inhibition assay

In order to determine the effect of the avocado LCL molecules on Caco-2 cells viability, 15×10^3 cells were seeded in 96-well microplates (Corning). Cells were synchronized by starvation using medium without supplements for 24 h. Further, cells were treated with various LCL concentrations for a period of 24 and 48 h in 5% CO₂ atmosphere at 37°C. After, 10 µL of a 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma) solution (5mg/mL) was added and incubated for 4 h at 37°C. Finally, conversion of MTT to formazan crystals by metabolically viable cells was measured after they were dissolved with 100 µl of 90% isopropanol and 10% 1N hydrochloric acid (HCl). The absorbance lectures (595 nm) were carried out in a 96-well microtiter plate reader (BIORAD). Cells treated with the vehicle (DMSO 0.1%) were used as negative control and cells treated with Actinomycin D (80 µg/mL, Sigma) were used as positive control of death. The effect was also evaluated by trypan blue assays. For this, cells were treated as indicated above and then collected by trypsin detachment. Cell suspension was mixed 1:1 with trypan blue (Gibco) and total and viable cells were counted with a TC20™ Automated Cell Counter (BIORAD). The percentage of living cells in relation to negative control (DMSO 0.1%) was used to determine de half maximal inhibitory concentration (IC₅₀). Additionally, the viability of Caco-2 cells treated with the IC₅₀ was analyzed by flow cytometry. Briefly, after 24 and 48 h of treatment, cells were obtained by trypsin detachment and washed with PBS (pH 7.4), then stained with propidium iodide (PI) and Syto 9 (Molecules Probes) according to the specifications of the manufacturer. A total of 10,000 events were collected using a BD Accuri™ C6 cytometer (BD Biosciences).

2.4. Apoptosis determination

Caco-2 cells (15×10^3 per well) were cultured in 96-well microplates (Corning-Costar) as described above and incubated with the avocado seed LCL IC₅₀ for 12

and 24 h. Cells were collected by trypsin detachment and washed with PBS (pH 7.4). Cells were stained with Annexin V (Alexa Fluor™ 488 conjugate, Invitrogen) and 7AAD (BioLegend) according to the manufacturer's instructions and incubated for 15 min at room temperature. A total of 10,000 events were collected using a BD Accuri™ C6 cytometer (BD Biosciences) and data were analyzed using the FlowJo Software v. 10.4.2 (TreeStar, Inc.).

The activity of the representative caspases of apoptosis pathways was assessed by luminescence detection assays. For this, the Caco-2 cells (15×10^3) were cultured and treated with the LCL IC_{50} in 96-well white-walled flasks (Thermofisher) with transparent bottom. After 12 and 24 h of treatment, the medium was removed and the caspase-Glo® 8 or caspase-Glo® 9 reagent (Promega) was added, cells were centrifuged at 300-500 rpm for 2 min and then incubated at room temperature for 1 h. The lectures were made in a Varioskan flash reader (Thermofisher). In a parallel experiment, Caco-2 cells were incubated with the caspase inhibitor Z-VAD (50 μ M) for 30 min and then treated with the LCL IC_{50} by 24 h. Finally, a MTS cell viability assay was carried out. Briefly, cells were cultured and treated as described above, after 24 h 20 μ L of MTS was added and incubated for 2-3 h at 37°C, finally the absorbance lectures (490 nm) were carried out in a 96-well microtiter plate reader (BIORAD).

2.5. Estimation of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)

The Caco-2 cells (15×10^3 per well) were cultured in 96-well microplates (Corning-Costar) and treated with the avocado seed LCL IC_{50} for 6 and 12 h. Cells were recovered and stained with JC-1 dye (BD Biosciences) for 15 min at 37°C in the dark. Then, the cells were washed twice with assay buffer. The samples were analyzed (10,000 events) with a BD Accuri™ C6 cytometer (BD Biosciences) and data were analyzed using the FlowJo Software v. 10.4.2 (TreeStar, Inc.).

2.6. Calcium flux assessment

Caco-2 cells (15×10^3 per well) were cultured and synchronized in 100 mm flasks (Corning-Costar) and adjusted at 1×10^5 cells/mL. Then, the cells were resuspended with the 1X signal enhancer (1X calcium assay buffer and 1 mM

probenecid) and with the calcium indicator (1 $\mu\text{L/mL}$) (BD Biosciences) and incubated for 1 h at 37°C. As a positive control, cells were treated with 3 μM phorbol myristate acetate (PMA, Sigma). Cells were analyzed with a BD Accuri™ C6 cytometer (BD Biosciences) for 1 min and when the baseline fluorescence was established, treatments (vehicle and IC₅₀) were added and sampling was carried out for 5 min. Data were analyzed using the FlowJo Software v. 10.4.2 (TreeStar, Inc.).

2.7. ROS detection

Superoxide and mitochondrial ROS production was detected in Caco-2 by flow cytometry. Caco-2 cells were recovered by trypsin detachment (1x10⁵ cells per well) and washed with PBS. Then, cells were stained with DHE (5 μM) or DHR (15 μM) and treated simultaneously with LCL IC₅₀. As positive control the cells were treated with 12% ethanol and the combination of 12% ethanol and the IC₅₀. After a 30 min incubation in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C cells were washed and the samples were analyzed (10,000 events) by flow cytometry.

2.8. Cell cycle analysis

The analysis of the cell cycle of Caco-2 cells treated with the avocado LCL IC₅₀ was made using the BD cycletest Plus DNA kit (BD biosciences) according to the specifications of the manufacturer. Briefly, the cells (5x10⁴ cells per well) were cultured in 24-well plates (Corning-Costar) and were synchronized with DMEM supplemented with heat inactivated fetal bovine serum (10%) for 24 h. Control cells were treated with non-supplemented DMEM medium. The cells were treated for 24 and 48 h with the avocado LCL IC₅₀. Then, the cells were recovered by trypsin detachment and washed with buffer solution. Cells were centrifuged and the supernatant was removed. The solution A was added and incubated for 10 min, then solution B was added and incubated for 10 min. Finally, solution C was added and incubated for 10 min on ice. 20,000 events were analyzed with a BD Accuri™ C6 cytometer (BD Biosciences) and the analysis of the data was carried out with the BD CSampler analysis software (BD Biosciences).

2.9. Fatty acid oxidation (FAO) analysis

The Caco-2 cells were grown in 100 mm flasks (Corning-Costar) in low glucose DMEM media (Life Technologies) supplemented with 10% FBS until confluence. Cells were recovered by trypsin detachment and incubated with Palmitate-BSA (0.1 mM; Seahorse Bioscience) and carnitine (1 mM) for 45 min at 37°C in a 5% CO₂ incubator. Then, the cells (2X10⁶) were washed with PBS and transferred to the Oxygraph-2k for the measurement of oxygen consumption rate (OCR). FAO rate was determined by measuring mitochondrial respiration after the injection of the following: vehicle (0.1% DMSO), the avocado LCL IC₅₀ or Etomoxir (38 µM). Then the following treatments were sequentially performed, oligomycin (100 nM, Millipore), FCCP (74 nM, Sigma Chemical) and rotenone (50 nM, Millipore).

2.10. Cytokines secretion assay

The secretion of cytokines related to the inflammatory response was evaluated by flow cytometry using the CBA Human Inflammatory Cytokines kit (BD Biosciences). For this, cells were cultured in 12 well plates (15X10⁴ cells per well). Cells were treated for 6, 12 and 24 h with the avocado LCL IC₅₀. The supernatants were recovered and 50 µL of the CBAs and 50 µL of the Human inflammatory cytokine PE detection reagent were added and incubated for 3 h at room temperature protected from light. Subsequently, the beads were washed with wash buffer and finally resuspended therein. Samples were taken on a BD Accuri™ C6 cytometer (BD Biosciences), collecting 1,800 events per condition and analyzed with Microsoft Excel (2013).

2.11. Transcriptional analysis (qPCR)

Caco-2 cells (6x10⁴ cells per well) were cultured in 24-well plates and incubated with the avocado LCL IC₅₀ for 24 h. Total RNA was isolated with Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and then used to synthesize cDNA as described (Alva-Murillo *et al.*, 2012). Relative quantification of gene expression was performed using the CT method ($\Delta\Delta$ CT) in a StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. The reactions were carried out with a SYBR green PCR Master Mix

(Applied Biosystems). The genes evaluated are shown in Table 1. β -Actin was used as internal control.

2.12. Statistical analysis

The data were analyzed in the JMP 6 software, performing a one-way analysis of variance (One-way ANOVA) using the Tukey test; values of $P \leq 0.05$ were considered statistically significant. In qPCR analysis fold-change values > 2 or < 0.5 were considered as significantly differentially expressed mRNAs (Báez-Magaña *et al.*, 2018).

3. Results

3.1. Long-chain lipids (LCL) content

The mainly LCL identified in the native Mexican avocado seed are shown in Table 2. The results showed two main groups of lipids: 1) long chain fatty acids, and 2) fatty acid derivatives. The main characteristic of these compounds was the presence of unsaturated chains (77.4%), followed by chains with odd-numbered carbon numbers of 17 and 21 (71%). The most abundant molecules belong to fatty acid derivatives, being avocatin and polyhydroxylated fatty alcohols the most abundant, 29.2 and 21.9%, respectively. Interestingly, within the group of long chain fatty acids, saturated long chain fatty acids were the most abundant (22.6%). The most abundant compound was an acetogenin C17, followed by palmitic acid and persin (data not shown).

3.2. Long-chain lipids are cytotoxic to Caco-2 cells

The cytotoxic effect of LCL from Mexican native avocado seed (1, 5, 10, 20, 50, 75, 100 and 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on Caco-2 cells (24 and 48 h) was assessed by MTT assay. The results showed that after 24 h of incubation, the Caco-2 cell viability decreased when were treated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (39.5%) and 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (76.3%) of LCL (Figure 1a). Cytotoxicity values increased further after 48 h of treatment under the conditions of 75 (59.2%), 100 (72.6%) and 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (79%) (Figure 1b). Interestingly, the rest of the conditions did not show cytotoxic effects at any of the times evaluated. By trypan blue exclusion assays, an IC_{50} of 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LCL was calculated at 48 h of treatment (Fig. 2a, b), which was corroborated by flow

cytometry. Caco-2 cells treated with the IC₅₀ for 24 h showed a decrease in viability of ≈22%, while those treated during 48 h showed a decrease of ≈55% (Fig. 2c). These results demonstrated that the cell viability of cells treated with the IC₅₀ behave as expected.

3.3. Long-chain lipids induces caspase-dependent apoptosis in Caco-2 cells

Once the cytotoxic effect of the LCL extracted from Mexican native avocado seed was established, the mode of cell death induced in Caco-2 cells was determined by flow cytometry. Cells were treated with the LCL IC₅₀ (28 µg/mL) for 12 and 24 h and apoptosis was evaluated. The LCL IC₅₀ treatment increased apoptosis ≈2.5-fold after 12 h, which was similar at 24 h of treatment (≈3.1-fold) (Fig 3a). Interestingly, when the number of cells was counted a significant decrease was observed in relation to the negative control (46%) (Fig. 3b). Further, by luminescence assay we evaluate the activity of caspase-8 and caspase-9, characteristic of the intrinsic and extrinsic pathways, respectively. At 12 h of treatment the activation of both caspases was not detected. However, Caco-2 cells subject to treatments by 24 h showed an activation of caspase-8 (3-fold) and caspase-9 (5.6-fold) (Fig. 4a, b). The apoptosis induced by the LCL IC₅₀ in Caco-2 cells was inhibited by the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK, showing a caspase-dependent induction of apoptosis (Fig. 4c).

3.4. The apoptotic effect of LCL from avocado in Caco-2 cells is associated with damage to the mitochondria due to ROS production

Once established the apoptotic effect of the avocado seed LCL on Caco-2 cells, flow cytometry assays were performed to determine if it affects the mitochondrial functionality. Figure 5 shows that since the 6 h of treatment there is an increase in the loss of mitochondrial membrane potential (58.2%) in cells treated with the LCL IC₅₀, unlike those without treatment (25%) or those treated with the vehicle only (21.2%). This effect was higher at 12 h of treatment (68.2%). Next, we evaluated if LCL modify the levels of intracellular calcium. Figure 6 shows that neither the vehicle (0.1% DMSO) nor the LCL IC₅₀ modifies the intracellular calcium levels in Caco-2 cells.

Because the induction of apoptosis is usually correlated with the activity of ROS, the production of these molecules was evaluated by flow cytometry. The results showed that after 30 min of treatment the LCL IC₅₀ induced a 36% increase in the generation of superoxide anion (O₂⁻) compared to the vehicle, data similar to those obtained with the control positive of ethanol 12% (33%). Likewise, the generation of mitochondrial specific ROS was evaluated, cells treated with the LCL IC₅₀ increased ≈52% the ROS production, unlike those incubated with the vehicle (Fig. 7).

3.5. Long-chain lipids induce cell cycle arrest in Caco-2 cells

In order to know if the avocado LCL IC₅₀ affect cell proliferation, we evaluate the cell cycle progress of Caco-2 cells. In Figure 8, we showed that the extract increased the G₀/G₁ phase cell number after 24 h of treatment, which was higher (16.8%) in relation to the negative control [cells treated with DMEM + FBS (HI)]. The values of cells treated with the LCL IC₅₀ in the G₀/G₁ phase (59.2%) were similar to those cells cultured with the positive control (64.3%). As expected, the treatment with ActD arrested the cells in the G₂/M phase of the cell cycle (46%). Additionally, qPCR assays showed that LCL IC₅₀ induced the expression of important genes for the prognosis of patients with colon cancer as p21 and cyclin D1 (Fig. 9).

3.6. Long-chain lipids inhibit fatty acid oxidation (FAO)

The lipid metabolism is a process that is usually altered in different types of cancer, providing intermediaries related to signaling, biosynthesis and energy storage. The therapeutic strategy to inhibit the proliferation of cancer cells has been established by limiting the lipids metabolism at different levels. In this work, the effect of LCL IC₅₀ on the oxidation of fatty acids was evaluated by high resolution respirometry. NADH and FADH are generated as a result of FAO, which feed complexes I and II of the respiratory chain. Thus, an increase in oxygen consumption is understood as an increase in FAO. In this sense, we observed that the LCL IC₅₀ decreased cellular respiration in Caco-2 cells, which is the consequence of FAO inhibition by 45%, similar data to the cells treated with ranozaline (40%) (Fig. 10).

3.7. Long-chain lipids modulate the expression of inflammatory cytokines

It is known the role played by inflammation in the onset and progression of colon cancer. Recently, the search for immunoregulatory molecules that modulate the inflammatory response in the tumor microenvironment has increased. Therefore, the effect of LCL IC₅₀ on the cytokines secreted by Caco-2 cells was evaluated by flow cytometry (Table 3). The results obtained showed a time-dependent increase of interleukin-6 (IL-6) secreted since 6 h of treatment, reaching a maximum point at 24 h (33.07 pg/mL), compared with cells treated with 0.1% DMSO (6.01 pg/m). On the other hand, unlike the control cells, it was detected an increase of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (IL-10) in all of the times evaluated in cells treated with the LCL IC₅₀ (1.25, 0.72 and 1.61 pg/mL at 6, 12 and 24 h, respectively). Additionally, interleukin-1 β (IL- β) was detected only at 6 h in Caco-2 cells, with a decrease close to 50% in cells treated with LCL. Finally, the chemokine interleukin-8 (IL-8) was secreted at all of the times evaluated with values of 4.68, 2.37 and 4.32 pg/mL at 6, 12 and 24 h, respectively, in contrast to the cells treated only with the vehicle (DMSO 0.1%), which did not secreted IL-8 at any time analyzed.

4. Discussion

Mexico is the principal avocado producer worldwide (Barrientos, 2010, SAGARPA, 2015). Lipid components from avocado seed possess important anticancer activities (Ding *et al.*, 2007). From the three varieties of avocado, the Mexican native variety (*P. americana* var. *drymifolia*) has the higher oil content 20-30% (Baraona & Sancho, 2000). Therefore, the study of lipid molecules from seed of Mexican native avocado it is interesting due the anticancer potential that it represents.

As previously stated in this work, the long-chain lipids (LCL) from avocado seed have cytotoxic activities; however, there are different lipid proportions in the seed and the pulp. In a study carried out by Rodríguez-López *et al* (2015), where the acetogenin profiles of 22 avocado cultivars were evaluated, they report a considerably higher proportion of persin in the pulp compared to the seed. This acetogenin causes necrosis/apoptosis in normal cells, tissue modification and decrease the milk production in mammary glands of suckling mice (Butt *et al.*, 2006; Oelrichs *et al.*, 1995). In contrast, high proportions of avocatinins were reported in the

avocado seed, which are selective towards cancer cells, such as avocatin B, which is cytotoxic towards myeloid leukemia cells (Lee *et al.*, 2015). Also, the acetogenins 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-heptadec-16-ene and 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-heptadec-16-ino from avocado seed have selectivity towards oral cancer cells (Ding *et al.*, 2007). In this sense, in the seed lipid extract from Mexican native avocado we found a high percentage of avocatinins and polyhydroxylated fatty alcohols (29.2 and 21.9%, respectively), and to a lesser extent, more toxic and less selective compounds such as persenins (9.2%) (Table 2). Also, the cytotoxicity of the lipid molecules from Mexican native avocado seed on Caco-2 cells was analyzed. The results showed a concentration-dependent cell viability inhibition (Fig. 1 and 2). The cytotoxic effect of this group of molecules has been associated with the length of the aliphatic chain and the presence of the β -hydroxyl group (Brooke *et al.*, 2011).

The cell cycle arrest in the G0/G1 phase in Caco-2 cells was induced by LCL at 24 h of treatment (Fig. 8), which could be due to the increase of the expression of cell cycle regulatory molecules such as cyclin D1 and p21 (Fig. 9). Interestingly, high levels of transcription of p21 and cyclin D1 have been associated with low recidivism rates in CRC patients (Belt *et al.*, 2012). In agreement, avocatin B induces cell cycle arrest in the G0/G1 phase in leukemia cells; however, the mechanism responsible for this effect was not analyzed (Lee *et al.*, 2015). Other reports have shown a different effect, persin induces G2/M cell cycle arrest of different breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-231 and T-47D), down-regulating the expression of cyclin A, D1 and B1 and up-regulating p21 and p27 expression (Butt *et al.*, 2006). In contrast, another mechanism related to the modulation of the cell cycle has been studied, where two 17-carbon avocado acetogenins obtained from the mesocarp act synergistically to inhibit the proliferation of oral cancer cells 83-01-82CA, decreasing the expression and phosphorylation of the components of the EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK1/2 pathway (D'Ambrosio *et al.*, 2011).

In this study, LCL induces apoptosis in Caco-2 cells (Fig. 3) through a mechanism dependent of caspases 8 and 9 (Fig. 4). The activation of the two apoptotic pathways (extrinsic and intrinsic) simultaneously has already been reported by other working groups in oral (Ding *et al.*, 2009) and breast cancer cells

(Butt *et al.*, 2006); however, this effect had been related to oxidative stress and damage to the cytoskeleton, respectively. There is evidence that this group of compounds can enter the mitochondria through carnitine transporters, being this organelle their main target (Lee *et al.*, 2015). It is known that the mitochondria has a fundamental role in the activation of caspase 9, in this process it is essential the permeabilization of the external mitochondrial membrane, that is triggered by different stimuli such as oxidative stress, changes in ionic fluxes, hypotonicity, among others; which lead to release of pro-apoptotic molecules such as AIF, cytochrome c and Smac/DIABLO (Gogvadze *et al.*, 2006). For this reason, once the cytotoxic effect on colon cancer cells was determined, we analyzed the effects on the Caco-2 cells mitochondria. The results showed that Caco-2 cells treated with the avocado LCL (IC₅₀ 28 µg/mL) for 6 and 12 h were affected in their mitochondrial membrane potential 58.2% and 68.2%, respectively (Fig. 5). In agreement, anticancer activity of fatty acids has been associated to a direct effect on the mitochondria; for example, palmitic acid, a saturated fatty acid, or the unsaturated eicosapentaenoic acid, cause oxidative stress and loss of mitochondrial potential, eventually inducing apoptosis (Murray *et al.*, 2014), a phenomenon that has been observed in fatty acid derivatives capable of inducing the loss of mitochondrial potential in oral cancer cells (Ding *et al.*, 2009). However, further studies are necessary to demonstrate that avocado LCL could be transported inside Caco-2 mitochondria.

The accumulation of intracellular calcium levels, caused by the release from the endoplasmic reticulum, can induce depolarization of the mitochondrial membrane and facilitate the activation of pro-apoptotic proteins such as caspases, Bax, Bak and Bad (Breckenridge *et al.*, 2003). Fatty acids can interact with different receptors, including G-protein coupled receptors, specifically GPR40 and GPR120 and consequently activate the signaling pathway of phosphatidyl-inositol and thus the release of calcium from the endoplasmic reticulum (Gu *et al.*, 2013). Additionally, acetogenins belonging to the Annonaceae family (squamosatin A, squamocin M and corosolone) induce cell cycle arrest G2/M and apoptosis caused by the increase and accumulation of cytosolic calcium (Juang *et al.*, 2016). Moreover, in

liver cancer cells treated with acetogenins from annonaceous for 12 h, calcium was released from the mitochondria to the cytosol through pores formed in the mitochondria (Pedro *et al.*, 2013). Unlike these studies, the evaluations performed in this work on Caco-2 colon cancer cells showed that avocado LCL did not modify the intracellular calcium levels (Fig. 6). An explanation for this discrepancy is that our evaluations were made at a short period of treatment (5 min). Further experiments at longer periods are necessary to establish if avocado LCL affect the intracellular calcium levels. However, in human squamous cell carcinoma cells treated with the isocyanoacetic acid acetogenin isodesacetilivaricin for 24 and 48 h, intracellular calcium levels were not modified (Chang & Chang, 2012).

Oxidative stress can generate the loss of mitochondrial stability and the subsequent cell death (Marchi *et al.*, 2012). Avocado LCL induced a considerable ROS increase in the Caco-2 cells (Fig. 7). In agreement, saturated fatty acids such as palmitic acid and stearic acid have a pro-apoptotic effect generating direct changes in the mitochondria and thus the generation of oxidative stress, causing DNA damage and the loss of mitochondrial potential (Hardy *et al.*, 2003). However, linolenic acid and linoleic acid (unsaturated fatty acids) protect by neutralizing oxidative stress (Beeharry *et al.*, 2003). In the case of some acetogenins, the high production of ROS is also related to the induction of cell death (Ding *et al.*, 2009).

The ROS production and metabolism are closely related (Panieri & Santoro, 2016). In this work, we related the significant increase in ROS with the decrease in FAO rate in Caco-2 cells (Fig. 10). These alterations in the mitochondria are associated with the accumulation of LCL due to the transport of CPT1 (Lee *et al.*, 2015). In the avocado LCL, unsaturated long chain lipids (77.4%) as well as odd molecules (71%) are majority (Table 2), it has been reported that the speed of entry of LCL to the cell is very similar; however, those unsaturated are metabolized to a considerably lower rate according to the degree of unsaturation (Colquhoun & Curi, 1997; Leyton *et al.*, 1987). This process would significantly decrease the metabolic activity, producing a lower amount of ATP, NADPH and NADH, which would contribute to oxidative stress (Lee *et al.*, 2015). Additionally, it has been demonstrated that odd carbon number fatty acids are preferentially accumulated

than those with even carbon numbers (Gotoh *et al.*, 2008). In this sense, high amounts of lipids in the mitochondria could represent lipotoxicity that compromises cellular homeostasis. The mitochondrial production of hydroxyl radicals favors the formation of radical lipids, molecules susceptible to peroxidation that result in reactive compounds called lipid aldehydes and in modifications of the membrane structure that alter their permeability and fluidity (Hauck & Bernlohr, 2016). Additionally, cardiolipin, an important molecule in the induction of apoptosis, is susceptible to peroxidation and therefore to the release of cytochrome c (Zhong *et al.*, 2017). Finally, the accumulation of these molecules attacks proteins and DNA (Marchi *et al.*, 2012).

In the CRC there are different altered metabolic pathways as glycolysis, bile acid and fatty acid metabolism, the latter is the most influential in the development of CRC, which has an impact on cell proliferation (Yeh *et al.*, 2006). For this reason, we evaluated the metabolic rate of FAO. It was observed that LCL decrease the rate of FAO up to 45% in Caco-2 cells. In agreement, it has been associated to the apoptotic effect of avocatin B in leukemia cells with the inhibition of the FAO (Lee *et al.*, 2015). In the case of breast cancer cells, the inhibition of fatty acid synthesis generates an increase in the pool of malonyl-CoA, a strong inhibitor of FAO, which together has a cytotoxic effect (Jagan *et al.*, 2001). In this sense, the inhibition of FAO is already considered a strategy against breast cancer cells with metabolic alterations that over-express the proto-oncogene *MYC* (Camarda *et al.*, 2016). Thus, in the future the inhibition of FAO could be considered as an option for the treatment of CRC.

The study of the participation of cytokines in the initiation and development of CRC has attracted attention, because they can block or favor the presentation of tumor antigens, the expression of adhesion molecules, the activity of lymphocytes associated with the tumor, angiogenesis and cell proliferation (Csiszár *et al.*, 2004). It has been reported that interleukin-6 (IL-6) is overexpressed in CRC tissue by about 200% compared to normal tissue (Malicki *et al.*, 2009). This cytokine is involved in the progression of colorectal cancer because activates STAT3 and triggers processes related to immune function, proliferation, differentiation and angiogenesis,

as well as participating in the loss of microsatellite stability and evasion of apoptosis (West *et al.*, 2015). The IL-6 levels of 101 patients with primary or metastatic tumors of colorectal cancer showed in the serum an average concentration of 13.7 pg/mL, and the mortality increased when the expression of interleukin was equal or greater than 4.3 pg/mL (Hara *et al.*, 2016). In this study, we observed that the LCL induced an increase in the secretion of IL-6, having a maximum point at 24 h of 33.07 pg/mL (Table 3). However, a dual role has been described for this cytokine, in which it elicits favorable antitumor responses, promoting the proliferation and survival of T cells, as well as its infiltration to lymph nodes and mobilization towards tumors (Fisher *et al.*, 2014). In addition, IL-6 induces the expression of the intestinal fatty acid binding protein (I-FABP), which favors the entry of long-chain fatty acids, and in Caco-2 cells would allow a better effect of the LCL (Delvin *et al.*, 2001).

On the other hand, an over-expression of interleukin-1 β (IL-1 β) has been reported in tissue of patients with CRC, about twice as much as in normal tissue and a directly proportional relationship has been found between its expression, that of cyclooxygenase-2 (COX-2) and that of IL-6 (Csiszár *et al.*, 2004; Maihõfner *et al.*, 2003). IL-1 β serum concentration of patients with CRC is close to 1.44 pg/mL (Szkaradkiewicz *et al.*, 2009). It has been attributed a role that favors the proliferation of tumor cells and facilitates metastasis through the induction of angiogenin and metalloproteases, besides activating the transcription factor NF- κ B and the Wnt signaling pathway (Mager *et al.*, 2016; Maihõfner *et al.*, 2003). Interestingly, IL-1 β was only detected after 6 h of treatment, and LCL generated a decreased of the secretion by about 50% in Caco-2 cells (Table 3).

Regarding interleukin 10 (IL-10), Caco-2 cells secreted 1.25, 0.72 and 1.61 pg/mL at 6, 12 and 24 h, respectively (Table 3). Contradictory data on IL-10 in CRC have been reported. On one hand, the IL-10 overexpression found in CRC patients presents a poor prognosis, because it favors the proliferation of tumor cells and an immunosuppression of the antitumor response with 1.99 pg/mL (Stanilov *et al.*, 2010) compared to healthy patients who presented 1.35 pg/mL (Szkaradkiewicz *et al.*, 2009). On the other hand, IL-10 decreases the inflammatory and increases the antitumor response, required for the activation of regulatory T cells and thus

decreasing the size of tumors in mice deficient in *APC* gene, in the absence of this cytokine the mice developed more polyps and were more susceptible to sporadic tumors development. More studies are needed to know the relevance of IL-10 and its implications in the development of CRC.

In the case of interleukin-8 (IL-8), an increase (400%) in the expression of the mRNA has been observed in CRC compared to normal tissue, with an average of 29.3 pg/mL in serum (Malicki *et al.*, 2009). In this work, LCL up-regulated the secretion of IL-8 up to 4.68 pg/mL at 6 h of treatment (Table 3). Altogether, LCL had a modulating effect on the inflammatory response on Caco-2 cells; however, the modulation in these cells has not been described; but it is hypothesized that they could function as epigenetic regulators (Fauser *et al.*, 2011) or interacting through the PPAR fatty acid receptors that modulate the activation of transcription factors such as NF- κ B, STAT1 and HIF-1 (Carter *et al.*, 2009).

Finally, the following action model of these molecules is presented on Caco-2 colon adenocarcinoma cells (Fig. 11).

5. Concluding remarks

Altogether, in the present study we established the cytotoxic effect of the long-chain lipids extracted from Mexican native avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) towards Caco-2 colon cancer cells, arresting the cells in the G0/G1 phase and inducing caspase-dependent apoptosis through metabolic changes. In addition, these molecules modulate the expression of cytokines related to the inflammatory response.

6. References

- Adeyemi, O. O., Okpo, S. O., & Ogunti, O. O. (2002). Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill. (Laureceae). *Fitoterapia*, 73(5), 375–380.
- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2016). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4), 683-691 <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912>

- Aung, T. N., Qu, Z., Kortschak, R. D., & Adelson, D. L. (2017). Understanding the effectiveness of natural compound mixtures in cancer through their molecular mode of action. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3). <https://doi.org/10.3390/ijms18030656>
- Baraona, C. M. and Sancho, B. E. (2000). Aguacate y mango. *Fruticultura especial*. Editorial Universidad Estatal a distancia.
- Barrientos, P. A. F. (2010). El aguacate. *Biodiversitas*, 88, 1–7.
- Beeharry, N., Lowe, J. E., Hernandez, A. R., Chambers, J. a, Fucassi, F., Cragg, P. J. and Green, I. C. (2003). Linoleic acid and antioxidants protect against DNA damage and apoptosis induced by palmitic acid. *Mutation Research*, 530(1–2), 27–33. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(03\)00134-9](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(03)00134-9)
- Belt, E.J., Brosens, R. P. M., Delis-van Diemen, P, Bril, H., Tijssen, M., van Essen, D. F., Heymans, M. W., Belien, J. A. M., Stockmann, H., Meijer, S. and Meijer, G. (2012). Cell cycle proteins predict recurrence in Stage II and III colon cancer. *Annual Surgical Oncology*. 19:S682-S692. DOI 10.1245/s10434-012-2216-7
- Bora, S.P., Narain, N., Rocha R.V.M., P. M. Q., Bora, P. S., Narain, N., Rocha, R. V. M. and Queiroz Paulo, M. (2001). Characterization of the oils from the pulp and seeds of avocado (cultivar: Fuerte) fruits. *Grasas y Aceites*, 52(3–4), 171–174. <https://doi.org/10.3989/gya.2001.v52.i3-4.353>
- Braun, M. S. and Seymour, M. T. (2011). Balancing the efficacy and toxicity of chemotherapy in colorectal cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 3(1), 43–52. <https://doi.org/10.1177/1758834010388342>
- Breckenridge, D. G., Germain, M., Mathai, J. P., Nguyen, M. and Shore, G. C. (2003). Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*, 22, 8608–8618. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207108>
- Brooke, D. G., Shelley, E. J., Roberts, C. G., Denny, W. A., Sutherland, R. L. and Butt, A. J. (2011). Synthesis and *in vitro* evaluation of analogues of avocado-

- produced toxin (+)-(R)-persin in human breast cancer cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19(23), 7033–7043. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.10.006>
- Butt, A. J., Roberts, C. G., Seawright, A. a, Oelrichs, P. B., Macleod, J. K., Liaw, T. Y. E. and Sutherland, R. L. (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. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0170>
- Camarda, R., Zhou, Z., Kohnz, R., Balakrishnan, S., Mahieu, C., Anderton, B. and Goga, A. (2016). Inhibition of fatty acid oxidation as a therapy for MYC-overexpressing triple-negative breast cancer. *National Medicine*, 22(4), 427–432. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.007.Mapping>
- Chang, F. and Chang, W. (2012). Isodesacetylurvaricin, an annonaceous acetogenin, specifically inhibits gene expression of cyclooxygenase-2. *Journal of Natural Products*, 75, 572–576. <https://doi.org/10.1021/np200719r>
- Colquhoun, A. and Curi, R. (1997). Metabolic fate and effects of saturated and unsaturated fatty acids in Hep2 human larynx tumor cells. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 41(3), 597–607.
- Csiszár, A., Szentes, T., Haraszi, B., Balázs, A. and Petrányi, G. (2004). The pattern of cytokine gene expression in human colorectal carcinoma. *Pathology Oncology Research*, 10(2), 109–116. <https://doi.org/PAOR.2004.10.2.0109>
- D'Ambrosio, S. M., Han, C., Pan, L., Douglas Kinghorn, A., Ding, H., Kinghorn, A. and 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. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.027>
- Delvin, E., Yotov, W., Garofalo, C., Bendayan, M., Veerkamp, J. H., Levy, E. and Ht, C. (2001). Modulation of intestinal and liver fatty acid-binding proteins in

- Caco-2 cells by lipids, hormones and cytokines. *Journal of Cellular Biochemistry*, 81, 613–620.
- Ding, H., Chin, Y. W., Kinghorn, A. D., Ambrosio, S. M. D. and D'Ambrosio, S. M. (2007). Chemopreventive characteristics of avocado fruit. *Seminars in Cancer Biology*, 17(5), 386–394. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2007.04.003>
- Ding, H., Han, C., Guo, D., Chin, Y.-W., Ding, Y., Kinghorn, D. and D'Ambrosio, S. M. (2009). Selective induction of apoptosis of human oral cancer cell lines by avocado extracts via a ROS-mediated mechanism. *Nutrition and Cancer*, 61(3), 348–56. <https://doi.org/10.1080/01635580802567158>
- Fausser, J. K., Prisciandaro, L. D., Cummins, A. G. and Gordon, S. (2011). Fatty acids as potential adjunctive colorectal chemotherapeutic agents. *Cancer Biology & Therapy*, 11(8), 724–731. <https://doi.org/10.4161/cbt.11.8.15281>
- Fisher, D. T., Appenheimer, M. M. and Evans, S. S. (2014). The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Seminars in Immunology*, 26(1), 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.01.008>
- Folaranmi, O. M. (2014). Effect of liquid extract of pear avocado leaf (*Persea americana*) on plasma levels of aminotransferases, cholesterol and total bile acids in hypertensive patients. *International Journal of Composite Materials*, 4(3), 87–91. <https://doi.org/10.5923/j.ajmms.20140403.01>
- GLOBOCAN. (2012). Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Retrieved from <http://globocan.iarc.fr/Pages/online.aspx>
- Gogvadze, V., Orrenius, S. and Zhivotovsky, B. (2006). Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1757, 639–647. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2006.03.016>
- Gorinstein, S., Haruenkit, R., Poovarodom, S., Vearasilp, S., Ruamsuke, P., Namiesnik, J. and Ping, S. G. (2010). Some analytical assays for the

- determination of bioactivity of exotic fruits. *Phytochemical Analysis*, 21, 355–362.
- Gotoh, N., Moroda, K., Watanabe, H., Yoshinaga, K., Tanaka, M., Ichioka, K. and Wada, S. (2008). Metabolism of odd-numbered fatty acids and even-numbered fatty acids in mouse. *Biochemistry and Biotechnology*, 57(5), 293–299. <https://doi.org/10.5650/jos.57.293>
- Gu, Z., Suburu, J., Chen, H. and Chen, Y. Q. (2013). Mechanisms of Omega-3 polyunsaturated fatty acids in prostate cancer prevention. *BioMed Research International*, 2013, 1–10.
- Hara, M., Nagasaki, T., Shiga, K. and Takahashi, H. (2016). High serum levels of interleukin IL-6 in patients with advanced or metastatic colorectal cancer : the effect on the outcome and the response to chemotherapy plus bevacizumab. *Surgery Today*, 47(4). <https://doi.org/10.1007/s00595-016-1404-7>
- Hardy, S., El-Assaad, W., Przybytkowski, E., Joly, E., Prentki, M. and Langelier, Y. (2003). Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. A role for cardiolipin. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(34), 31861–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300190200>
- Hauck, A. K. and Bernlohr, D. A. (2016). Oxidative stress and lipotoxicity. *Journal of Lipid Research*, 57(11), 1976–1986. <https://doi.org/10.1194/jlr.R066597>
- Johnson, I. T. (2007). Phytochemicals and cancer. *Proceedings of the Nutrition Society*, (66), 207–215. <https://doi.org/10.1017/S0029665107005459>
- Juang, S., Chiang, C., Liang, F., Chan, H., Yang, J., Thi, B., Wu, T. (2016). Mechanistic study of Tetrahydrofuran-acetogenins in triggering endoplasmic reticulum stress response-apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma. *Nature Publishing Group*, 6, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep39251>
- Lee, E. A., Angka, L., Rota, S. G., Hanlon, T., Hurren, R., Wang, X. M. and Spagnuolo, P. A. (2015). Targeting mitochondria with Avocatin B induces

- selective leukemia cell death. *Cancer Research*, 75(12), 2378–88. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2676>
- Leyton, J., Drury, P. J. and Crawford, M. A. (1987). Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids in vivo in the rat. *The British Journal of Nutrition*, 57(3), 383–393. <https://doi.org/10.1079/BJN19870046>
- Llor, X., Pons, E., Roca, A., Alvarez, M., Mañé, J., Fernández-Bañares, F. and Gassull, M. a. (2003). The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 22(1), 71–79. <https://doi.org/10.1054/clnu.2002.0627>
- Longley, D. B. and Johnston, P. G. (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *Journal of Pathology*, 205, 275–292. <https://doi.org/10.1002/path.1706>
- Mager, L. F., Wasmer, M., Rau, T. T., Krebs, P. and Krebs, P. (2016). Cytokine-induced modulation of colorectal cancer. *Frontiers in Oncology*, 6(April), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00096>
- Maihöfner, C., Panayiotou, M., Bhambra, U., Lightfoot, T., Geisslinger, G. and Gooderham, N. J. (2003). Expression of cyclooxygenase-2 parallels expression of interleukin-1beta, interleukin-6 and NF-kappaB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 24(4), 665–671. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg006>
- Malicki, S., Winiarski, M., Matlok, M., Kostarczyk, W., Guzdek, A. and Konturek, P. C. (2009). IL-6 and IL-8 responses of colorectal cancer in vivo and in vitro cancer cells subjected to simvastatin. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 60(4), 141–146.
- Marchi, S., Giorgi, C., Suski, J., Agnoletto, C., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., Missiroli, S., Patergnani, S., Poletti, F., Rimessi, A., Duszynski, J., Wieckowski, M. and Pinton, R. (2012). Mitochondria-Ros croostalk in the control of cell death and aging. *Journal of Signal Transduction*, 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/329635>

- McCloy, R. a, Shelley, E. J., Roberts, C. G., Boslem, E., Biden, T. J., Nicholson, R. I., Butt, a J. (2013). Role of endoplasmic reticulum stress induction by the plant toxin, persin, in overcoming resistance to the apoptotic effects of tamoxifen in human breast cancer cells. *British Journal of Cancer*, 109(12), 3034–41. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.693>
- Murray, M., Ryadi, H., Dyari, E., Allison, S. E. and Rawling, T. (2014). Lipid analogues as potential drugs for the regulation of mitochondrial cell death. *British Journal of Pharmacology*, 171, 2051–2066. <https://doi.org/10.1111/bph.12417>
- Oelrichs, P. B., Ng, J. C., Seawright, A. A., Ward, A., Schäffeler, L. and Macleod, J. K. (1995). Isolation and identification of a compound from avocado (*Persea americana*) leaves which causes necrosis of the acinar epithelium of the lactating mammary gland and the myocardium. *Natural Toxins*, 3,344–349.
- Oliveira, A. P. De, Franco, E. D. S., Barreto, R. R., Cordeiro, D. P., Melo, R. G. De, Maria, C. and Maia, D. S. (2013). Effect of semisolid formulation of *Persea Americana* Mill. (avocado) oil on wound healing in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2013.
- Ortiz-Avila, O., Esquivel-Martínez, M., Olmos-Orizaba, B. E. Saavedra-Molina, A., Rodríguez-Orozco, A. R. and Cortés-Rojo, C. (2015). Avocado oil improves mitochondrial function and decreases oxidative stress in brain of diabetic rats. *Journal Diabetes Reseach*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/485759>
- Ortiz-Avila, O., Sámano-García, C. A., Calderón-Cortés, E., Pérez-Hernández, I. H., Mejía-Zepeda, R., Rodríguez-Orozco, A. R. and Cortés-Rojo, C. (2013). Dietary avocado oil supplementation attenuates the alterations induced by type I diabetes and oxidative stress in electron transfer at the complex II-complex III segment of the electron transport chain in rat kidney mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 45(3), 271–287. <https://doi.org/10.1007/s10863-013-9502-3>

- Pedro, N. De, Cautain, B., Melguizo, A., Vicente, F., Genilloud, O., Peláez, F. and Tormo, J. R. (2013). Mitochondrial complex I inhibitors, acetogenins, induce HepG2 cell death through the induction of the complete apoptotic mitochondrial pathway OH OH. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 45, 153–164. <https://doi.org/10.1007/s10863-012-9489-1>
- Panieri, E. and Santoro, M. M. (2016). ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cáncer cells. *Cell Death & Disease*. 7, e2253; <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.105>
- Rodríguez-López, C. E., Hernández-Brenes, C. and Días de la Garza, R. (2015). A targeted metabolomics approach to characterize acetogenin profiles in avocado fruit (*Persea americana* Mill.). *Royal Society of Chemistry*, 5, 106019–106029. <https://doi.org/10.1039/C5RA22854A>
- Rodríguez-Saona, C. (2000). Biologically active aliphatic acetogenins from sspecialized idioblast oil cells. *Current Organic Chemistry*, 4(1249–1260).
- Rosenblat, G., Meretski, S., Segal, J., Tarshis, M., Schroeder, A., Zanin-Zhorov, A. and 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(4), 239–246. <https://doi.org/10.1007/s00403-010-1088-6>
- SAGARPA. (2015). Michoacán aporta el 85.9% del aguacate en el país. Retrieved from:<http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/michoacan/boletines/Paginas/B0342015.aspx>
- Stanilov, N., Miteva, L., Deliysky, T. and Jovchev, J. (2010). Advanced colorectal cancer is associated with enhanced IL-23 and IL-10 serum levels. *Science*, 41(3), 159–163. <https://doi.org/10.1309/LM7T43AQZIUPIOWZ>
- Szkaradkiewicz, A., Marciniak, R., Strugała, I. C., Wasilewska, A., Drews, M., Majewski, P. and Zwoździak, B. (2009). Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients. *Archivum*

Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 57, 291–294.
<https://doi.org/10.1007/s00005-009-0031-z>

Thupari, J. N., Pinn, M. L. and Kuhajda, F. P. (2001). Fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells leads to malonyl-CoA-induced inhibition of fatty acid oxidation and cytotoxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(2), 217–223. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5146>

Toro-Equihua, M. Del, Velasco-rodri, R. and Clemente, V. (2016). Effect of an avocado oil-enhanced diet (*Persea americana*) on sucrose-induced insulin resistance in Wistar rats. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24, 350–357. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.11.005>

USDA, (2011). Avocado, almond, pistachio and walnut composition. USDA National Nutrient Database for Standard Reference.

Wang, H., Oo Khor, T., Shu, L., Su, Z.-Y., Fuentes, F., Lee, J.-H., nadTony Kong, A.N. (2012). Plants vs. cancer: A review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 12(10), 1281–1305. <https://doi.org/10.2174/187152012803833026>

West, N. R., Mccuaig, S., Franchini, F. and Powrie, F. (2015). Emerging cytokine networks in colorectal cancer. *Nature Reviews Immunology*, 15, 615–629. <https://doi.org/10.1038/nri3896>

Wiela-Hojeńska, A., Kowalska, T., Filipczyk-Cisarż, E., Łapiński, Ł. and Nartowski, K. (2015). Evaluation of the toxicity of anticancer chemotherapy in patients with colon cancer. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 24(1), 103–111. <https://doi.org/10.17219/acem/38154>

Yeh, C. S., Wang, J. Y., Cheng, T. L., Juan, C. H., Wu, C. H. and Lin, S. R. (2006). Fatty acid metabolism pathway play an important role in carcinogenesis of human colorectal cancers by Microarray-Bioinformatics analysis. *Cancer Letters*, 233(2), 297–308. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.03.050>

Zhong, H., Xiao, M., Zarkovic, K., Zhu, M., Sa, R., Lu, J., Tao, Y., Chen, Q., Xia, L., Cheng, S., Waeg, G., Zarkovic, N. and Yin, H. (2017). Mitochondrial control of apoptosis through modulation of cardiolipin oxidation in hepatocellular carcinoma: A novel link between oxidative stress and cancer. *Free Radical Biology & Medicine*, 102, 67-76. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.494>.

7. Tables and figures

Table 1. Sequences of primers used in this study.

Gene	Sequence	Tm (°C)	Product size
p21	F- GCAGACCAGCATGACAGATTT	55	70
	R- GGATTAGGGCTTCCTCTTGGA		
Cyclin D1	F- TGCATCTACACCGACAACCTCCATC	58	230
	R-TTTGCGGAGATCTGTTTGTTC		
β-actin	F- AAAACCTAACTTGCGCAGAAAACA	58	317
	R- TGTCACCTTCACCGTTCCACTTT		

Table 2. Long chain lipids content of Mexican native avocado seed.

Group	Compound	µg/g of extract	Percentage
Fatty acid derivatives	Avocatins	32.28	29.2
	Persenins	10.12	9.2
	Pahuatins	4.26	3.9
	Polyhydroxylated fatty alcohols	24.26	21.9
Long-chain fatty acids	Saturated	24.96	22.6
	Unsaturated	14.7	13.3

Table 3. Interleukins secreted by Caco-2 cells treated with the Mexican native avocado seed long-chain lipids.

Interleukin	Condition	6 h	12 h	24 h
IL-10	Vehicle	ND	ND	ND
	IC ₅₀ (28 µg/mL)	1.25 ± 0.56 ^a	0.72 ± 0.28 ^a	1.61 ± 0.7 ^a
IL-6	Vehicle	4.58 ± 1.22 ^b	5.43 ± 1.67 ^b	6.01 ± 1.14 ^b
	IC ₅₀ (28 µg/mL)	15.94 ± 7.3 ^{ab}	24.52 ± 10.17 ^{ab}	33.07 ± 19.8 ^a
IL-1β	Vehicle	0.53 ± 0.12 ^a	ND	ND
	IC ₅₀ (28 µg/mL)	0.3 ± 0.6 ^b	ND	ND
IL-8	Vehicle	ND	ND	ND
	IC ₅₀ (28 µg/mL)	4.68 ± 0.8 ^a	2.37 ± 0.39 ^a	4.32 ± 0.75 ^a

The data represent the mean ±SD (n=3). ANOVA with Tukey's multiple comparisons was used. Different letters represent significant difference in each group tested independently (p<0.05). ND=non-detected

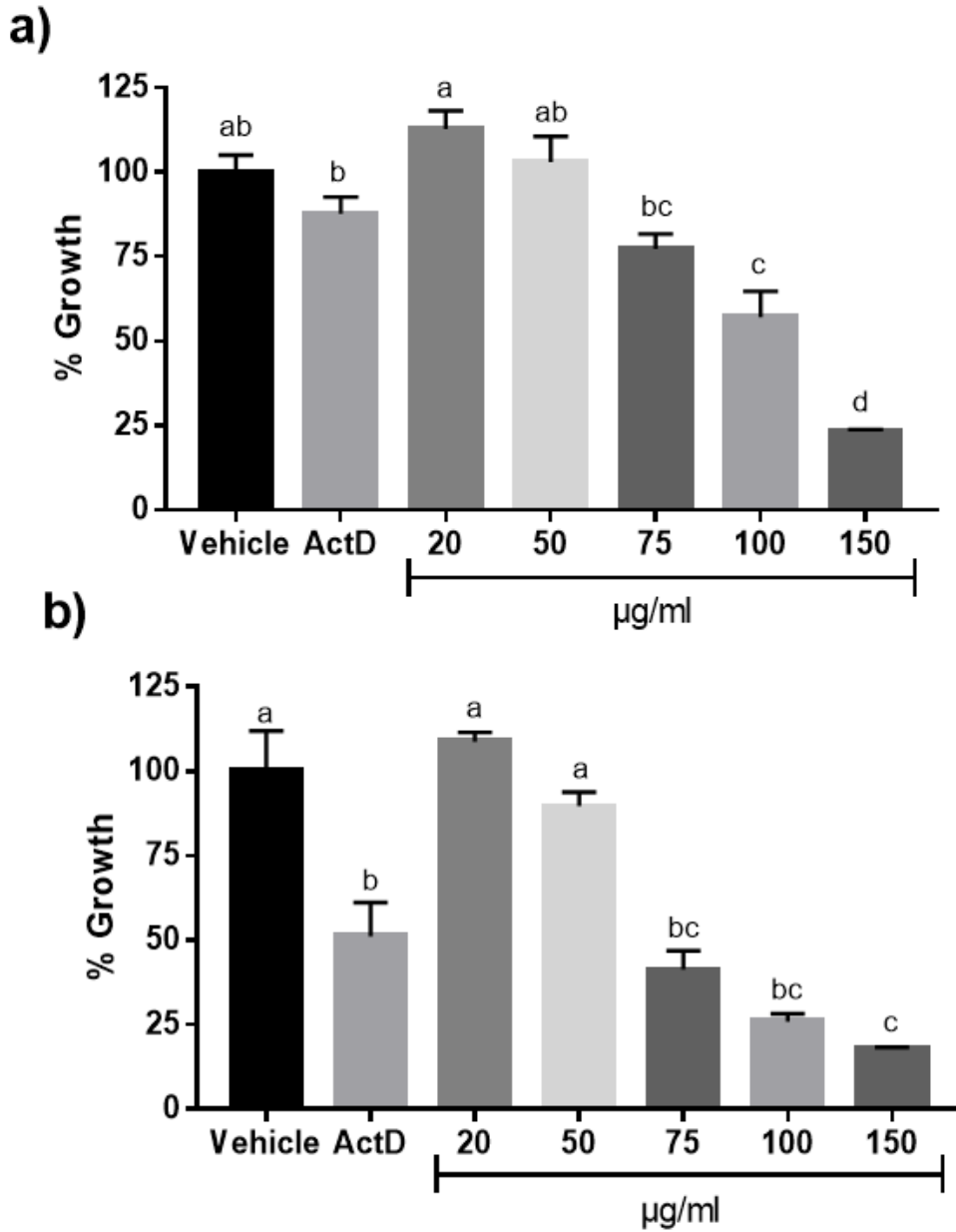


Figure 1. Cytotoxic effect of long-chain lipids (LCL) from Mexican native avocado seed on Caco-2 cells. Cells were treated with the LCL (20, 50, 75, 100 and 150 µg/mL), the vehicle (DMSO 0.1%) or ActD (0.5 µM). Cytotoxicity was assessed by MTT assays at 24 **(a)** and 48 h **(b)**. Cell growth is shown with respect to cells treated with vehicle. The data represent the mean ±SE (n=9). ANOVA with Tukey's multiple comparisons was used. Different letters represent significant difference (p<0.05).

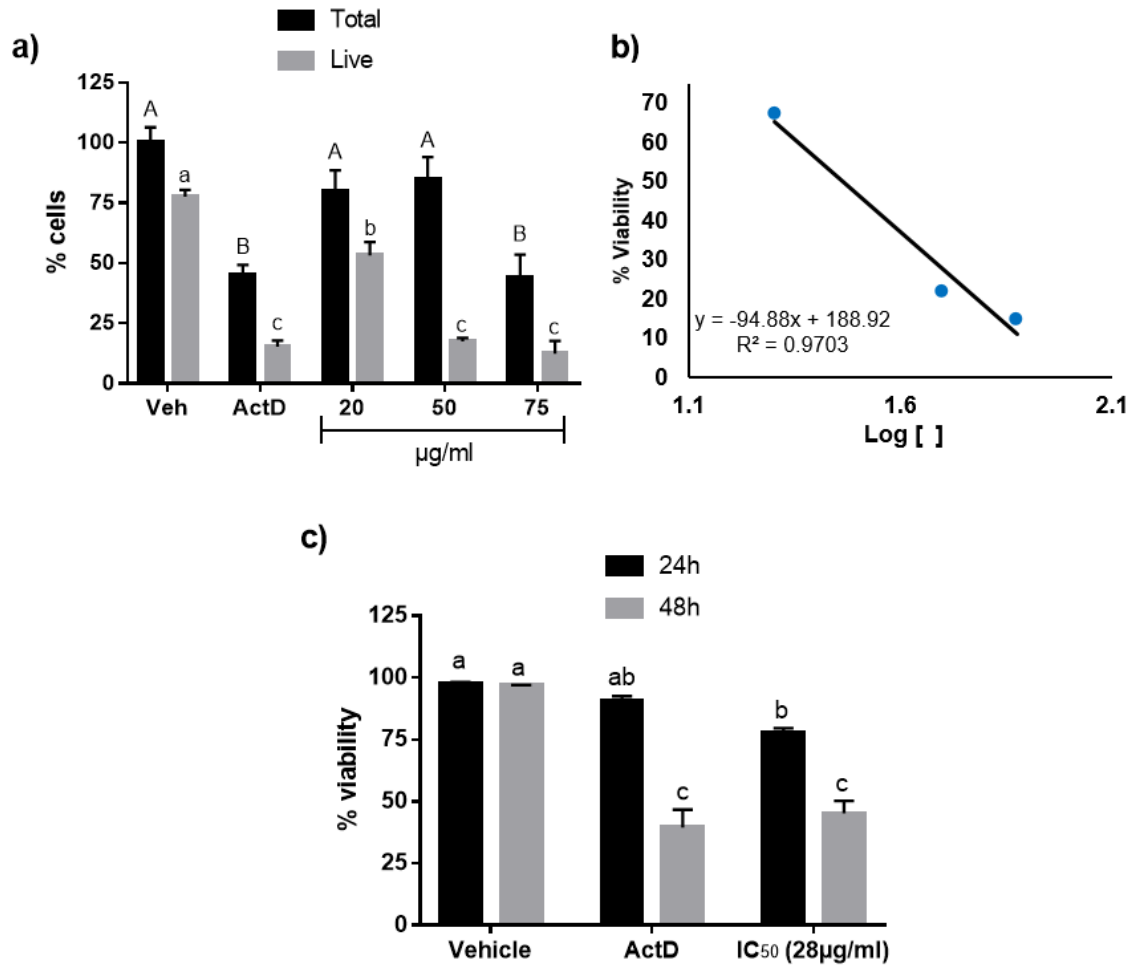


Figure 2. The effect of long-chain lipids (LCL) from Mexican native avocado seed on Caco-2 cell viability. (a) Cells were treated with LCL, the vehicle (DMSO 0.1%) or ActD (0.5 µM) and cell viability was determined by trypan blue exclusion assays at 24 and 48 h. **(b)** Linear regression analysis to calculate the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of the LCL on Caco-2 cells after 48 h of treatment (IC₅₀=28 µg/mL). **(c)** Cell viability was analyzed by flow cytometry using Syto 9/PI staining in cells treated for 24 and 48 h with the IC₅₀. The data represent the mean ±SE (n=6). ANOVA with Tukey's multiple comparisons was used. Different letters represent significant difference (p<0.05), uppercase letters for total number of cells and lowercase letters for number of living cells.

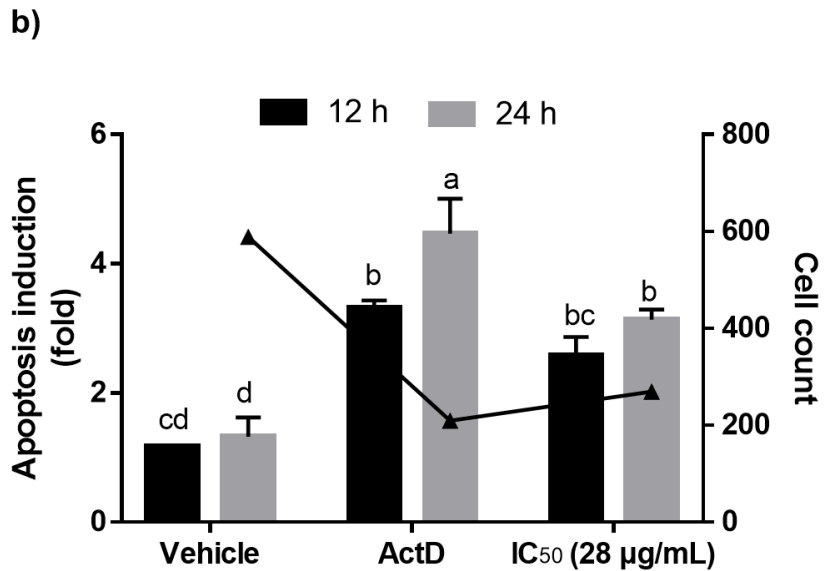
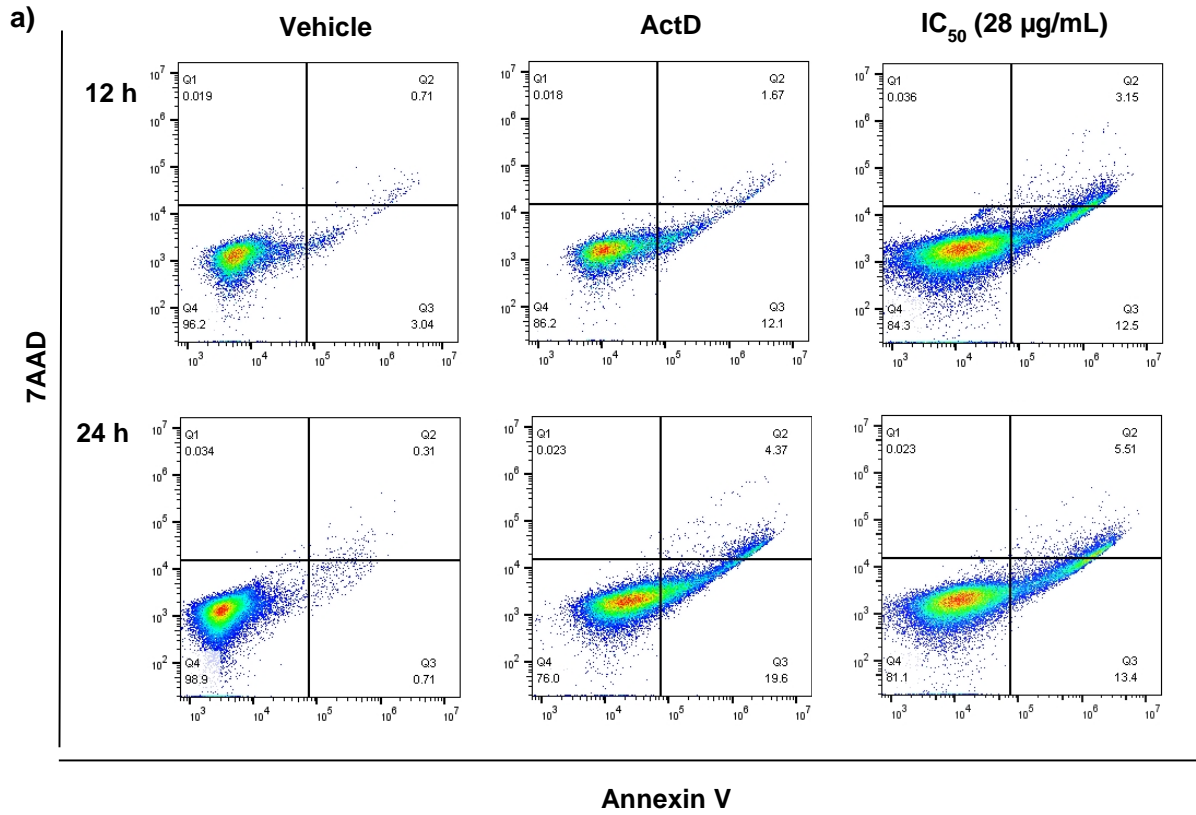


Figure 3. Apoptotic effect of long-chain lipids (LCL) from Mexican native avocado seed on Caco-2 cells. (a) The induction of apoptosis was analyzed by flow cytometry using Annexin V/7AAD in cells treated with LCL IC₅₀ (28 µg/mL), the vehicle (DMSO 0.1%) or ActD (0.5 µM) at 12 and 24 h. Representative plots are

shown. Quadrants Q1, Q2, Q3 and Q4 correspond to necrotic cells, late apoptosis, early apoptosis and living cells, respectively. **(b)** Graphic representation of the relative fluorescence intensities of Annexin V, the line shows the number of cells at 24h. DMSO 0.1% was used as the vehicle. The data represent the mean \pm SE (n=9). ANOVA with Tukey's multiple comparisons was used. Different letters represent significant difference (p<0.05).

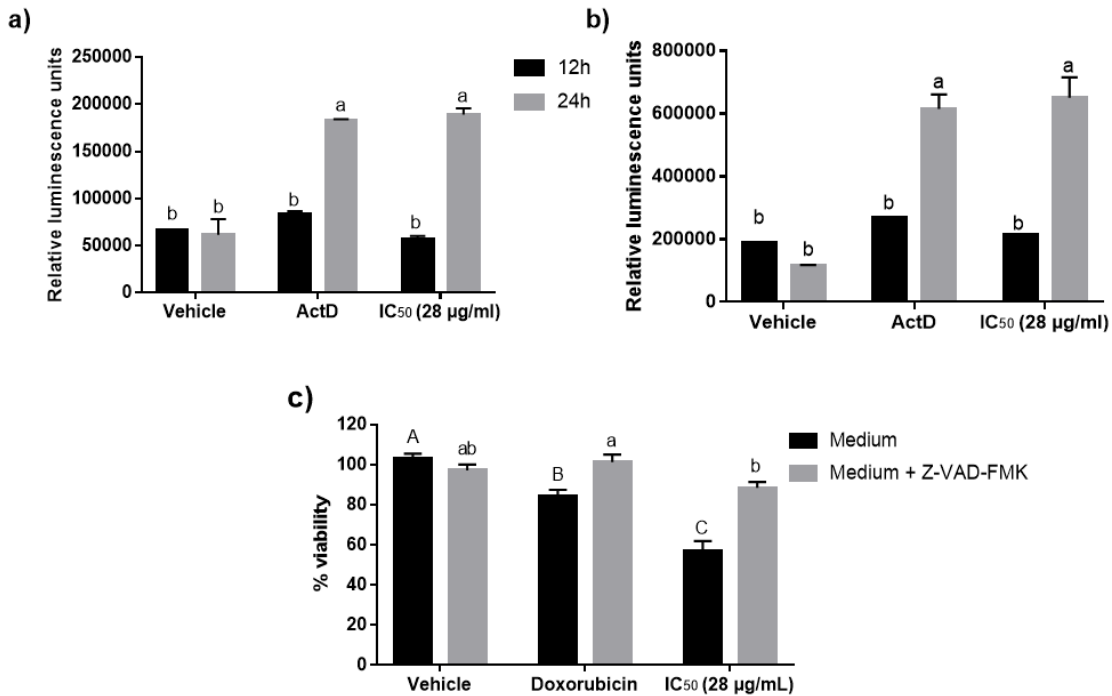


Figure 4. Long-chain lipids (LCL) from Mexican native avocado seed induce caspase activation in Caco-2 cells. Activity of caspases 8 **(a)** and 9 **(b)** was evaluated by luminescence after 12 and 24 h of treatment with the LCL IC₅₀ (28 µg/mL), the vehicle (DMSO 0.1%) or ActD (0.5 µM). **(c)** Cells were incubated with the caspase inhibitor Z-VAD-FMK (50 µM) and subsequently treated with LCL IC₅₀ for 24 h. A viability test of MTS was carried out. As a positive control, cells treated with Doxorubicin (1 µM) were used. The data represent the mean \pm SE (n=6). ANOVA with Tukey's multiple comparisons was used. Different letters represent significant difference (p<0.05).

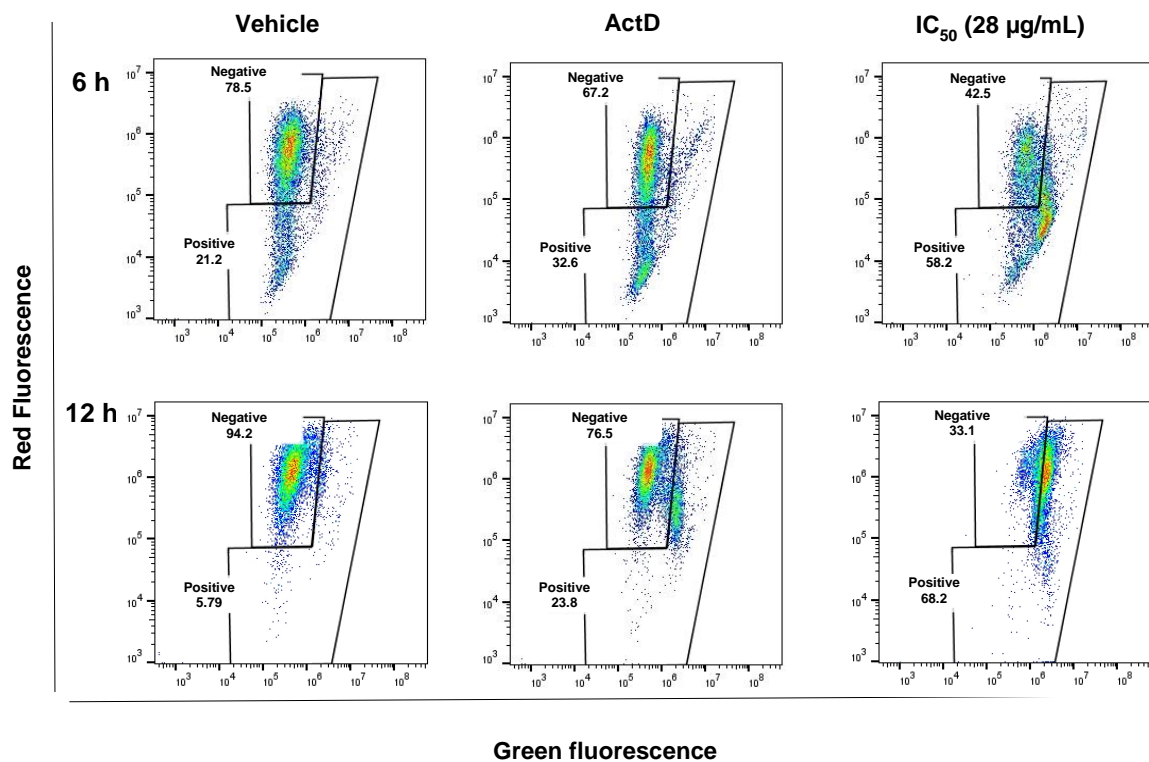


Figure 5. Mexican native avocado seed long-chain lipids (LCL) generates the loss of mitochondrial membrane potential in Caco-2 cells. Cells were treated for 6 and 12 h with the LCL IC₅₀ (28 µg/mL), the vehicle (DMSO 0.1%) or ActD (0.5 µM) and then stained with JC-1 and analyzed by flow cytometry. Cells in the left upper quadrant and in the lower quadrant of the plot are negative and positive for the loss of mitochondrial membrane potential, respectively.

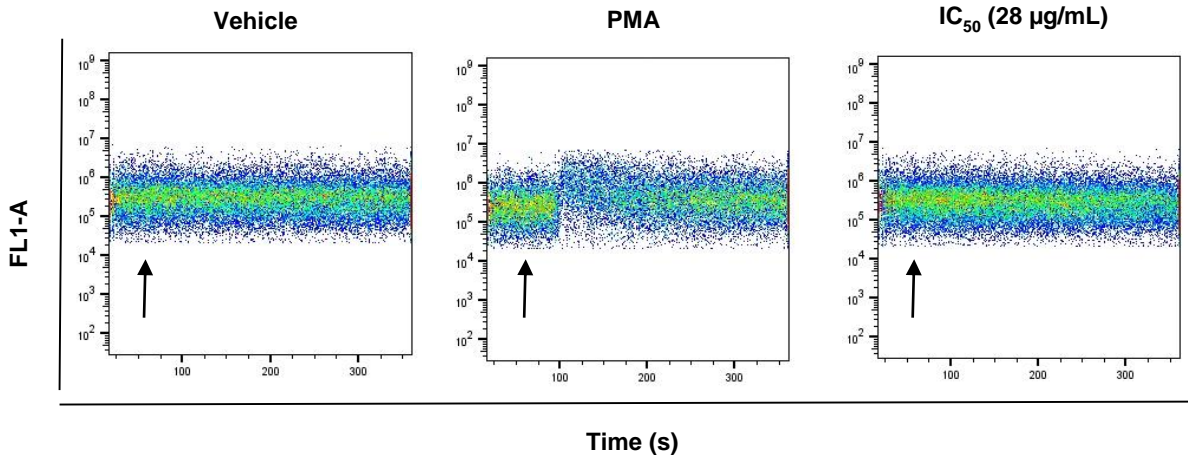


Figure 6. Mexican native avocado seed long-chain lipids (LCL) do not change the intracellular calcium level in Caco-2 cells. The intracellular calcium levels were analyzed in Caco-2 cells by flow cytometry without interruption, at minute 1 the cells were treated with the LCL IC₅₀ (28 µg/mL), the vehicle (0.1% DMSO) or with PMA (Acetate forbol myristate) and then continued the sampling for 5 more minutes. The arrows indicate the time of the addition of the treatments.

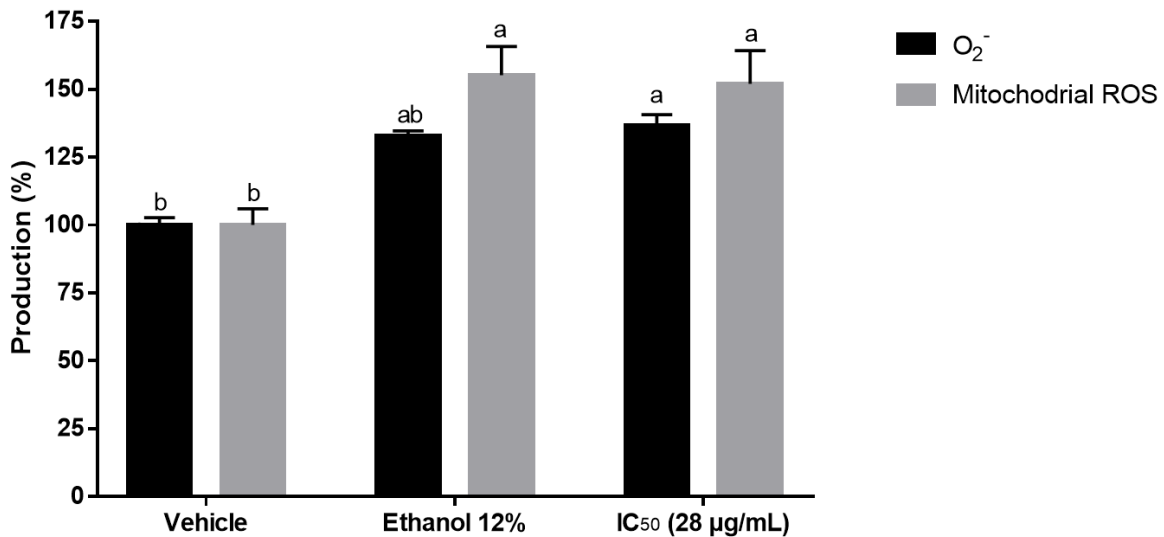


Figure 7. ROS production in Caco-2 cells is induced by Mexican native avocado seed long-chain lipids (LCL). The cells were recovered and a DHE stain (5 µM) or DHR (10 µM) was performed simultaneously with the addition of treatments. As a negative control, cells treated with the vehicle (0.1% DMSO) were used, and as a positive control cells treated with ethanol (12%). The data represent the mean ±SE (n=9). ANOVA with Tukey's multiple comparisons was used. Different letters represent significant difference (p<0.05).

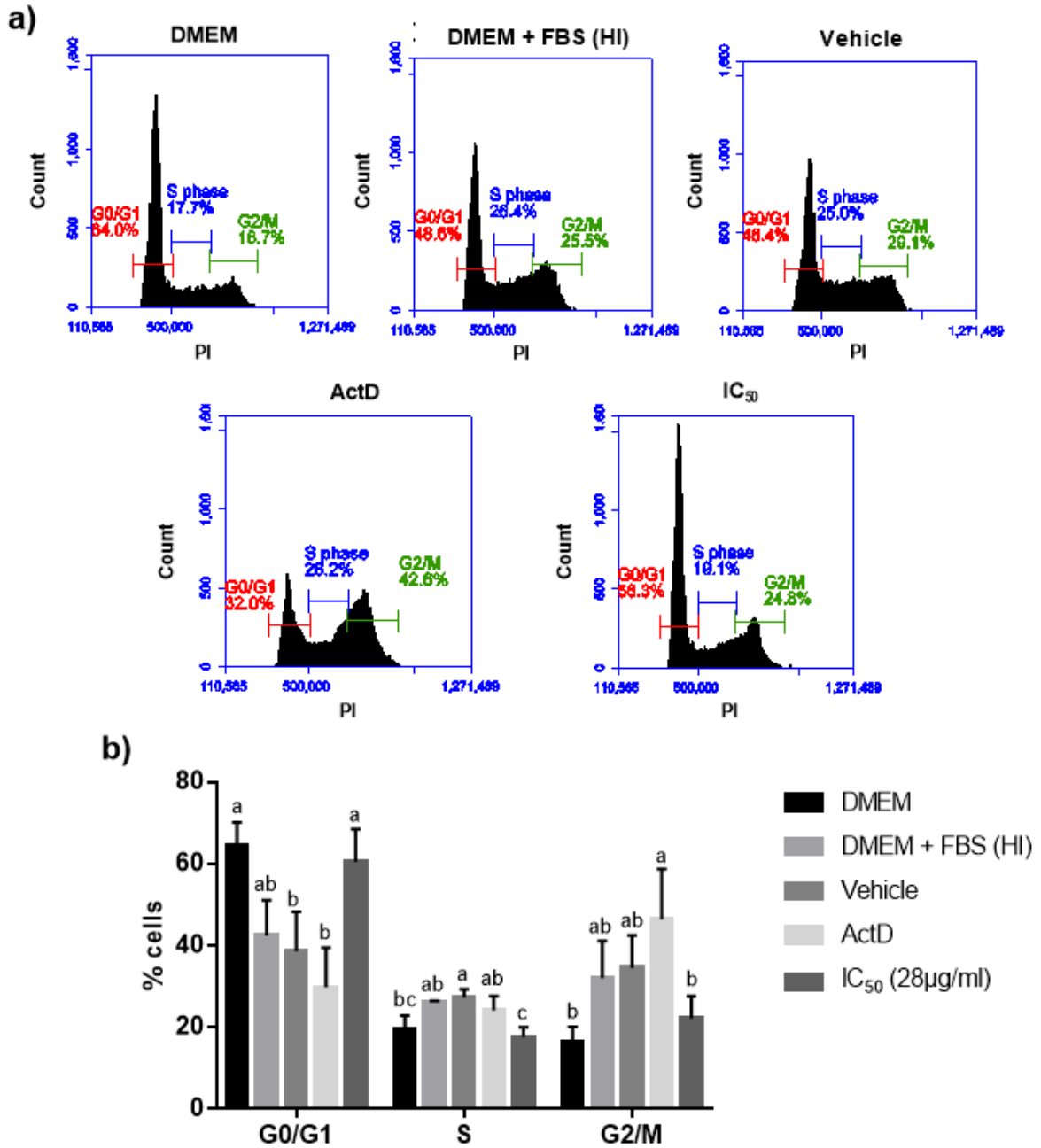


Figure 8. Mexican native avocado seed long-chain lipids (LCL) induce cell cycle arrest in Caco-2 cells. Cells were synchronized overnight with DMEM supplemented with 10% heat inactivated FBS. After 24 h of treatment with the LCL IC₅₀ (28 µg/mL), the vehicle (DMSO 0.1%) or ActD (0.5 µM), nucleus were isolated and stained with PI and analyzed by flow cytometry. **a)** Representative plots, **b)** Graphic representation of the mean ±SE (n=4). ANOVA with Tukey's multiple comparisons was used. Different letters represent significant difference in each phase tested independently (p<0.05).

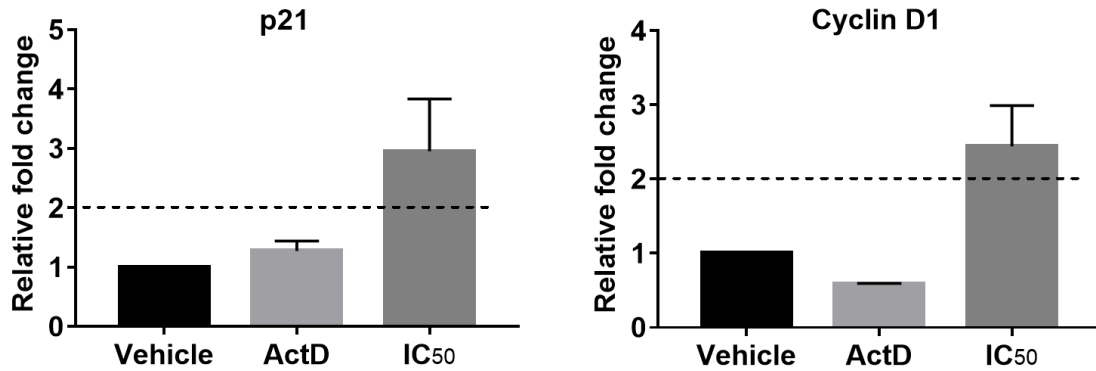


Figure 9. Mexican avocado seed long-chain lipids (LCL) regulate the expression of genes related to the cell cycle. Cells were treated with the LCL IC₅₀ (28 µg/mL), the vehicle (DMSO 0.1%) or ActD (0.5 µM) for 24 h and mRNA expression was analyzed by RT-qPCR. The data represent the mean ±SE (n=3). Fold-change values greater than 2 or less than 0.5 were considered significant for differentially expressed mRNAs.

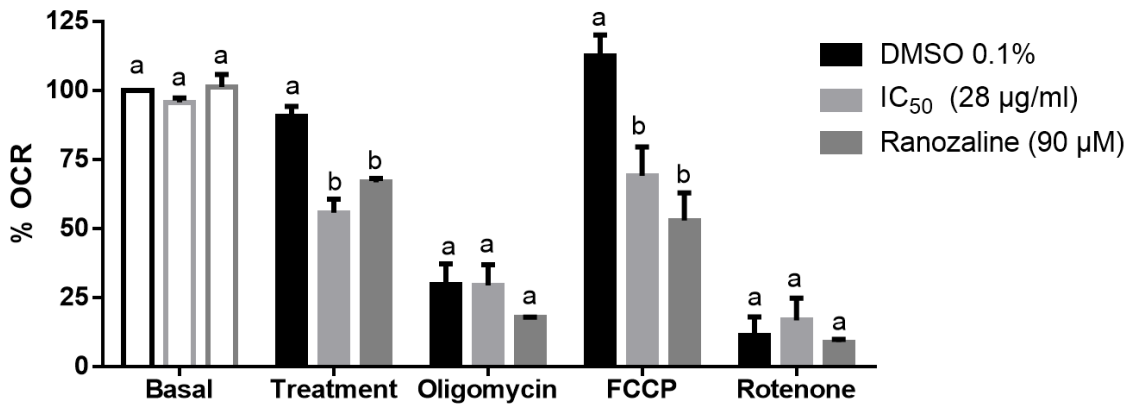


Figure 10. Mexican native avocado seed long-chain lipids (LCL) inhibit fatty acid oxidation. Cells were glucose-starved overnight with low glucose DMEM (1g/L glucose), supplemented with 10 % FBS and 1% pen/strep. Cells were detached and 2 million cells were analyzed in the respirometer in each chamber. The injections were made after basal respiration was achieved as follows: DMSO, LCL IC₅₀ or ranozaline, oligomycin (100 nM), pyruvate (1 mM), FCCP (100 nM) and rotenone (100 nM). The data represent the mean ±SD (n=9). ANOVA with Tukey's multiple comparisons was used. Different letters represent significant difference in each condition tested (p<0.05). OCR (Oxygen consumption rate).

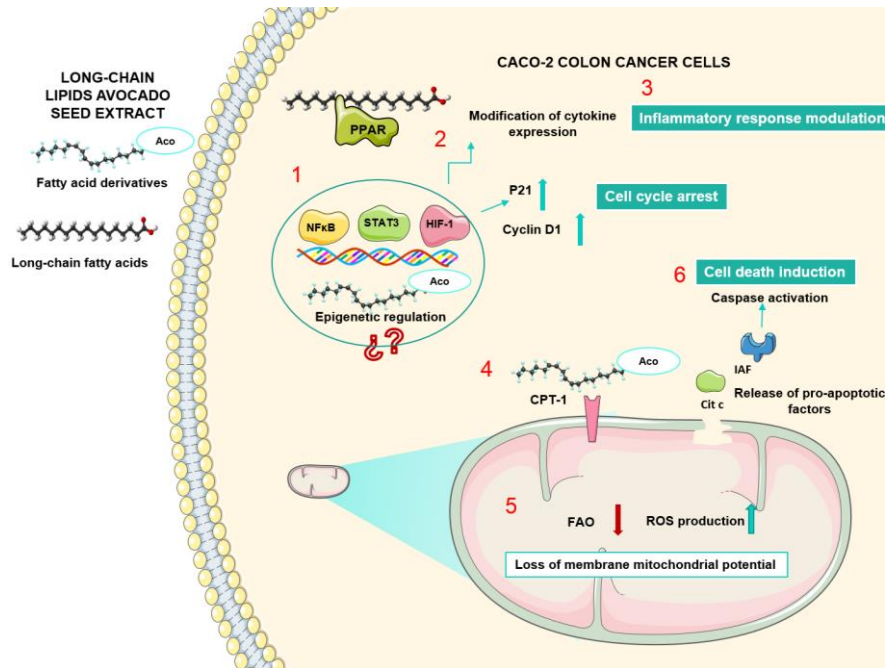


Figure 11. Proposed model of the cytotoxic mechanism of the lipid molecules of the Mexican native avocado seed on Caco-2 cells. 1) Transcriptional modulation, 2) regulation in the expression of molecules of the immune response and/or the cell cycle, 3) inflammatory response modulation and cell cycle arrest, 4) entry and accumulation in the mitochondria, 5) modifications in the metabolic rate and ROS production, 6) induction to cell death.

7.2. CAPÍTULO II. CITOTOXICIDAD DE ÁCIDOS GRASOS Y DERIVADOS DE ÁCIDOS GRASOS DE LA SEMILLA DE AGUACATE NATIVO MEXICANO (*Persea americana* var. *drymifolia*) SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON HCT 116

Lara-Márquez Mónica¹, Báez-Magaña Marisol¹, Ochoa-Zarzosa Alejandra¹, Salgado-Garciglia Rafael² and López-Meza Joel E.¹

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro. Posta Veterinaria, P.C. 58893, Morelia, Michoacán, México.

²Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Gral. Francisco J. Múgica SN, Felicitas del Río, P.C. 58040, Morelia, Michoacán, México.

Resumen

El aguacate es un fruto que acumula una gran cantidad de compuestos lipídicos como ácidos grasos (AG) y derivados de ácidos grasos (DAG) con actividad anticancerosa y que se han propuesto como potenciadores quimioterapéuticos. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto citotóxico de las moléculas lipídicas de cadena larga de la semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) sobre células de cáncer de colon HCT 116. Se realizaron análisis de viabilidad celular por MTT y ensayos de exclusión de azul de tripano, además los datos obtenidos fueron utilizados para calcular la IC₅₀ posterior a 48 h de tratamiento. Los resultados mostraron un efecto citotóxico significativo desde las 24 h de tratamiento con la concentración de 10 µg/mL (23%), así como modificaciones morfológicas. Adicionalmente, los ensayos de azul de tripano arrojaron datos que muestran una disminución del número de células y de la viabilidad celular en todas las concentraciones evaluadas. Por último, la IC₅₀ calculada para las células fue de 8 µg/mL. En conclusión, los AG y DAG de aguacate son citotóxicos hacia células de cáncer de colon HCT 116, disminuyendo la viabilidad y el número celular. Sin embargo, se requiere de otros análisis para conocer el modo y mecanismo de muerte inducido por estas moléculas.

Palabras clave: Cáncer de colon, aguacate, moléculas lipídicas, derivados de ácidos grasos

1. Introducción

El potencial de los organismos vegetales como fuente de fitoquímicos anticancerosos ha sido de gran relevancia para el desarrollo de tratamientos. Se han descrito cerca de 1 millón de productos naturales, de los cuales más de la mitad son producidos por las plantas y hasta el 2008 cerca del 48% de los productos sometidos a procesos de estudios clínicos eran de origen vegetal (Demain & Viashnav, 2011). Los policétidos son un grupo de fitoquímicos complejos con actividades biológicas que van desde fungir como reserva de energía y señalización celular hasta el desarrollo, comunicación y defensa contra otros organismos (Seigler, 2002). En este sentido, el aguacate es un fruto rico en policétidos, ya que alrededor del 15% de su biomasa son compuestos lipídicos (USDA, 2011). Específicamente, en la semilla de aguacate se han reportado ácidos grasos (AG) de cadena larga saturados, insaturados y poliinsaturados, así como derivados de ácidos grasos (DAG) como las acetogeninas alifáticas y alcoholes grasos polihidroxilados (Báez-Magaña, 2014). Interesantemente la semilla de aguacate ha cobrado atención debido a que posee mayor cantidad de compuestos selectivos hacia células cancerosas (Rodríguez-López *et al.*, 2015).

Por otro lado, el cáncer colorrectal (CRC) es una enfermedad en la que se reportan 1.2 millones de casos nuevos cada año en el mundo y cerca de 700,000 muertes, donde los factores de riesgo más importantes son la dieta, obesidad y la edad (Jemal *et al.*, 2011). Debido a sus propiedades antiproliferativas y proapoptóticas, las moléculas lipídicas han sido propuestas como agentes potenciadores en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, dentro de los que se encuentra el CRC (Fauser *et al.*, 2011). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto citotóxico de AG y DAG extraídos de la semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) sobre células de cáncer colorrectal HCT 116.

2. Materiales y métodos

2.1. Cultivo celular

En este trabajo se evaluó la línea celular cancerosa HCT 116 (ATCC® CCL-247™) de carcinoma de colon y fue cultivada en medio DMEM con F-12 Ham (Sigma) con los siguientes suplementos: 10% de suero fetal bovino (SFB, Corning), 1% de penicilina/estreptomina (Gibco) y 500 µL/L de anfotericina. El cultivo celular se mantuvo en una incubadora de CO₂ al 5% a 37°C.

2.2. Obtención de moléculas lipídicas de la semilla de aguacate nativo mexicano de *Persea americana* var. *drymifolia*

Los AG y DAG se obtuvieron de la semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) a partir de frutos en estado de madurez fisiológica, los cuales fueron congelados con nitrógeno líquido para lograr separar la semilla del resto de los componentes del fruto. Posteriormente, se trituró la semilla con una licuadora y el polvo obtenido fue sometido a reflujo constante con hexano (C₆H₁₄, J.T. Baker) en un equipo de extracción Soxhlet durante 14 h. El extracto resultante se filtró y se mantuvo a -18°C durante 12 h. Los cristales generados se recuperaron centrifugando a 10,000 rpm por 5 min a 4°C y posteriormente secados con nitrógeno gaseoso. Los cristales fueron preservados a -20°C disueltos con DMSO 5% (dimetilsufóxido, Sigma) (Báez-Magaña, 2014).

2.3. Ensayos de MTT

La línea celular HCT 116 se cultivó en placas de 96 pozos (10,000 células/pozo) (Sarstedt). Luego de 24 h se cambió a medio incompleto (medio sin suplementos) para sincronizar las células, se incubaron por 12 h y después fueron sometidas a los tratamientos. Se utilizó un barrido de concentraciones del extracto lipídico (1, 5, 10, 20, 50 y 75 µg/mL), además de un control con el vehículo (DMSO 0.1%). Estas concentraciones se evaluaron en función a las utilizadas por Lara-Márquez (2015). Como control positivo de muerte las células se trataron con el inductor de apoptosis actinomicina D (125 ng/mL) (Sigma). Luego de 24 y 48 h se evaluó la viabilidad. Para esto, se adicionaron 10 µL de MTT Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (5 mg/mL) (Sigma), a cada pozo y se dejó

actuar durante 4 h. Luego se resuspendieron los cristales de formazán con 100 μ L de isopropanol-HCl 19:1 y después de 30 min se leyeron las muestras en un espectrofotómetro Bio-Rad iMark Microplate Reader a 595 nm, mezclando durante 60 s en cada lectura. Los datos fueron recolectados y extraídos con el software Microplate manager (BIO-RAD).

2.4. Ensayos de viabilidad por exclusión de azul de tripano

Las evaluaciones de proliferación celular se realizaron a las 24 y 48 h con el ensayo de exclusión de azul de tripano. Las células fueron cultivadas y tratadas como se mencionó anteriormente, transcurrido el tiempo de tratamiento las células fueron recuperadas por tripsinización y se esperó de 5 a 10 min a que las células se despegaran de la superficie. Se agregaron 50 μ L de medio de cultivo suplementado con SFB para inactivar la tripsina. Después de resuspender la mezcla se tomaron 20 μ L y se pasaron a un tubo de microcentrífuga, se agregaron 20 μ L de azul tripano (0.4%) y se mezcló suavemente. Se leyeron 10 μ L de cada muestra en el contador automático de células TC20™ (BIO-RAD). A partir de los datos de azul de tripano se calculó la concentración media inhibitoria mediante un análisis de regresión con el software Excel (Microsoft Office).

2.5. Análisis estadístico

Los datos se analizaron en el software JMP 6 mediante un análisis de varianza de una vía (One-way ANOVA) utilizando la prueba de Tukey, los valores de $P \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

3. Resultados

3.1. Las moléculas lipídicas de la semilla de aguacate son citotóxicas hacia células HCT 116

Con la finalidad de conocer la actividad del extracto de aguacate sobre las células HCT 116, se realizaron bioensayos de actividad con MTT a las 24 y 48 h de tratamiento. Se presentó un efecto inhibitorio dependiente de la concentración en ambos tiempos. Se observaron cambios significativos desde la concentración de 10 μ g/mL con una disminución de la actividad celular de 23 y 30% a las 24 y 48 h, respectivamente. Las concentraciones de 50 y 75 μ g/mL fueron las más letales,

presentando porcentajes de inhibición cercanos al 90% desde las 24 h de tratamiento (Fig. 1a y b). Además, las células tratadas con el extracto lipídico presentaron modificaciones morfológicas, se observaron conglomerados de células redondas y encogidas, en comparación con aquellas tratadas únicamente con el vehículo (Fig. 1c).

3.2. Las moléculas lipídicas de la semilla de aguacate inducen la muerte de las células HCT 116

Debido a que el extracto lipídico de aguacate posee moléculas que inhiben la proliferación celular, se hicieron ensayos de exclusión de azul de tripano. De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de MTT, se seleccionaron aquellas concentraciones en las que se disminuyó la actividad celular. Interesantemente, en las concentraciones en las cuales se encontró diferencia significativa en cuanto al número total de células, se observaron porcentajes de inhibición de actividad metabólica de 46 y 42% para 1 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Por otro lado, el número de células vivas disminuyó en las células tratadas con todas las concentraciones evaluadas. Las células tratadas con 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 48 h tuvieron valores de inhibición de 54 y 60%, respectivamente (Fig. 2a). Con los datos obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal para calcular la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) de las células tratadas durante 48 h, donde la concentración calculada fue de 8.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 2b).

4. Discusión

Se ha descrito que más de 1,000 plantas poseen propiedades anticancerosas; sin embargo, existe una gran cantidad de moléculas derivadas de plantas de las cuales no se conocen las propiedades benéficas y que representan un potencial importante para desarrollar estrategias que contribuyan al estudio y combate del cáncer (Mukherjee *et al.*, 2001). En este estudio se probó un extracto de semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) rico en moléculas lipídicas de cadena larga sobre células de cáncer de colon HCT 116. Interesantemente, estos compuestos son producidos y almacenados en estructuras especializadas denominadas células idioblásticas secretoras de aceite localizadas

principalmente en el fruto del aguacate, cuya función incluye efectos insecticidas y antimicrobianos (Rodríguez-Saona & Trumble, 2000). Además, estas moléculas poseen actividad antiinflamatoria, antidiabética, antihipertensiva y anticancerosa (Dabas *et al.*, 2013).

En este estudio se evaluó el efecto citotóxico de las moléculas lipídicas de cadena larga sobre células HCT 116 y fue posible observar este efecto de manera dependiente de la concentración desde las 24 h de tratamiento (Fig 1). Se ha reportado que este grupo de moléculas derivadas de aguacate inhiben la viabilidad de células cancerosas de pulmón (A-549), riñón (A-498), páncreas (PaCa2), adenocarcinoma de mama (MCF-7), colon (HT-29) y de próstata (PC-3) (Oberlies *et al.*, 1998), lo cual coincide con lo reportado en este estudio. A pesar de que en este trabajo no se determinó el mecanismo citotóxico de las moléculas lipídicas de cadena larga sobre las células HCT 116, en otros estudios se ha reportado que diferentes moléculas lipídicas contenidas en el aguacate estudiadas de manera independiente son citotóxicas hacia células de cáncer oral generando estrés oxidativo (D'Ambrosio *et al.*, 2011), dañando al citoesqueleto en células de cáncer de mama (Butt *et al.*, 2006), a través de cambios metabólicos en células de leucemia (Lee *et al.*, 2015) y de mama (Zeng *et al.*, 2010), así como modulando la expresión de genes relacionados con la inducción de apoptosis y el ciclo celular en cáncer de próstata (Hughes-Fulford *et al.*, 2001) y de pulmón (Martínez *et al.*, 2005); asimismo, en células de cáncer de vejiga y testicular a través de modificar las características de la membrana citoplasmática (Habib *et al.*, 1987).

En el caso de los AG de cadena larga, compuestos que se encuentran en un 36% en el extracto, se han propuesto como potenciadores de las quimioterapias actuales (Fauser *et al.*, 2011). Además, el uso de mezclas de compuestos naturales aumenta las posibilidades de inducir apoptosis y disminuir los mecanismos de resistencia en células cancerosas (Aung *et al.*, 2011). En este sentido, la mezcla de moléculas lipídicas de cadena larga de aguacate ayuda a explicar por qué en este trabajo se observó la muerte de las células HCT 116. Sin embargo, es necesario hacer más estudios que permitan determinar el mecanismo mediante el cual está ocurriendo este fenómeno. Hasta nuestro conocimiento, no existen reportes de

estudios con este tipo de mezcla hacia ningún tipo celular, así que este sería el primer registro.

5. Conclusión

Los AG y DAG extraídos de la semilla de aguacate nativo mexicano son citotóxicos hacia células de cáncer colorrectal HCT 116, disminuyendo la viabilidad celular. Sin embargo, hacen falta más análisis para conocer el modo y mecanismo de muerte inducido por estas moléculas.

6. Referencias

- Aung, T. N., Qu, Z., Kortschak, R. D. y Adelson, D. L. (2017). Understanding the effectiveness of natural compound mixtures in cancer through their molecular mode of action. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3). <https://doi.org/10.3390/ijms18030656>
- Báez-Magaña, M. (2014). Efecto de los ácidos grasos de semilla de aguacate y sus derivados sobre la respuesta inmune innata durante la internalización de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Butt, A. J., Roberts, C. G., Seawright, A. a, Oelrichs, P. B., Macleod, J. K., Liaw, T. Y. E. y Sutherland, R. L. (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. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0170>
- D'Ambrosio, S. M., Han, C., Pan, L., Douglas Kinghorn, A., Ding, H., 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. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.027>
- 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), 6133–40.
<https://doi.org/10.2174/1381612811319340007>
- Demain, A. L. y Vaishnav, P. (2011). Natural products for cancer chemotherapy. *Microbial Biotechnology*, 4(6), 687–699. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00221.x>
- Fausser, J. K., Prisciandaro, L. D., Cummins, A. G. y Gordon, S. (2011). Fatty acids as potential adjunctive colorectal chemotherapeutic agents. *Cancer Biology & Therapy*, 11(8), 724–731. <https://doi.org/10.4161/cbt.11.8.15281>
- Habib, N. a, Wood, C. B., Apostolov, K., Barker, W., Hershman, M. J., Aslam, M. y Jenkins, W. E. (1987). Stearic acid and carcinogenesis. *British Journal of Cancer*, 56, 455–458. [https://doi.org/10.1016/0277-5379\(87\)90538-4](https://doi.org/10.1016/0277-5379(87)90538-4)
- Hughes-Fulford, M., Chen, Y. y Tjandrawinata, R. R. (2001). Fatty acid regulates gene expression and growth of human prostate cancer PC-3 cells. *Carcinogenesis*, 22(5), 701–707.
- Jemal, A., Bray, F. y Center, M. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal*, 61(2), 69–90. <https://doi.org/10.3322/caac.20107>.
- 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.
- Lee, E. A., Angka, L., Rota, S. G., Hanlon, T., Hurren, R., Wang, X. M. y Spagnuolo, P. A. (2015). Targeting mitochondria with Avocatin B induces selective leukemia cell death. *Cancer Research*, 75(12), 2378–88. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2676>
- Martínez, J., Gutiérrez, A., Casas, J., Lladó, V., López-Bellan, A., Besalduch, J. y Escribá, P. V. (2005). The repression of E2F-1 is critical for the activity of Minerval against cancer. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315(1), 466–474. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.088716.Minerval>

- McCloy, R. a, Shelley, E. J., Roberts, C. G., Boslem, E., Biden, T. J., Nicholson, R. I. y Butt, a J. (2013). Role of endoplasmic reticulum stress induction by the plant toxin, persin, in overcoming resistance to the apoptotic effects of tamoxifen in human breast cancer cells. *British Journal of Cancer*, 109(12), 3034–41. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.693>
- Mukherjee, A.K., Basu, S., Sarkar, N. y Ghosh, A.C. (2001). Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Current Medicinal Chemistry*, 8(12), 1467-1486. <https://doi.org/10.2174/0929867013372094>
- Oberlies, N. H., Rogers, L. L., Martin, J. M. y McLaughlin, J. L. (1998). Cytotoxic and insecticidal constituents of the unripe fruit of *Persea americana*. *Journal of Natural Products*, 61(98), 781–785. <https://doi.org/10.1021/np9800304>
- Rodríguez-López, C. E., Hernández-Brenes, C. y Días de la Garza, R. (2015). A targeted metabolomics approach to characterize acetogenin profiles in avocado fruit (*Persea americana* Mill.). *Royal Society of Chemistry*, 5, 106019–106029. <https://doi.org/10.1039/C5RA22854A>
- Rodriguez-Saona, C. (2000). Biologically active aliphatic acetogenins from specialized idioblast oil cells. *Current Organic Chemistry*, 4(1249–1260).
- Seigler, D. S. (2002). Secondary metabolism. *Encyclopedia of genetics, genomics, proteomics and informatics*. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6754-9_15212
- Theodoratou, E., McNeill, G., Cetnarskyj, R., Farrington, S. M., Tenesa, A., Barnettson, R. y Campbell, H. (2007). Dietary fatty acids and colorectal cancer: A case-control study. *American Journal of Epidemiology*, 166(2), 181–195. <https://doi.org/10.1093/aje/kwm063>
- USDA (2011). Avocado, almond, pistachio and walnut composition. *USDA National Nutrient Database for Standard Reference.*, 24.
- Zeng, L., Biernacka, K. M., Holly, J. M. P., Jarrett, C., Morrison, A., Morgan, A. y Perks, C. M. (2010). Hyperglycaemia confers resistance to chemotherapy on

breast cancer cells: The role of fatty acid synthase. *Endocrine-Related Cancer*, 17(2), 539–551. <https://doi.org/10.1677/ERC-09-0221>

7. Figuras

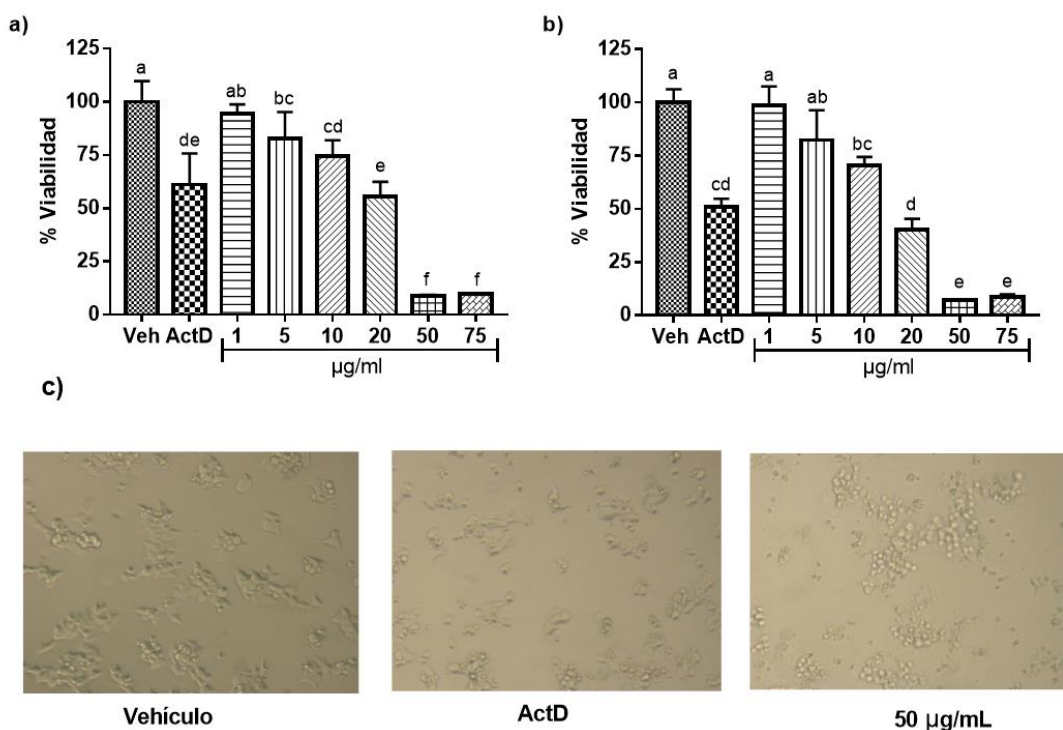


Figura 1. Efecto citotóxico de las moléculas lipídicas de semilla de aguacate nativo mexicano sobre células HCT 116. Las células fueron tratadas con el extracto lipídico (1, 5, 10, 20, 50 y 75 µg/mL), vehículo (DMSO 0.1 %) o ActD (0.5 µM) y se evaluó la citotoxicidad con ensayos de MTT a las 24 h **(a)** y 48 h **(b)**. **(c)** Imágenes representativas de células HCT 116 tratadas con el extracto lipídico. Los datos representan la media \pm SE (n=6). La comparación de las medias se realizó mediante un ANOVA con la prueba de Tukey. Letras diferentes denotan diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

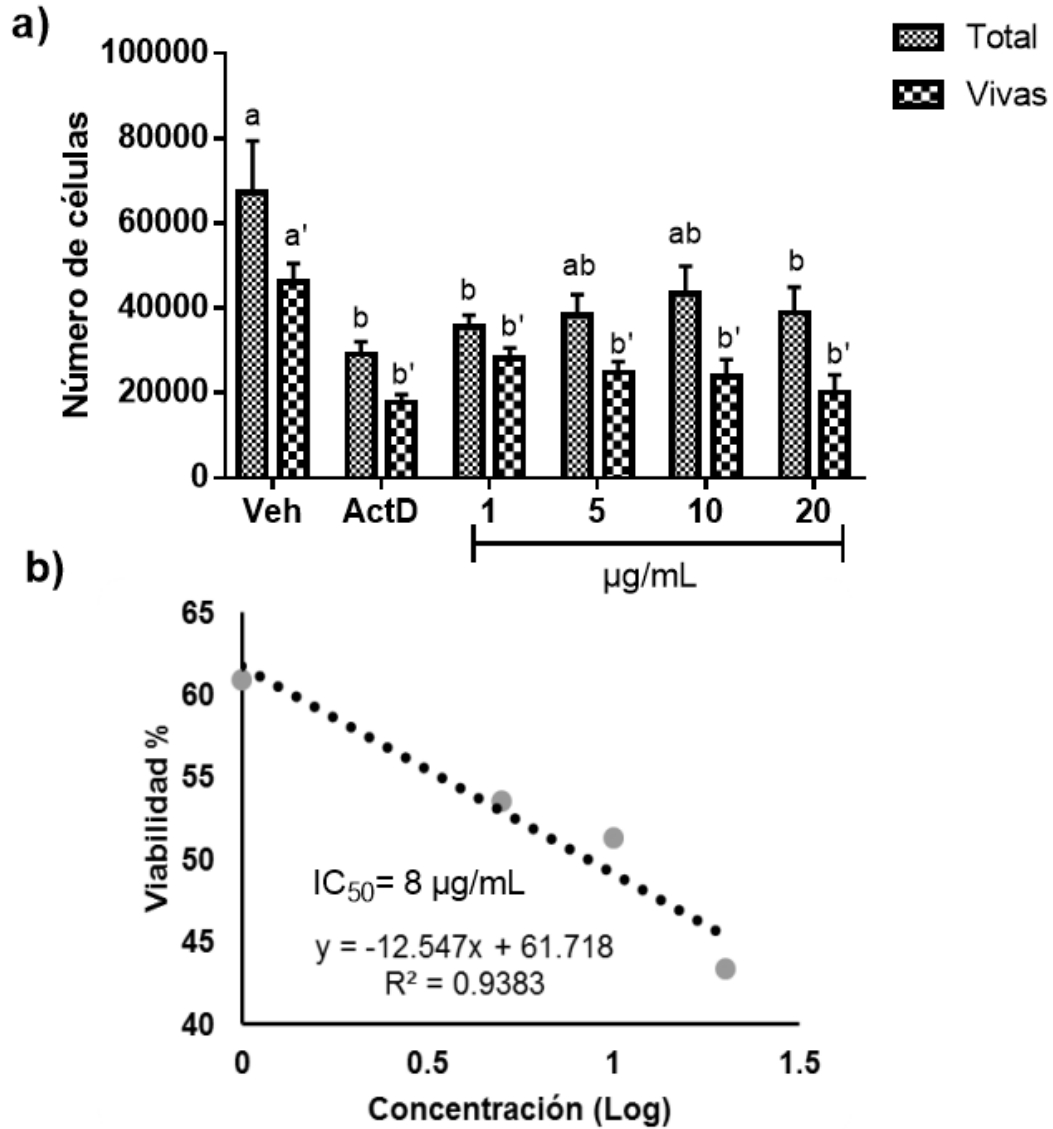


Figura 2. Las moléculas lipídicas de la semilla de aguacate nativo mexicano inhiben la viabilidad de las células HCT 116. (a) Las células fueron tratadas con el extracto lipídico (1, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$), vehículo (DMSO 0.1 %) o ActD (0.5 μM) y se evaluó la viabilidad celular con ensayos de exclusión de azul de tripano a las 48 h. Los datos representan la media \pm SE ($n=6$). La comparación de las medias se realizó mediante un ANOVA con la prueba de Tukey. Letras diferentes denotan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). **(b)** Análisis de regresión lineal para calcular la concentración media inhibitoria (IC_{50}) del extracto en un tratamiento de 48 h a células HCT 116 ($\text{IC}_{50}=8 \mu\text{g/mL}$).

8. DISCUSIÓN GENERAL

El fracaso de las quimioterapias actuales contra el cáncer de colon está relacionado con las respuestas individuales heterogéneas que tienen los pacientes frente a las drogas utilizadas, de aquí la importancia de conocer las características genéticas de cada tumor para lograr hacer un pronóstico y una estrategia de tratamiento adecuada (Walther *et al.*, 2009). En este estudio se utilizaron dos líneas celulares para evaluar el efecto citotóxico de las moléculas lipídicas de la semilla de aguacate nativo mexicano: la línea celular de adenocarcinoma de colon Caco-2 y la línea celular de carcinoma de colon HCT 116. Los resultados mostraron concentraciones medias inhibitorias medias (IC₅₀) distintas, siendo la línea celular Caco-2 la más resistente con 28 µg/mL en comparación con las células HCT 116 con 8 µg/mL. Esto se puede explicar conociendo las características de cada línea celular. Como se ha mencionado anteriormente, existen alteraciones genómicas y epigenéticas relacionadas con el control de la proliferación celular y de la apoptosis que suelen verse involucrados en el proceso de la carcinogénesis colorrectal, y algunas de éstas son factores determinantes del pronóstico.

En el caso de la línea celular Caco-2, alberga mutaciones en los genes *APC*, *p53*, *SMAD4* y *β-catenina* (Ahmed *et al.*, 2013; De Bosscher *et al.*, 2004; Ilyas *et al.*, 1997). Específicamente, la pérdida o mutación del gen *SMAD4* en las células Caco-2 afecta a la vía del TGF-β, relacionada con invasión, proliferación y apoptosis (De Bosscher *et al.*, 2004). Esto tiene una relación directa con la sobrevivencia de pacientes que han sido sometidos a cirugía y a un tratamiento con 5-FU presentando 80% de probabilidades de recurrencia de la enfermedad (Alhopuro *et al.*, 2005).

En contraste, la línea celular HCT 116 tiene mutaciones en los genes *PI3KCA*, en *KRAS* y en *β-catenina* (Ahmed *et al.*, 2013; Ilyas *et al.*, 1997). De acuerdo a un estudio realizado en muestras de 381 tumores de cáncer colorrectal, las mutaciones en los genes *KRAS* y *PI3KCA* no son determinantes para la modificación de la supervivencia de los pacientes (Salazar *et al.*, 2011), confiriéndole a las células HCT 116 un fenotipo menos agresivo. Sin embargo, otros

reportes muestran que alteraciones en el codón 12 del gen *KRAS* está asociado con resistencia a quimioterapéuticos dirigidos a la vía EGFR (Walther *et al.*, 2009).

La vía de señalización WNT suele verse alterada en cerca del 90% de los casos de CRC en los genes *APC* y *β-catenina* (Walther *et al.*, 2009). Interesantemente, el gen *APC* sufre mutaciones en estadios tempranos de la carcinogénesis y no suele ser el único mutado en CRC, ya que requiere la acción de algún otro oncogén, siendo *p53* el mejor candidato; el 43% de tumores con mutaciones en los genes *APC* y *p53* presentan un fenotipo metastásico; sin embargo, aquellas con mutaciones en *APC/KRAS/p53* son especialmente agresivas (Schell *et al.*, 2016). Este dato es muy importante, ya que permite entender por qué las células Caco-2 fueron más resistentes a las moléculas lipídicas de semilla de aguacate, ya que presentan de manera simultánea mutaciones en dos genes clave (*APC* y *p53*). Por otro lado, a pesar de que las células HCT116 poseen mutaciones en el gen *β-catenina* relacionado con la vía de la WNT, no viene acompañado de mutaciones en *p53* o algún otro gen relacionado con el potencial metastásico.

Adicionalmente, las células Caco-2 poseen inestabilidad cromosómica, siendo poliploide con 96 cromosomas, a diferencia de la línea celular HCT 116 que es casi diploide presentando 45 cromosomas e inestabilidad microsatelital.

Estas características son relevantes y pueden representar un mal pronóstico, debido a que los pacientes con inestabilidad cromosomal (poliploides), con tumores diploides y aquellos con inestabilidad microsatelital presentan porcentajes de sobrevivencia posterior a los 5 años de 56.6, 63.4 y 68.7%, respectivamente. Adicionalmente, la poliploidía se asocia fuertemente con alteraciones en la expresión del gen *p53* (Sinicrope *et al.*, 2006). En este sentido, células de cáncer de colon *p53^{-/-}* en contraste con células *p53^{+/+}* presentan mayor resistencia a terapias apoptóticas como 5-FU y oxaliplatín pero no en aquellas tratadas con CPT-11 (Boyer *et al.*, 2004). La pérdida de *p53* está relacionado con la disminución en la expresión de la proteína de superficie inductora de apoptosis extrínseca FAS regulado por STAT1, evadiendo así la muerte celular (McDermott *et al.*, 2005). Cabe mencionar, que mutaciones que generen una proteína de *p53* truncada se asocian

con mayor actividad invasiva y una mala prognosis, dependiendo de la localización del tumor siendo especialmente peligrosos en tumores encontrados en la porción distal del colon (Russo *et al.*, 2005).

Esto les confiere a las células de adenocarcinoma de colon Caco-2 un fenotipo agresivo que puede evadir la muerte celular y tener un potencial metastásico alto, siendo más resistentes a la apoptosis que las células HCT 116. Estos datos coinciden con el efecto citotóxico del extracto lipídico de la semilla de aguacate nativo utilizado en este trabajo, ya que las células HCT 116 fueron más sensibles al mismo.

Finalmente, en este estudio se analizó el mecanismo citotóxico que poseían las moléculas lipídicas de semilla de aguacate sobre las células Caco-2. Fue posible detectar un aumento en la generación de ROS y subsecuente daño en la mitocondria, además de que se asoció con la disminución de la tasa de oxidación de ácidos grasos. El arresto del ciclo celular en la fase G0/G1 se relacionó con la modulación de la expresión de moléculas reguladoras del ciclo celular como la ciclina D1 y p21. Adicionalmente, se observó la modulación de la respuesta inflamatoria, regulando la expresión de citocinas pro- y anti-inflamatorias. En este sentido, sería de gran importancia analizar el mecanismo inducido en las células HCT 116 por el extracto lipídico y determinar si éste pudiera estar activando diferentes mecanismos de acción en distintos tipos celulares. Adicionalmente, no se descarta la posibilidad de evaluar el efecto y mecanismo citotóxico del extracto lipídico de aguacate inducido en células normales.

9. CONCLUSIÓN GENERAL

En el presente estudio se determinó el efecto citotóxico de un extracto rico en moléculas lipídicas de cadena larga obtenidas de la semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) sobre las líneas celulares de cáncer de colon Caco-2 y HCT 116, el cual fue dependiente de la concentración. Adicionalmente, en la línea celular Caco-2 se determinó que la citotoxicidad se debe a una detención del ciclo celular en la fase G0/G1 y la activación de la apoptosis dependiente de caspasas generado por cambios metabólicos, además de una modulación en la expresión de citocinas relacionadas con la respuesta inflamatoria.

10. REFERENCIAS COMPLEMENTARIAS

- ACS. (2017). Key Statistics for Colorectal Cancer.
- Adeyemi, O. O., Okpo, S. O. y Ogunti, O. O. (2002). Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill. (Lauraceae). *Fitoterapia*, 73(5), 375–380.
- Ahmed, D., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Danielsen, S. A., Eknæs, M., Hektoen, M. y Lothe, R. A. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, 2(424). <https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.35>
- Alali, F. Q., Liu, X. X. y McLaughlin, J. L. (1999). Annonaceous acetogenins: Recent progress. *Journal of Natural Products*, 62(3), 504–540. <https://doi.org/10.1021/np980406d>
- Alberts, B., Johnson, A. y Lewis, J. (2002). Cancer treatment: Present and future. In *Molecular Biology of the Cell* (4th edition). New York: Garland Science. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26811/>
- Alhopuro, P., Alazzouzi, H., Sammalkorpi, H., Dávalos, V., Salovaara, R., Hemminki, A. y Arango, D. (2005). SMAD4 levels and response to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 11(17), 6311–6316. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0244>
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T. y Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research*, 25(9), 2097–116. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9661-9>
- Apte, R. N., Dotan, S., Elkabets, M., White, M. R., Reich, E., Carmi, Y. y Voronov, E. (2006). The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Review*, 25, 387–408. <https://doi.org/10.1007/s10555-006-9004-4>
- Arends, M. J. y Hons, M. B. C. (2013). Pathways of colorectal carcinogenesis. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 21(2), 97–102.
- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. y Bray, F. (2016). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 1–9. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912>
- Au, R. Y., Al-Talib, T. K., Au, a. Y., Phan, P. V. y Frondoza, C. G. (2007). Avocado soybean unsaponifiables (ASU) suppress TNF- α , IL-1 β , COX-2, iNOS gene expression, and prostaglandin E2 and nitric oxide production in articular chondrocytes and monocyte/macrophages. *Osteoarthritis and Cartilage*, 15, 1249–1255. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2007.07.009>

- Báez-Magaña, M. (2014). Efecto de los ácidos grasos de semilla de aguacate y sus derivados sobre la respuesta inmune innata durante la internalización de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Báez-Magaña, M., Díaz-Murillo, V., López-Meza, J. E. y Ochoa-Zarzosa, A. (2018). Immunomodulatory effects of thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* on bovine mammary epithelial cells. *International Immunopharmacology*, 57(September 2017), 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.02.001>
- Baraona, C. M. y Sancho, B. E. (2000). Aguacate y mango. Fruticultura especial. Editorial Universidad Estatal a distancia.
- Barton, G. M. (2008). A calculate response: control of inflammation by the innate immune system. *Journal of Clinical Investigation*, 118(2), 413–420. <https://doi.org/10.1172/JCI34431>
- Beeharry, N., Lowe, J. E., Hernandez, A. R., Chambers, J. a, Fucassi, F., Cragg, P. J. y Green, I. C. (2003). Linoleic acid and antioxidants protect against DNA damage and apoptosis induced by palmitic acid. *Mutation Research*, 530(1–2), 27–33. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(03\)00134-9](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(03)00134-9)
- Beloribi-Djefafia, S., Vasseur, S. y Guillaumond, F. (2016). Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis*, 5(1), e189. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2015.49>
- Belpomme, D., Irigaray, P., Hardell, L., Clapp, R., Montagnier, L., Epstein, S. y Sasco, A. J. (2007). The multitude and diversity of environmental carcinogens. *Environmental Research*, 105(3), 414–29. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2007.07.002>
- Bergh, B. y Ellstrand, N. (1986). Taxonomy of the Avocado. *California Avocado Society Yearbook*, 70, 135–146.
- Bertazza, L. y Mocellin, S. (2010). The Dual Role of Tumor Necrosis Factor (TNF) in Cancer Biology. *Current Medicinal Chemistry*, 17, 3337–3352.
- Bora S.P., Narain, N., Rocha R.V.M., P. M. Q., Bora, P. S., Narain, N., Rocha, R. V. M. y Queiroz Paulo, M. (2001). Characterization of the oils from the pulp and seeds of avocado (cultivar: Fuerte) fruits. *Grasas y Aceites*, 52(3–4), 171–174. <https://doi.org/10.3989/gya.2001.v52.i3-4.353>
- Boyer, J., McLean, E. G., Aroori, S., Wilson, P., McCulla, A., Carey, P. D. y Johnston, P. G. (2004). Characterization of p53 wild-type and null isogenic colorectal cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil, oxaliplatin, and irinotecan. *Clinical Cancer Research*, 10(6), 2158–2167. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0362>

- Butt, A. J., Roberts, C. G., Seawright, A. a, Oelrichs, P. B., Macleod, J. K., Liaw, T. Y. E. y Sutherland, R. L. (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. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0170>
- Cain, K., Bratton, S. B. y Cohen, G. M. (2002). The Apaf-1 Apoptosome: a Large Caspase-activating Complex. *Biochimie*, 84, 203–14.
- Campbell, N. y Reece, J. (2007). *Biología* (7th edition). Médica Panamericana.
- Carracedo, A., Cantley, L. C. y Pandolfi, P. P. (2013). Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nature Reviews Cancer*, 13(1474–1768 (Electronic)), 227–232. <https://doi.org/10.1038/nrc3483.Cancer>
- Commins, S. P., Borish, L. y Steinke, J. W. (2010). Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S53–S72. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.008>
- D'Ambrosio, S. M., Han, C., Pan, L., Douglas Kinghorn, A., Ding, H., 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. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.027>
- 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), 6133–40. <https://doi.org/10.2174/1381612811319340007>
- Dakubo, G. D. (2010). The Warburg phenomenon and other metabolic alterations of cancer cells. In *Mitochondrial Genetics and Cancer* (pp. 1–356). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-11416-8>
- De Bosscher, K., Hill, C. S. y Nicolás, F. J. (2004). Molecular and functional consequences of Smad4 C-terminal missense mutations in colorectal tumour cells. *The Biochemical Journal*, 379(Pt 1), 209–216. <https://doi.org/10.1042/BJ20031886>
- Deberardinis, R. J., Mancuso, A., Daikihin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S. y Thompson, C. B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *PNAS*, 104(49), 19345–19250. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.0709747104>

- Ding, H., Chin, Y. W., Kinghorn, A. D., Ambrosio, S. M. D. y D'Ambrosio, S. M. (2007). Chemopreventive characteristics of avocado fruit. *Seminars in Cancer Biology*, 17(5), 386–394. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2007.04.003>
- Ding, H., Han, C., Guo, D., Chin, Y.-W., Ding, Y., Kinghorn, D. y D'Ambrosio, S. M. (2009). Selective induction of apoptosis of human oral cancer cell lines by avocado extracts via a ROS-mediated mechanism. *Nutrition and Cancer*, 61(3), 348–56. <https://doi.org/10.1080/01635580802567158>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Fleming, N. I., Jorissen, R. N., Mouradov, D., Christie, M., Sakthianandeswaren, A., Palmieri, M. y Burgess, A. W. (2013). SMAD2, SMAD3 and SMAD4 mutations in colorectal Cancer. *Molecular and Cellular Pathobiology*, 73(2), 725–736. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2706>
- Folaranmi, O. M. (2014). Effect of liquid extract of pear avocado leaf (*Persea americana*) on plasma levels of aminotransferases, cholesterol and total bile acids in hypertensive patients. *International Journal of Composite Materials*, 4(3), 87–91. <https://doi.org/10.5923/j.ajmms.20140403.01>
- Frank, S. A. (2007). Multistage Progression. In *Dynamics of Cancer: Incidence, Inheritance and Evolution*. Princeton University Press.
- Freed-Pastor, W. A. y Prives, C. (2012). Mutant p53: one name, many proteins. *Genes & Development*, 26(12), 1268–86. <https://doi.org/10.1101/gad.190678.112>
- Gaur, U. y Aggarwal, B. B. (2003). Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochemical Pharmacology*, 66, 1403–1408. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00490-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00490-8)
- GLOBOCAN. (2012). Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Retrieved from <http://globocan.iarc.fr/Pages/online.aspx>
- Gorinstein, S., Haruenkit, R., Poovarodom, S., Vearasilp, S., Ruamsuke, P., Namiesnik, J. y Ping, S. G. (2010). Some analytical assays for the determination of bioactivity of exotic fruits. *Phytochemical Analysis*, 21, 355–362.
- Gupta, A., Shah, D., Seth, N., Pandey, S. y Yadav, J. (2011). Annonaceous acetogenins: The unrevealed area for cytotoxic and pesticidal activities. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 2(2), 104. <https://doi.org/10.4103/0975-8453.86299>

- Haggar, F. A. y Boushey, R. P. (2009). Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 22(4), 191–197. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1242458>.
- Half, E., Bercovich, D., Rozen, P. y Half, E. E. (2009). Familial adenomatous polyposis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 4(22), 1–23. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-4-22>
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harada, H. y Grant, S. (2003). Apoptosis regulators. *Reviews in Clinical and Experimental Hematology*, 7(2), 117–138.
- Hecht, S. S. (1999). Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 91(14), 1194–1210. <https://doi.org/10.1093/jnci/91.14.1194>
- Hensley, C. T., Wasti, A. T. y Deberardinis, R. J. (2013). Glutamine and cancer: cell biology, physiology and clinical opportunities. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(9), 3678–3684. <https://doi.org/10.1172/JCI69600.3678>
- Hernández, M. R., & Gally, J. M. (1981). Plantas medicinales. Editorial Árbol.
- Hirscheya, M., DeBerardinis, R., Mae, A., Diehl, E., Drewe, J., Frezzaf, C. y Wellent, K. (2015). Dysregulated metabolism contributes to oncogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 25, 5129–5150.
- Ilyas, M., Tomlinson, I. P., Rowan, A., Pignatelli, M. y Bodmer, W. F. (1997). Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(19), 10330–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.19.10330>
- INECOL. (2015). Plantas medicinales de La Matamba y El Piñonal, municipio de Jamapa, Veracruz. (P. E. Escamilla & C. P. Moreno, Eds.). INECOL.
- Irigaray, P., Newby, J. A., Clapp, R., Hardell, L., Howard, V., Montagnier, L. y Belpomme, D. (2007). Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 61(10), 640–58. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2007.10.006>
- Ji, J., Zhang, L., Wang, P., Mu, Y. M., Zhu, X. Y., Wu, Y. Y. y Sun, X. Z. (2005). Saturated free fatty acid, palmitic acid, induces apoptosis in fetal hepatocytes in culture. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 56(6), 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2005.02.003>
- Johnson, C. M., Wei, C., Ensor, J. E., Smolenski, D. J., Christopher, I., Levin, B. y Berry, D. A. (2013). Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer*

- Causes Control, 24(6), 1207–1222. <https://doi.org/10.1007/s10552-013-0201-5>. Meta-analyses
- Johnson, I. T. (2007). Phytochemicals and cancer. *Proceedings of the Nutrition Society*, (66), 207–215. <https://doi.org/10.1017/S0029665107005459>
- Jun-Ming, Z. y Jianxiong, A. (2009). Cytokines, inflammation and pain. *International Anesthesiology Clinics*, 69(2), 482–489. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>. Cytokines
- Khambete, N. y Kumar, R. (2014). Carcinogens and cancer preventors in diet. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 4(1), 4. <https://doi.org/10.4103/2231-0738.124609>
- Khan, N. P., Pandith, A., Hussain, M., Yousuf, A., Khan, M., Siddiqi, A. y Mudassar, S. (2011). Loss of heterozygosity (LOH) of deleted in colorectal cancer (DCC) gene and predisposition to colorectal cancer: Significant association in colorectal cancer patients of Kashmir. *Journal of Cancer Research and Experimental Oncology*, 3(8), 88–94. <https://doi.org/10.5897/JCREO11.033>
- Kim, O. K., Murakami, A., Nakamura, Y., Takeda, N., Yoshizumi, H. y Ohigashi, H. (2000). Novel nitric oxide and superoxide generation inhibitors, persenone A and B, from avocado fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1557–1563. <https://doi.org/10.1021/jf990977r>
- Kucharz, E. J. (2003). Application of avocado/soybean unsaponifiable mixtures (piascledine) in treatment of patients with osteoarthritis. *Ortopedia, Traumatologia, Rehabilitacja*, 5(2), 248–251.
- Kutikhin, A. G., Yuzhalin, A. E. y Brusina, E. B. (2013). Infectious agents and cancer. Springer Netherlands. Kutikhin, A. G., Yuzhalin, A. E., & Brusina, E. B. (2013). Infectious agents and cancer. Springer Netherlands.
- Lebrun, J. (2012). The dual role of TGF β in human cancer: From tumor suppression to cancer metastasis, 2012. <https://doi.org/10.5402/2012/381428>
- Lee, C., Lin, Y., Chang, W., Lin, P., Wu, Y. y Chang, J. (2011). Squamocin modulates histone H3 phosphorylation levels and induces G1 phase arrest and apoptosis in cancer cells. *BMC Cancer*, 11(1), 58. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-58>
- Lee, E. W., Seo, J., Jeong, M., Lee, S. y Song, J. (2012). The roles of FADD in extrinsic apoptosis and necroptosis. *BMB Reports*, 45(9), 496–508. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2012.45.9.186>
- Lewis, A., Varghese, S., Xu, H. y Alexander, R. (2006). Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel

- therapeutic agent in cancer treatment. *Journal of Translational Medicine*, 4(48), 1–12. <https://doi.org/doi:10.1186/1479-5876-4-48>
- Liberti, M. V. y Locasale, W. (2016). The warburg effect: How does it benefit cancer cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>.The
- Lima, C. R., Vasconcelos, C. F. B., Costa-Silva, J. H., Maranchao, C. A., Costa, J., Batistaa, T. M. y Wanderley, A. G. (2012). Anti-diabetic activity of extract from *Persea americana* Mill. leaf via the activation of protein kinase B (PKB/Akt) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 141, 517–525.
- Lin, W. y Karin, M. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer, 117(5). <https://doi.org/10.1172/JCI31537>.data
- Llor, X., Pons, E., Roca, A., Alvarez, M., Mañé, J., Fernández-Bañares, F. y Gassull, M. (2003). The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 22(1), 71–79. <https://doi.org/10.1054/clnu.2002.0627>
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H. y Amon, A. (2013). *Molecular cell biology* (7th ed). New York: W. H. Freeman and Company.
- Louie, S., Roberts, L. y Nomura, D. K. (2013). Mechanisms linking obesity and cancer. *Molecular and Cell Biology*, 1831(10), 1499–508. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2013.02.008>
- Luo, X., Cheng, C., Tan, Z., Li, N., Tang, M., Yang, L. y Cao, Y. (2017). Emerging roles of lipid metabolism in cancer metastasis. *Molecular Cancer*, 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0646-3>
- McDermott, U., Longley, D. B., Galligan, L., Allen, W., Wilson, T. y Johnston, P. G. (2005). Effect of p53 status and STAT1 on chemotherapy-induced, fas-mediated apoptosis in colorectal cancer. *Cancer Research*, 65(19), 8951–8960. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0961>
- McIlwain, D. R., Berger, T. y Mak, T. W. (2015). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(4), 1–29. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026716>
- Merikli, F., Becer, E., Kabadayı, H., Hanoglu, A., Hanoglu, D. Y., Yavuz, D. O. y Vatansever, S. (2017). Fatty acid composition and anticancer activity in colon carcinoma cell lines of *Prunus dulcis* seed oil. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1239–1248.

- Moudi, M., Go, R., Yong, S. Y. C. y Nazre, M. (2013). Vinca alkaloids. *International Journal of Preventive Medicine*, 4(11), 1231–1235.
- Mu, Y. M., Yanase, T., Nishi, Y., Tanaka, A., Saito, M., Jin, C. H. y Nawata, H. (2001). Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells. *Endocrinology*, 142(8).
- Muñoz, A. (1997). *Cáncer: genes y nuevas técnicas*. Madrid: Editorial Hélice.
- Murphy, K. y Weaver, C. (2017). *Janeways's immunobiology* (9th edition). Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC. Pp. 927
- Murray, M., Hraiki, A., Bebawy, M., Pazderka, C. y Rawling, T. (2015). Anti-tumor activities of lipids and lipid analogues and their development as potential anticancer drugs. *Pharmacology & Therapeutics*. 150. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.01.008>.
- Nelson, D. L. y Cox, M. M. (2008). Lipids. In Lehniger. *Principles of biochemistry* (5 ed., pp. 343–370). W. H. Freeman and Company.
- Oberlies, N. H., Rogers, L. L., Martin, J. M. y McLaughlin, J. L. (1998). Cytotoxic and insecticidal constituents of the unripe fruit of *Persea americana*. *Journal of Natural Products*, 61(98), 781–785. <https://doi.org/10.1021/np9800304>
- Oliveira, A. P. De, Franco, E. D. S., Barreto, R. R., Cordeiro, D. P., Melo, R. G. De, Maria, C. y Maia, D. S. (2013). Effect of semisolid formulation of *Persea americana* Mill. (avocado) oil on wound healing in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2013.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F., Zhou, T., Liu, B. y Bao, J. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis, (15), 487–498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x>
- Qayed, W. S., Aboraia, A. S., Abdel-rahman, H. M. y Youssef, A. F. (2015). Annonaceous acetogenins as a new anticancer agent. *Pharma Chemica*, 7(6), 24–35.
- Qu, Q., Zeng, F., Liu, X., Wang, Q. J. y Deng, F. (2016). Fatty acid oxidation and carnitine palmitoyltransferase I: Emerging therapeutic targets in cancer. *Cell Death and Disease*, 7(5), 1–9. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.132>
- Ravindran, J., Prasad, S. y Aggarwal, B. B. (2009). Curcumin and cancer cells: How many ways can curry kill tumor cells selectively?, 11(3), 495–510. <https://doi.org/10.1208/s12248-009-9128-x>
- Renehan, A. G. (2010). Obesity and cancer. *Adipose Tissue in Health and Disease*, 369–384. <https://doi.org/10.1002/9783527629527.ch19>

- Ricote, M., García-Tuñón, I., Bethencourt, R., Fraile, B., Paniagua, R. y Royuela, M. (2004). Interleukin-1 (IL-1_α and IL-1_β) and its receptors (IL-1RI, IL-1RII, and IL-1Ra) in prostate carcinoma. *Cancer*, 100(7).
- Rodríguez-López, C. E., Hernández-Brenes, C. y Días de la Garza, R. (2015). A targeted metabolomics approach to characterize acetogenin profiles in avocado fruit (*Persea americana* Mill.). *Royal Society of Chemistry*, 5, 106019–106029. <https://doi.org/10.1039/C5RA22854A>
- Rodríguez-Sánchez, D., Silva-Platas, C., Rojo, R. P., 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. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.10.013>
- Rodríguez-Saona, C. (2000). Biologically active aliphatic acetogenins from specialized idioblast oil cells. *Current Organic Chemistry*, 4(1249–1260).
- Rodríguez, B., Lin, E. y Crane, C. (2003). Genetic pathways in colorectal cancer. In D. Kufe, R. Pollock, & R. Weichselbaum (Eds.), *Holland-Frei Cancer Medicine* (6th edition). BC Decker.
- Röhrig, F. y Schulze, A. (2016). The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 16(11), 732–749. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.89>
- Rosenblat, G., Meretski, S., Segal, J., Tarshis, M., Schroeder, A., Zanin-Zhorov, A. y 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(4), 239–246. <https://doi.org/10.1007/s00403-010-1088-6>
- Ruddon, R. W. (2007). *Cancer biology*. Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki (4th edition). New York: Oxford, University Press.
- Russo, A., Bazan, V., Iacopetta, B., Kerr, D., Soussi, T. y Gebbia, N. (2005). The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: Influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *Journal of Clinical Oncology*, 23(30), 7518–7528. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.00.471>
- Sasaki, T., Hiroki, K. y Yamashita, Y. (2013). The role of epidermal growth factor receptor in cancer metastasis and microenvironment. *BioMed Research International*, 2013.
- SAGARPA. (2015). Michoacán aporta el 85.9% del aguacate en el país.

- Salazar, R., Roepman, P., Capella, G., Moreno, V., Simon, I., Dreezen, C. y Tollenaar, R. (2011). Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 29(1), 17–24. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.1077>
- Samani, A. A., Yakar, S., LeRoith, D. y Brodt, P. (2006). The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocrine Reviews*, 28(1), 20–47.
- Scalise, M., Pochini, L., Galluccio, M., Console, L. y Indiveri, C. (2017). Glutamine transport and mitochondrial metabolism in cancer cell growth. *Frontiers in Oncology*, 7(December), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00306>
- Schell, M. J., Yang, M., Teer, J. K., Lo, F. Y., Madan, A., Coppola, D. y Yeatman, T. J. (2016). A multigene mutation classification of 468 colorectal cancers reveals a prognostic role for APC. *Nature Communications*, 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms11743>
- Sehgal, R., Sheahan, K., Connell, P. R. O., Hanly, A. M., Martin, S. T. y Winter, D. C. (2014). Lynch syndrome: An updated review. *Genes*, 5, 497–507. <https://doi.org/10.3390/genes5030497>
- Seigler, D. S. (2002). Secondary metabolism. *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6754-9_15212
- Shalpour, S. y Karin, M. (2015). Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *Journal of Clinical Investigation*, 125(9), 3347–3355. <https://doi.org/10.1172/JCI80007>.The
- Sinicrope, F. A., Rego, R. L., Halling, K. C., Foster, N., Sargent, D. J., La Plant, B. y Witzig, T. E. (2006). Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. *Gastroenterology*, 131(3), 729–737. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.06.005>
- Stadler, M. L. (2008). *Food therapy*. Natural Medicine Books.
- Tanaka, T. (2009). Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *Journal of Carcinogenesis*, 8(5).
- Thoppil, R. J. y Bishayee, A. (2011). Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer agents in liver cancer. *World Journal of Hepatology*, 3(9), 228–249. <https://doi.org/10.4254/wjh.v3.i9.228>
- Tirinato, L., Pagliari, F., Limongi, T., Marini, M., Falqui, A., Seco, J. y Di Fabrizio, E. (2017). An overview of lipid droplets in cancer and cancer stem cells. *Stem Cells International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1656053>

- Todorovic-Rakovic, N. y Milovanovic, J. (2013). Interleukin-8 in breast cancer progression. *Journal of Interferon Cytokine Research*, 33(10), 563–570. <https://doi.org/doi: 10.1089/jir.2013.0023>
- Toro-Equihua, M. Del, Velasco-Rodríguez, R. y Clemente, V. (2016). Effect of an avocado oil-enhanced diet (*Persea americana*) on sucrose-induced insulin resistance in Wistar rats. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24, 350–357. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.11.005>
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T. y Pennington, D. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843, 2563–2582.
- Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I. y Kerr, D. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*, 9(7), 489–499. <https://doi.org/10.1038/nrc2645>
- Wang, C. y Youle, R. (2009). The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annual Review of Genetics*, 43, 95–118. <https://doi.org/doi:10.1146/annurev-genet-102108-134850>
- Wang, Z. y Fang, J. (2014). Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: Epidemiology, pathogenesis and surveillance. *Gastro Intestinal Tumors*, 1, 146–154. <https://doi.org/10.1159/000365309>
- Waugh, D. J. y Wilson, C. (2008). The Interleukin-8 pathway in cancer. *Molecular Pathways*, 8(21), 6735–6741. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4843>
- West, N. R., Mccuaig, S., Franchini, F. y Powrie, F. (2015). Emerging cytokine networks in colorectal cancer. *Nature Reviews Immunology*, 15, 615–629. <https://doi.org/10.1038/nri3896>
- White, L. B. y Foster, S. (2004). *El recetario herbario*. Rodale.
- WHO. (2015). Cancer. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Witsch, E., Sela, M. y Yarden, Y. (2011). Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology*, 25(2), 85–101. <https://doi.org/10.1152/physiol.00045.2009.Roles>
- Xu, Y. y Qian, S. Y. (2014). Anti-cancer activities of ω -6 polyunsaturated fatty acids. *Biomed J*, 37(3), 112–119.
- Yuan, A., Chen, J. y Yang, P. (2005). The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction, 1(10), 853–865.

- Yuan, S. S. F., Chang, H. L., Chen, H. W., Yeh, Y. T., Kao, Y. H., Lin, K. H. y Su, J. H. (2003). Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. *Life Sciences*, 72(25), 2853–2861. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00190-5](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00190-5)
- Zhang, T., Otevrel, T., Gao, Z., Gao, Z., Ehrlich, S. M., Fields, J. Z. y Boman, B. M. (2001). Evidence that APC regulates survivin expression: A possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Advances in Brief*, 62, 8664–8667.