

00346 5



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO DE AZAFRÁN CROCUS  
SATIVUS L. SOLO Y EN COMBINACIÓN CON EL SELENITO DE SODIO  
EN CULTIVOS DE CÉLULAS CANCERÍGENAS HUMANAS IN VITRO**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:**  
**MAESTRA EN CIENCIAS**  
**(BIOLOGIA CELULAR)**  
**P R E S E N T A :**  
**LETICIA RIVERON NEGRETE**

**DIRECTOR DE TESIS:**  
**DR. FIKRAT ABDULLAEV JAFAROVA**

**MÉXICO, D.F.**

**SEPTIEMBRE 2003**

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **DEDICATORIA**

**A mis padres: Rosa y Mario\***

**Mis hermanos: Rosa, Mario, Diana, Jesús, Maricruz, Georgina\*, Rita y Laura.**

**Mis sobrinos: Maricruz Georgina, Jesús, Carolina, José Angel, José Mario y Mario**

**A Pablo Granados Díaz.**

**Porque la educación, el apoyo, comprensión, superación y amor, los recibo de ellos.**

**A todos mis profesores y compañeros que a lo largo de mi vida académica y profesional, me transmiten su conocimiento para lograr esta meta.**

**A la U.N.A.M y el Instituto Nacional de Pediatría con gratitud y respeto.**

B

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Dr. Fikrat Abdullaev por su supervisión, revisión, paciencia, consejos, planeación y realización de la tesis.**

**A Dr. Roberto Rivera Luna, Javier Espinosa Aguirre, Ma. Eugenia Gosebatt y Alejandro García Carrancá, por su tiempo, conocimientos y acertadas sugerencias y observaciones.**

**A todos mis compañeros de trabajo que me ayudaron de alguna manera con sus consejos y aportaciones**

**Al apoyo recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Proyecto 28513**

## INDICE

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Antecedentes	5
2.1. Características generales del azafrán <i>Crocus sativus</i> L.	6
2.1.1. Características generales de los estigmas de <i>Crocus sativus</i> L.	7
2.1.2. Usos del azafrán	8
2.1.3. Importancia del azafrán en la medicina tradicional	8
2.1.4. Características químicas del azafrán	10
2.1.5. Importancia del azafrán en el área farmacológica	13
2.1.6. Efecto citotóxico del azafrán <i>in vivo</i>	13
2.1.7. Efecto citotóxico del azafrán <i>in vitro</i>	14
2.1.8. Efecto del extracto de azafrán sobre la síntesis macromolecular	15
2.1.9. Efecto citotóxico de algunos componentes del extracto de azafrán	17
2.2. Características generales del selenio	18
2.2.1. Efecto biológico del selenio	18
2.2.2. Actividad antioxidante e inmunológica del selenio	19
2.2.3. Efectividad del selenio para evitar la carcinogénesis	19
2.2.4. Compuestos del selenio que actúan como quimiopreventivos al ser metabolizados	20
2.2.5. Posibles mecanismos de acción del selenio	21
3. Justificación	24
4. Hipótesis	25
5. Objetivo general	25
5.1. Objetivos específicos	25
6. Material y métodos	26
6.1. Reactivos	26

1

6.2. Material desechable	26
6.3. Material biológico	26
6.3.1. Carcinoma hepatocelular humano	27
6.3.2. Carcinoma de colon humano	27
6.3.3. Adenocarcinoma de cerviz humano	27
6.3.4. Rbdomiosarcoma	28
6.4. Obtención del extracto de azafrán	28
6.5. Separación de los componentes por HPLC	28
6.6. ensayo de formación de colonias celulares	29
6.7. Determinación de la síntesis de ácidos nucleicos en las células	30
6.8. Análisis estadístico	31
7. Resultados	32
7.1. Efecto citotóxico del extracto de azafrán en diferentes células tumorales humanas <i>in vitro</i>	32
7.2. Separación de los componentes del azafrán y su efecto citotóxico	37
7.3. Efecto citotóxico del selenito de sodio en diferentes células tumorales humanas <i>in vitro</i>	41
7.4. Efecto citotóxico de la combinación del azafrán y selenito de sodio en células tumorales humanas <i>in vitro</i>	46
7.5. Efecto inhibitorio en la síntesis de ácidos nucleicos en células cancerígenas humanas con extracto de azafrán en combinación con el selenito de sodio	53
8. Discusión	57
9. Conclusión	63
10. Referencias	64

E

## RESUMEN

Se analizó *in vitro* el efecto citotóxico que provocó el extracto de azafrán y el selenito de sodio en la formación de colonias de adenocarcinoma de colon (SW480), adenocarcinoma de cervix uterino (HeLa), rabdomiosarcoma (A-204) y carcinoma hepatocelular (HepG<sub>2</sub>), las concentraciones que se ocuparon fueron de 10 a 200  $\mu\text{M}$  con selenito de sodio y de 50 a 400  $\mu\text{g/ml}$  con el extracto de azafrán, cuando se les combinó las concentraciones utilizadas fueron las menores. Los resultados obtenidos demostraron que en las células estudiadas se presentó un comportamiento dosis dependiente con los dos agentes solos y en su combinación, así como la inhibición en la formación de sus colonias; se obtuvo sus IC<sub>50</sub> que fueron de 144 a 187  $\mu\text{M}$  de selenito de sodio y de 98 a 220  $\mu\text{g/ml}$  de extracto de azafrán. Posteriormente se separaron y aplicaron doce componentes del extracto de azafrán en células de adenocarcinoma de cervix donde todos lograron inhibir el crecimiento celular, siendo el componente trans crocina 3 el que obtuvo mayor efecto citotóxico. Finalmente se analizó por incorporación de marcadores radiactivos con [<sup>3</sup>H] Timidina y [<sup>3</sup>H] Uridina, la síntesis de ácidos nucleicos en tres líneas celulares donde se logró determinar que existió una inhibición en su síntesis de DNA y RNA. Los resultados indican que estos agentes inhiben el crecimiento de células cancerígenas humanas *in vitro*, donde el carcinoma hepatocelular es el más resistente al extracto de azafrán y las de adenocarcinoma epitelial de cervix al selenito de sodio. Además, todas las células presentaron una disminución en su proliferación por la inhibición en la síntesis de sus ácidos nucleicos, ya que el extracto de azafrán posee una gran cantidad de componentes que actúan como carotenoides y al selenito de sodio que interactúa con los radicales libres celulares formando selenotrisulfuros que inhibieron los efectos causados por la oxidación celular y al combinarlos presentan un efecto aditivo.

## **ABSTRACT**

This study was designed to compare the effects of naturally occurring plant (saffron) extract alone and in combination with selenium compound (sodium selenite) on colony formation and nucleic acid synthesis of different human cultured malignant cells. Results of these experiments demonstrated that saffron and sodium selenite by themselves show a dose-dependent inhibitory effect on colony formation and DNA and RNA synthesis of malignant cells. Saffron in combination with sodium selenite display additive inhibitory effect on colony formation and nucleic acid synthesis in these tumor cells at low concentration of both agents. This results suggest the potential use of saffron as an anticancer agent, alone or in combination with sodium selenite.

**Keywords:** saffron ( *Crocus sativus L* ), sodium selenite, cytotoxicity, chemoprevention



## 1. INTRODUCCION

El cáncer ocupa la segunda causa de mortalidad a nivel mundial. Los índices reportados anualmente son superiores a los 6 millones de personas con algún tipo de cáncer y el 23% mueren por ésta enfermedad, solo los padecimientos cardiovasculares presentan índices superiores a los antes mencionados.

De acuerdo con los datos reportados por el INEGI (2002), en nuestro país se ha incrementado el porcentaje de mortalidad por cáncer del 8.4 a 12.8 %, entre los años 1985 y 2000 (cuadro 1.1.) Este aumento no está dado por el incremento total de la población, ni por la tasa de mortalidad total la cual se ha mantenido constante, sino específicamente para ésta enfermedad.

**Cuadro 1.1. Reporte quinquenal de muertes causadas por cáncer en la población total de México.**

<b>Año</b>	<b>Población total</b>	<b>Muertes totales registradas</b>	<b>Muerte por cáncer registradas</b>	<b>% muerte por cáncer</b>
1985	77,938,296	416,357	34,974	8.4
1990	81,249,645	424,412	41,168	9.7
1995	91,158,290	423,000	48,222	11.4
2000	102,377,645	437,664	56,021	12.8

Algunas alternativas que se emplean para poder controlar, disminuir o erradicar dicha enfermedad, son: la cirugía y los tratamientos como la quimioterapia y la radioterapia. Sin embargo no han resultado ser totalmente satisfactorios, por lo que la enfermedad del cáncer nos sigue superando.

Los avances en el estudio de la carcinogénesis, bioquímica, biología molecular y ensayos clínicos han tratado de proveer nuevas alternativas como la quimioprevención, que puede prevenir, revertir o detener el desarrollo carcinogénico,

empleando agentes sintéticos o naturales, solos o en combinación (Abdullaev, 2001) que actúen como nuevos compuestos antitumorales y antimutagénicos, con énfasis en el mecanismo de acción, eficacia preclínica e interés para el área clínica.

Entre los agentes sintéticos conocidos está el selenio y sus derivados como el selenito, el bióxido de selenio y el selenato, entre otros, que se utilizan como químicos para la prevención del cáncer, y entre las ventajas que proporcionan es un costo económico, su accesible uso y se requiere de concentraciones muy bajas (ppm) en los tratamientos donde se les ocupa, aunque presentan la desventaja de causar cierta toxicidad en las células normales.

Por otro lado, estudios recientes demuestran que algunos agentes naturales presentan una acción selectiva, para inhibir el crecimiento de tumores con propiedades biofarmacológicas, porque poseen componentes que no causan toxicidad a las células normales, pero su obtención es costosa ( Basker, 1983; Ríos, 1996).

Entre estos compuestos o agentes naturales se encuentra el azafrán, que se obtiene de los estigmas de la flor de *Crocus sativus L.* y ha demostrado tener capacidad anticarcinogénica (efecto inhibitorio en la inducción de cáncer por agentes químicos) y antitumoral (efecto inhibitorio en el crecimiento de células malignas) en sistemas biológicos *in vivo* e *in vitro* (Abdullaev, 2002).

Una alternativa para reducir los efectos indeseables de los compuestos sintéticos y probar los naturales, sería su combinación; de ésta forma se podría reducir la toxicidad de los primeros y el costo de los segundos sin perder su efectividad, logrando una nueva propuesta para prevenir o tratar a los padecimientos causados por el cáncer e implementarlo en los tratamientos quimiopreventivos.

## 2. ANTECEDENTES

Constantemente se han incrementado los extractos de origen natural en el área de farmacología para crear nuevos fármacos, pero muchos de éstos han sido depurados, entre otras razones porque poseen compuestos muy complejos difíciles de caracterizar estructural y funcionalmente; sin embargo la biotecnología, tiene contemplado la elaboración de moléculas bioactivas con especies de origen vegetal que contengan compuestos específicos y permitan producirlos en forma masiva como una manera de ayudar a la medicina, teniendo como prioridad las enfermedades con mayor índice de mortalidad como son las cardiovasculares y el cáncer (Wattenberg, 1990).

En la actualidad, más de la mitad de los fármacos utilizados en tratamientos para cualquier patología provienen de uno o varios productos naturales que sirven de modelo para desarrollar los compuestos químicos sintéticos, entre los que pueden citarse a más de 250 000 especies de plantas y de éstas unas 600 se ocupan en el área oncológica. Los compuestos más conocidos son: los carotenoides, sulfuros, esteroides saponificantes, terpenos, fitoestrogenos, flavonoides e inhibidores de proteasas entre otros (Popoca, 1998; Prashar, 1998; Abdullaev, 2002 ).

La quimioprevención también ha desarrollado fármacos de origen natural con acción selectiva para causar la menor toxicidad posible al organismo en los tratamientos que se realicen en contra del cáncer, además ofrece prevenir la carcinogénesis, daños del DNA en personas con un alto riesgo genético para desarrollar algún tipo de neoplasia y crear tratamientos en donde existen lesiones precancerosas (Grenwald, 1996; Stoner, 1997; Swan, 1997).

Entre los agentes quimiopreventivos se encuentra el extracto de azafrán (*Crocus sativus L.* ) que ha demostrado poseer propiedades para inhibir el desarrollo de varios tipos de células cancerosas *in vivo e in vitro* (Abdullaev 1991; Nair, 1992; Tarantilis, 1995)

## 2.1 Características generales del azafrán (*Crocus sativus L.*)

*Crocus sativus L.* (Figura 1) es una herbácea que pertenece a la división: espermatofita, clase: monocotiledónea, del orden de las Liliáceas, familia de las Iridáceas y el género al que pertenece cuenta con unas 75-80 especies, de las cuales 40 se localizan en Europa y al oeste de Asia. Es perenne, con una altura de 10 a 25 cm, la planta completa presenta de 1 a 3 tallos, en cada tallo hay 2 ó 3 flores y cada flor tiene 6 pétalos de color violáceo y 2-3 estigmas. Su época de floración inicia en los últimos días del mes de agosto, cuando la temperatura oscila entre los 10 y 15 ° C, en un suelo con textura calcárea-arcillosa y la humedad que posee y requiere es procedente de las precipitaciones, por lo que su desarrollo es en un clima seco. Su rango longitudinal para su distribución es 10°W a 80°E y latitud 30°N a 50°N (Basker, 1999; Negbi, 1999).



Figura 1. Flor del azafrán *Crocus sativus L.*

La recolección se efectúa a mediados del mes de octubre en las primeras horas de la mañana, recogiendo cada flor en forma manual empleando la uña del dedo pulgar que se apoya en el dedo índice y evitando que las flores se marchiten; de ésta manera se obtiene anualmente 50 toneladas que serán vendidas a un costo de 900 a 1000 dólares el kilo, que corresponden a unas 150 000 flores y unos 450 000 estigmas secos. Los países como España, Irán, Grecia, Marruecos, Azerbaiyán e India son los principales productores de azafrán (Muñoz, 1987)

### 2.1.1. Características generales de los estigmas de *Crocus sativus* L.

Los estigmas de *Crocus sativus* L. (Figura 2), son conocidos propiamente como azafrán. Destacan en la concavidad de la flor en número de 2-3 de color amarillo-rojizo o anaranjado, longitud de 3 a 4 cm y cuando están secos se reducen a 2 cm con una intensa fragancia. Por lo general tienen forma acanalada y en su base son más finos engrosándose progresivamente hasta alcanzar unos 2mm (Kasumou, 1970)

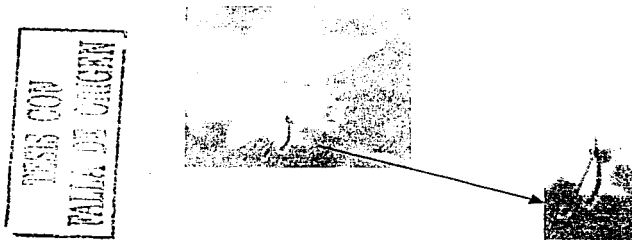


Figura 2 . Estigmas de *Crocus sativus* L.

### **2. 1. 2. Usos del azafrán**

En la industria alimentaria se prepara con leche, en arroz, con café, en una gran variedad de postres y platillos internacionales como la paella y la zarzuela de pescado en España; risotto a la milanese en Italia, el cake sueco, bouillabaise en Francia, cordero y pescado en Arabia, entre otros (Szita, 1987; Abdullaev, 2000; Winterhalter, 2000).

En algunas ciudades asiáticas, se ocupa en cosmetología para hacer mascarillas junto con productos de origen natural que no causan daño en la piel y perfumes. En la industria Safinter & Taj-Mahal, los estigmas de azafrán se almacenan con empaque especial para venderse como regalo en eventos importantes (Sanfinter, 1997).

### **2.1.3. Importancia del azafrán en la medicina tradicional**

Existen trabajos con el azafrán en la medicina tradicional, reportados desde el año 2300 a.C., a partir de ésta fecha es variada la información que se tiene de su uso, pero siempre apoyada en la herbolaria, también hay infinidad de recetas basadas en plantas que poseen propiedades curativas, como las que se citan en el libro de medicina de los chinos llamado "Yi-Lin-Ji-Yao", o el "Yinshanzhanguao" escritos en el siglo XVI; este último contiene algunas recetas que mencionan al azafrán, como una herbácea con propiedades que ayudan a curar una gran variedad de enfermedades, entre ellas la de calmante, ya que reduce el dolor de cabeza, regula las alteraciones menstruales como la amenorrea, dismorrea y coágulos; en sistema circulatorio se le reporta como una alternativa para disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos, entre otros padecimientos relacionados con la alta viscosidad en la sangre (Figura 3). Otros autores lo citan con propiedades antisépticas, fungicidas, antitrombóticas y que ayuda a eliminar el insomnio; se administra en enfermedades del corazón con problemas en el miocardio (Abdullaev, 2002). Favorece la digestión, porque actúa como un estimulante estomacal y fortalece las funciones del estomago al aumentar las secreciones gástricas y ayuda a eliminar los gases acumulados en el tracto digestivo (Zargari, 1990; Zhang, 1996; Hossein, 2002).

## Azafrán y sus constituyentes

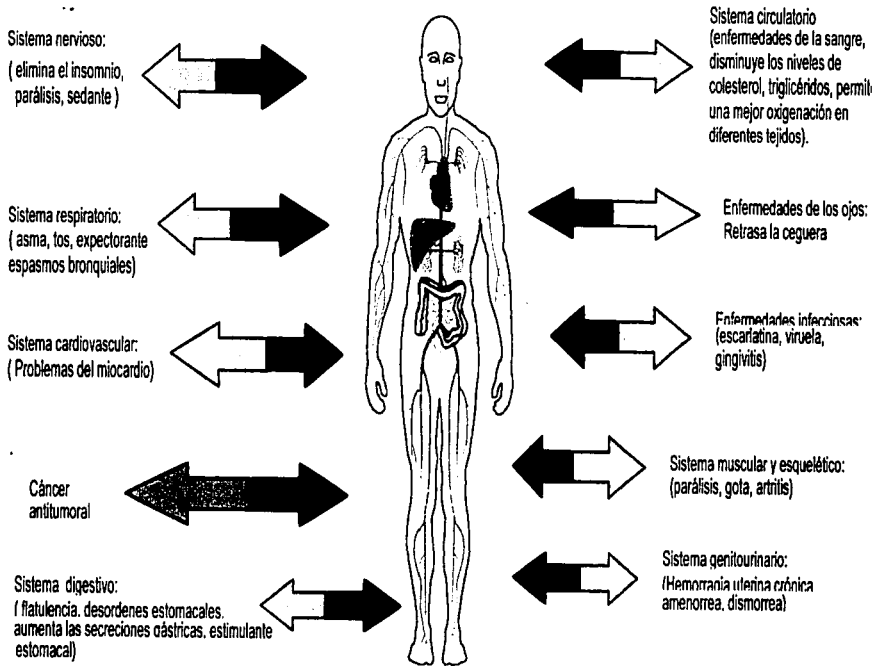


Figura . 3 Propiedades curativas del extracto de azafrán *Crocus sativus L.*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Actúa como expectorante para combatir la tos y la bronquitis; en problemas visuales se ocupa para retrasar la ceguera y también para disminuir la parálisis muscular (Zhou,1987; Ni, 1992).

En 1954 se reportaron los primeros estudios del azafrán en el área de farmacología y en 1990 las primeras investigaciones con capacidad antitumoral, cuyas propiedades sugieren que posee componentes carotenoides. Es rico en vitamina B<sub>2</sub>, riboflavina entre una mezcla compleja de componentes que presenta el extracto (Pérez, 1989; Sugiura, 1995; Rios, 1996; Abdullaev y Frenkel , 1999; Abdullaev, 2000 ).

#### **2.1.4. Características químicas del azafrán.**

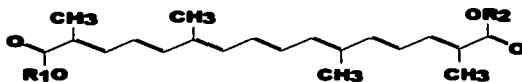
Por su estructura química el azafrán se le clasifica como xantofila u oxicarotenoide, que contienen oxígeno en su molécula como la zeaxantina que da origen a los principales componentes del azafrán como (Abdullaev, 1993; Tarantilis, 1994; Alonso *et al*, 1996; Lozano, 2000):

1. La picrocrocina, que constituye hasta el 72% de la fracción volátil y le da la propiedad de su sabor amargo.
2. El safranal, le da un aroma característico.
3. La crocina, un color que va del amarillo hasta un café rojizo.

También contiene carotenoides, que son isoprenoides o tetraterpenos con 40 átomos de carbono, que se sabe actúan como precursores de la vitamina A, evita que los lípidos se oxiden y disminuye los peróxidos inmunosupresores, mejorando la respuesta inmune de los receptores de la membrana y su fluidez, así como protege a la célula del estrés oxidativo; los cuales están presentes en tejidos vegetales y son sintetizados únicamente por organismos fotosintéticos (Leal, 1998). Además de una gran cantidad de componentes que todavía no han sido caracterizados totalmente.



**Figura 4. Estructura química de los principales compuestos del azafrán**



**CROCINA**

Le da un color característico



**PICROCROCINA**

Le da el sabor amargo



**SAFRANAL**

Le proporciona el aroma característico

Atrapan radicales libres que causan daño a los lípidos insaturados de la membrana celular (Nair, 1994; Pfander, 1982).

Otros componentes que se han encontrado en el extracto de azafrán (Cuadro 2.1 ), son los aceites, aminoácidos esenciales y azúcares (Abdullaev, 1993; Straubinger, 1997, 1998).

**Cuadro 2.1. Componentes químicos presentes en el azafrán**

<b>Compuestos</b>	<b>Porcentaje en peso</b>
H <sub>2</sub> O	10.3 - 14.03
Cera	18.6 - 20.1
Aceite volátil	1.0 - 1.5
Aceite fijo	2.0 - 2.8
Azúcar	40.3 - 41.2
Carotenoides	7.9 - 8.1
Crocina	3.49- 3.52
Picrocrocina	3.69 - 3.72
Crocetina	0.31- 0.33
Caroteno $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$	0.68 - 0.75
Alcaloides	0.08 - 0.1
Aminoácidos: Ala, Val, Lys, Met, Leu, His	12.93 -13.24
Vitaminas A, B, B <sub>1</sub> , C	1.20 - 1.52
Otros	5.0 - 6.2

### **2.1. 5. Importancia del azafrán en el área farmacológica**

Son pocos los estudios que se han realizado en el área farmacológica del azafrán y sus componentes (Miwa *et al.*, 1954), lo reportan como un inhibidor de la segregación de la bilirrubina; Gainer y Jones (1975) encontraron que contiene propiedades que ayudan a disminuir los niveles de colesterol y ésteres de colesterol, que forman la capa fibrosa que recubre a las arterias elásticas y a las arterias musculares que provoca la aterosclerosis.

Zhang *et al* en 1994 administraron oralmente diferentes concentraciones del extracto de azafrán, para determinar los efectos agudos en la memoria y conocimiento de ratones normales que ingirieron alcohol etílico, los datos obtenidos sugieren que con una sola administración oral del extracto de azafrán, no hay efectos en el registro y reparación en la memoria de los ratones, sin embargo detectaron que reduce la actividad motora y actúa como sedante y sugieren cuatro posibles mecanismos de acción:

1. Facilita la desintoxicación causada por el etanol, debido a que reduce su absorción a través del tracto gastrointestinal.
2. Elimina el etanol del cerebro, porque acelera el metabolismo en el organismo.
3. Acelera la circulación sanguínea.
4. Antagoniza los efectos farmacológicos del etanol en el sistema nervioso central.

Otras investigaciones reportan que el extracto de azafrán es capaz de antagonizar los efectos de la memoria deteriorada causada por el alcohol etílico, porque la crocina, uno de los componentes del azafrán es el antagonista del etanol (Morimoto *et al.*, 1994; Suguira *et al.*, 1994, 1995).

### **2.1. 6. Efecto citotóxico del azafrán *in vivo*.**

El primer reporte con actividad antitumoral del extracto de azafrán fue en 1991 por Nair *et al.*, quienes utilizando ratones demostraron que administrando al extracto por vía oral, produce una inhibición dosis- dependiente en el crecimiento de tumores provenientes de células del sarcoma 180 (S-180), de carcinoma de ascitis Erlinch

(EAC) y de linfoma de ascitis Dalton's (DLA); utilizaron dosis de 200 mg de extracto/kg de peso corporal, con esto lograron un incremento de 2 a 3 veces más el tiempo de vida de los ratones experimentales con respecto a los ratones testigos, a los cuales no se les dio ninguna concentración del extracto.

Después al inducirles linfoma ascítico de Daltons (DLA) y un carcinógeno conocido como el metilcolantreno a los ratones, les dieron oralmente el extracto de azafrán en una dosis de 100mg/kg de peso corporal durante 30 días, así lograron decrecer en un 90% el tamaño del tumor en comparación con los ratones que no recibieron ningún tratamiento.

En otro reporte, se estudió la citotoxicidad de *Nigella sativa* y *Crocus sativus*, les indujeron a los ratones, primeramente por cavidad peritoneal, células de linfoma ascítico de Dalton (DLA) y el carcinógeno dimetilbenzo [a]antraceno y desarrollaron el papiloma en el tejido. Una vez que el papiloma fue visible, se les administró concentraciones de 100 mg/kg de peso corporal de los dos extractos. Los datos obtenidos a las doce semanas, demostraron que el 90% de los animales control desarrollaron el papiloma, comparado con el 76.6% y 50% de los ratones tratados con *Nigella sativa* y *Crocus sativus* respectivamente. Los ratones control vivieron hasta la semana 20, mientras que en este mismo tiempo, los ratones que se les administró *Nigella sativus* desarrollaron un 56.6% el papiloma y los tratados con el extracto de azafrán un 43.3%; lograron demostrar que no solo retrasa el desarrollo del tumor, sino que también lo reduce; los autores atribuyen a los carotenoides del azafrán la disminución de la expresión del papiloma y sugieren que la administración oral es buena para prevenir las incidencias en la formación de los mismos (Nadkarni, 1976; Salomi *et al.* 1991).

### **2.1. 7. Efecto citotóxico del azafrán *in vitro*.**

Los primeros estudios reportados *in vitro* donde se ocupó el extracto de azafrán, se realizaron para conocer que tanto afectaba la viabilidad celular, se empleó el método de exclusión con azul de tripan, donde se determinó la LD<sub>50</sub> estos estudios dieron la

apertura para continuar con experimentos más estructurados, donde se aplicaron diferentes concentraciones del extracto en diferentes líneas celulares para conocer su citotoxicidad (Cuadro 2.2.). Las concentraciones se modificaron dependiendo del tipo celular, pero lo que llamó la atención de estos experimentos, fue que en células normales no se encontró ningún efecto tóxico significativo (Salomi *et al.*, 1990; Nair *et al.*, 1991). Mencionan que existe diferente sensibilidad en las células cancerígenas al extracto de azafrán, pero se desconoce cuales son los mecanismos de acción ( Morjani, 1990; Escribano, 1996).

Otros estudios *in vitro* realizados con algunos de los componentes del extracto de azafrán, como la crocina, crocetina, dimetil-crocetina, picrocrocina y safranal en diferentes líneas celulares tumorales (Tarantilis, 1992, 1994; García-Olmo, 1999) demuestran que su efecto no es citotóxico, sin embargo, destacan la sensibilidad que pueden presentar los diferentes tipos celulares. debido a los receptores que poseen en la membrana celular, así como a los transportadores intracelulares. Mencionan que inhibe la síntesis de ácidos nucleicos, pero no la síntesis de proteínas y proponen, a los principales componentes del azafrán con propiedades antioxidantes, relacionada con la actividad que posee la glutatión reductasa (Verma y Bordia, 1998).

### **2.1.8. Efecto del extracto de azafrán sobre la síntesis macromolecular**

En 1991 Nair *et al* realizaron estudios *in vitro*, para conocer la citotoxicidad del extracto de azafrán en líneas celulares de sarcoma (S-180), leucemia (P-388), carcinoma ascítico de Ehrlich (EAC) y linfoma ascítico de Dalton's (DLA), mediante la incorporación de timidina tritiada [metil-  $^3\text{H}$ - timidina] durante la biosíntesis de su DNA. Los resultados mostraron un comportamiento dosis dependiente y cuando incrementaron las concentraciones del extracto de azafrán, también se incrementó la inhibición en la síntesis de DNA.

En otras pruebas por incorporación de precursores radiactivos con [ $^3\text{H}$ ]- Timidina para el DNA, [ $^3\text{H}$ ]- Uridina para RNA y [ $^3\text{H}$ ]- Leucina para proteínas, se aplicaron en células de adenocarcinoma epitelial cervical (HeLa) concentraciones de  $3\mu\text{Ci/ml}$  para

**Cuadro 2.2. Efecto citotóxico del azafrán (IC<sub>50</sub>) y de algunos de sus componentes en células tumorales *in vitro*.**

agente	Células tumorales	IC <sub>50</sub>	Referencias
Extracto de azafrán	S-180, EAC, DLA, P388, osteosarcoma	7-30 µg/ml	Nair <i>et al</i> 1991, Salomi <i>et al</i> 1990, 1991.
Extracto de azafrán	A-549, Wi-38VA	100-250µg/ml	Abdullaev <i>et al</i> 1992, 1995
Extracto de azafrán	HeLa	2.5 mg/ml	Escribano <i>et al</i> , 1996
Crocetina	HL-60, K562	2 µM	Tarantilis <i>et al</i> , 1992, 1994
Dimetilcrocetina	HL-60; K562	0.8 µM	Tarantilis <i>et al</i> , 1992, 1994 Morjani <i>et al</i> , 1990
Crocina	HL-60; K562	2 µM	Morjani <i>et al</i> , 1990
	HeLa	3 mM	Tarantilis <i>et al</i> , 1992, 1994
	HT-29	0.4 mM	Escribano <i>et al</i> , 1996
	DHD/K12-PROb	1.0 mM	García-Olmo <i>et al</i> , 1999
β- caroteno	K562		Morjani <i>et al</i> , 1990
Safranal	HeLa	0.8 mM	Escribano <i>et al</i> , 1996
Picrocrocina	HeLa	3 mM	Escribano <i>et al</i> , 1996
Trans-ácido retinoico	HL-60	12 mM	Tarantilis <i>et al</i> , 1994
Cormo de azafrán	HeLa	150 µg /ml	Escribano <i>et al</i> , 1999
Proteoglicano de azafrán	HeLa	7-22 µg /ml	Escribano <i>et al</i> , 1999, 2000

conocer y determinar como afecta el extracto de azafrán y que tanto inhibe la formación de colonias. Los resultados indican una disminución en el crecimiento celular con una IC<sub>50</sub> obtenida entre los 100 y 150 µg/ml del extracto, en la síntesis del DNA y RNA; pero no se detectó ningún cambio en la síntesis de proteínas con las dosis aplicadas. Con los datos, los autores sugieren que la crocina y la crocetina poseen una mayor actividad que los carotenoides y los comparan con un retinoide (Abdullaev y Frenkel, 1992)

### **2.1.9. Efecto citotóxico de algunos componentes del extracto de azafrán.**

Los carotenoides del azafrán como la crocina, crocetina o derivados purificados (dimetil crocetina), se consideran efectivos para inhibir la proliferación de diferentes tipos de células malignas humanas, sin embargo, las células normales de bazo de ratón o los fibroblastos de pulmón humano, son insensibles a los carotenos del azafrán *in vitro* (Nair, *et al* 1994).

La crocina, otro componente del azafrán, es responsable del efecto anticarcinogénico en células de leucemia (HL60), donde se considera un inhibidor altamente efectivo en la proliferación y diferenciación celular, debido a que presenta una conversión metabólica de carotenoide a retinoide (Tarantilis, 1992; Escribano, 1996). Estos mismos autores describen cambios morfológicos provocados por la crocina en las células, como áreas vacuoladas, reducción del tamaño y condensación de los núcleos, los cuales producen alteraciones metabólicas como la síntesis de ácidos nucleicos.

La dimetil-crocetina, presenta una actividad citotóxica debido a la inhibición que sufre la síntesis de DNA, donde la enzima topoisomerasa II es afectada y provoca una alteración en la transcripción, reparación y recombinación, que da como respuesta una irregular actividad de la protein kinasa-C ( Abdullaev, 1994; Nair, 1995).

En pruebas de cinética realizadas con crocina, safranal y picrocrocina, se vio cuál de los tres presentaba una mejor difusión a través de la membrana celular. Y se determinó que el safranal, por poseer una naturaleza apolar y bajo peso molecular (Abdullaev y Frenkel, 1992; Escribano, 1996).

## **2.2. Características generales del Selenio**

El selenio se localiza en la tabla periódica como un metaloide, con número atómico 34, peso atómico de 78.96, una electronegatividad de 2.5 y tres niveles de oxidación que son: -2, 4 y 6. Presenta solubilidad en el agua es a 20 °C, punto de fusión a 217°C y su punto de ebullición es ~685°C.

Fue descubierto por Berzelius en 1817 y por 140 años se le consideró un elemento tóxico, no fue sino hasta 1957 que Schwarz *et al* demostraron que en concentraciones muy bajas, presenta un efecto positivo en el tratamiento de ciertas enfermedades vasculares y parálisis muscular en animales experimentales (Abdullaev, 1996; Combs, 1998).

### **2.2.1. Efecto biológico del selenio**

En la década de los sesentas, se encontró que contiene propiedades muy parecidas a la enzima glutatión peroxidasa (GPX) cuando hay presente una selenoproteína, pues presenta una función catalítica y participa como protector antioxidante en las células porque como la vitamina E (Rotruck, 1973). Desde entonces se le considera un elemento esencial en la dieta diaria de animales y humanos, porque se incorpora en el organismo y se distribuye rápidamente entre los diferentes órganos, tejidos, células y biomoléculas (Abdullaev, 1989). Se sabe que el selenio interactúa con los radicales libres, que dañan al DNA y afecta el metabolismo de las células, dando una protección antioxidante que ayuda a prevenir el proceso de la carcinogénesis ( Ip, 1995). En 1980, la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos de Norteamérica estableció el rango de consumo diario que puede ser de los 50 a 200 mg de selenio sin ningún riesgo de salud en el humano (Clark, 1996).

Su incorporación se ha estudiado en diferentes especies, siendo el ratón el que presenta la acumulación más rápida en el riñón, hígado, páncreas, piel y cerebro (Cuadro 2.3). En otros organismos como la rata, el gato y el humano se localiza en el hígado (Abdullaev, 1982).



**Cuadro 2. 3. Incorporación del selenio en diferentes órganos ( Abdullaev, 1982)**

<b>Especie</b>	<b>Distribución en diferentes órganos</b>
ratón	Riñón > hígado > páncreas > piel > cerebro
gato	Hígado > riñón > corazón > pulmón
rata	Hígado > riñón > páncreas > corazón
humano	Hígado > riñón > piel

### **2.2.2. Actividad antioxidante e inmunológica del selenio**

En 1973 Spallholz *et al* sugieren que los efectos del selenio como anticarcinógeno se relaciona con procesos en el sistema inmune, dicha propuesta surge de un experimento que realizan en dietas suplementadas con selenio en ratones, donde se les administra una dosis de 0.5 mg/kg de peso corporal y observan un incremento en los niveles de anticuerpos. Posteriormente se considera un nutrimento esencial en la membrana de los linfocitos, ya que evita su oxidación, previene la formación de radicales libres y puede formar inmunomoduladores; también se determinó que, una deficiencia del selenio y vitamina E provoca citotoxicidad, transformación de los linfocitos y la presencia de una fácil oxidación en su membrana (Meeker, 1985).

En animales experimentales, se observa que los niveles de selenio son esenciales para la actividad normal de las selenoproteínas y actúan como las enzimas antioxidantes, muy parecido a la función que realiza la glutatión peroxidasa, que protegen contra enfermedades del corazón, aterosclerosis, cáncer, infecciones virales, así como en procesos metabólicos que involucran la activación y desactivación de la carcinogénesis; (Rotruck, 1973; Chen, 1982; Lin, 1993; Christensen, 1994).

### **2.2.3 Efectividad del selenio para evitar la carcinogénesis y actuar como quimiopreventivo.**

Entre 1970 y 1980, en trabajos epidemiológicos se estudia la relación que existe entre los pacientes que en el plasma de su sangre presentan selenio con el rango de

mortalidad causado por cáncer, posteriormente, esta misma relación la observan con cáncer de leucemia, colon, recto, mama, ovario y pulmón, con lo que determinan la existencia de una relación inversamente proporcional entre los niveles de selenio y la enfermedad (Tu, 1985; Combs, 1986). Los resultados anteriores permiten determinar los niveles de selenio, asociado a una posible quimioprevención, que va en los hombres de  $126.4 \pm 3.1$  ng/ml y en mujeres de 130 ng/ml, y sugieren que existen compuestos de selenio que inhiben o retardan la carcinogénesis (Kok, 1987; Combs, 1998).

En 1981, Milner *et al* demuestran la eficacia de cinco compuestos diferentes del selenio, basado en las dosis administradas para prevenir la formación de un tumor, siendo el más efectivo el selenito > bióxido de selenio > selenato > selenocistina > selenometionina.

Posteriormente se determina que puede prevenir la carcinogénesis de piel y próstata, al usarlo como suplemento alimenticio diario en niveles de 1.0-1.5 ppm (Clark, 1985; Combs, 1986)

Los primeros reportes *in vivo* con modelos experimentales en ratones, se les estudia la inhibición en el crecimiento de tumores inducidos, sin embargo fue extremadamente difícil establecer como era el mecanismo de acción, pero se determinó un decremento en 63% en el cáncer de próstata y se propuso como hipótesis que sólo se pueden iniciar los procesos de carcinogénesis cuando el organismo presenta una concentración menor de 0.05  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de selenio del peso corporal (Combs, 1986; Medina 1988; Clark, 1998)

#### **2.2.4. Compuestos del selenio que actúan como quimiopreventivos al ser metabolizados.**

Para que el selenio y sus compuestos sirvan en la quimioprevención del cáncer, es esencial que sean metabolizados mediante el proceso de oxidación de una sal inorgánica ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), ésta a su vez será trasformada a selenotrisulfuro o selenodiglutatión (GSSeSG), a los cuales se les atribuye un potencial anticarcinogénico

(Poirer, 1983, Abdullaev, 1994); posteriormente queda hidrolizado hasta formar el selenio hidrogenado ( $H_2Se$ ), que generalmente es el precursor para poder incorporarse a la síntesis de proteínas y formar selenoproteínas (figura 2.2.4.).

Existe otra ruta para permitir la incorporación de grupos metilo a la molécula del selenio hidrogenado, formando el metilselenol, dimetilselenio y trimetilselenio, por medio de las selenobetainas, portadoras de dichos grupos, que a su vez pueden interactuar con otros compuestos e incorporarse a los aminoácidos como cisteína y metionina, para realizar posteriormente una conversión a selenocisteína o selenometionina (Sunde, 1984; Gantha, 1986; Ip, 1990)

#### **2.2.5. Posibles mecanismos de acción del selenio.**

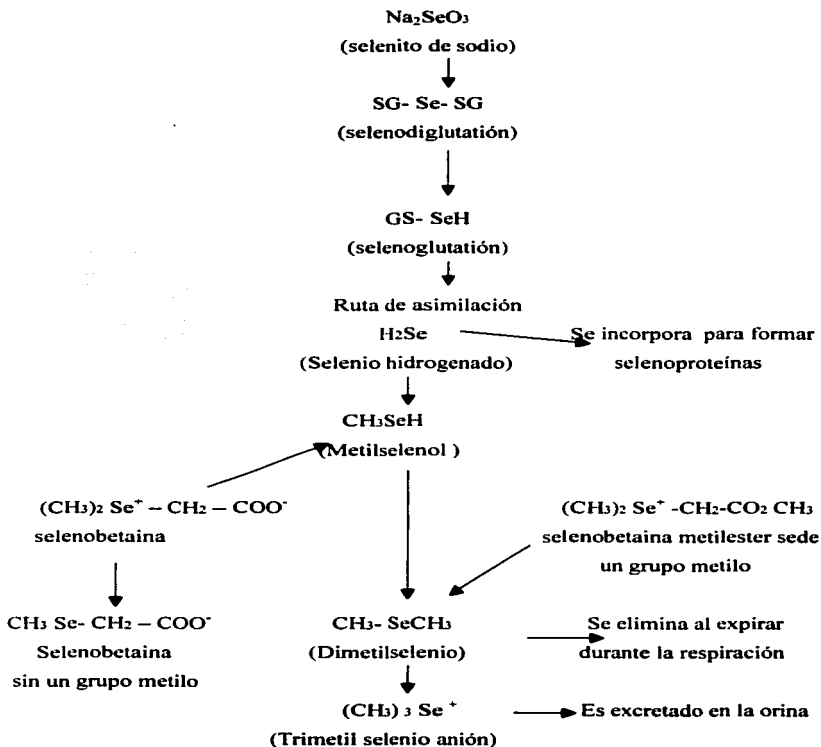
A nivel celular juega un papel importante con las enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa porque incrementan su producción ante la presencia de radicales libres. Con los aminoácidos como la cisteína y metionina, forma la selenocisteína o selenometionina que también actúan como antioxidantes (Malcolm, 1995; Ip, 2000 y Roa, 2001).

Comb (1998) sugiere al selenio, como agente quimiopreventivo, debido a que presenta las siguientes propiedades:

1. Es antioxidante y ocupa un papel importante junto con la enzima glutatión peroxidasa. Su función lo realiza a nivel celular en los organelos y el DNA, en donde existan o estén presentes peróxidos de hidrógeno.
2. Aumenta la capacidad inmunológica de las células, principalmente en las interleucinas y otras asociadas con genes de las células T.
3. Altera el metabolismo de carcinógenos cuando se realiza fase 1 y 2 de las enzimas xenobióticas responsables de la detoxificación de carcinógenos.
4. Hay una interacción en la síntesis de proteínas y la mitosis en el ciclo celular, porque inhibe las fases G1, G2 y S, así como las proteínas arginasa, ureasa, y la protein kinasa C que permiten la división celular.

5. Forma metabolitos quimiopreventivos, enzimas que sirven como protodrogas y activan compuestos que se unen al selenio produciendo aniones de selenio ( RSe-) con actividad quimiopreventiva.
6. En cultivos celulares se observa que induce la apoptosis por estrés oxidativa en las mitocondrias, a través del citocromo C, el cual inicia una cascada de eventos que culmina en un proceso apoptótico.

**Figura 2.2.4. Proceso de metilación para metabolizar al selenio.**



### 3. JUSTIFICACION

Sabemos que el porcentaje de muerte por causa del cáncer, ocupa el segundo lugar a nivel mundial; y que todos los estudios generados sirven para disminuir los porcentajes o erradicar dicha patología, pues son otras alternativas que ayudan a encontrar solución a este problema; el presente trabajo no es la excepción, pues pretende determinar si la inhibición que pudiera causar el extracto de azafrán, sus principales componentes, y la combinación con el selenito de sodio, en las células tumorales humanas *in vitro*, permita sugerirlo como una alternativa más, ya sea como un quimiopreventivo o para ocuparlo en un futuro no muy lejano en tratamientos contra el cáncer.

También pretende complementar los trabajos ya realizados con otras líneas celulares y fortalecer las evidencias de que el extracto de azafrán podría utilizarse como adyuvante en tratamientos contra el cáncer.

Dar la pauta para conocer los posibles mecanismos de acción a nivel molecular, que expliquen el efecto citotóxico o antitumoral del extracto de azafrán y su combinación con el selenito, conocer cuales son las concentraciones adecuadas para su inhibición en un 50% (IC<sub>50</sub>) en las células tumorales humanas *in vitro* seleccionadas para este estudio y establecer si el efecto es igual cuando los agentes actúan de manera independiente o al combinarlos; así como, saber si el extracto de azafrán posee algún otro componente específico, no determinado hasta el momento, causante de su efectividad citotóxica.

#### **4. HIPOTESIS**

El extracto de azafrán y el selenito de sodio en forma independiente causan toxicidad en células cancerígenas y cuando los combinamos presentan un efecto sinérgico o aditivo que causa una mayor inhibición en el crecimiento celular.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto citotóxico *in vitro* del extracto de azafrán, sus componentes principales, del selenito de sodio y la combinación de ambos, en diferentes líneas celulares cancerígenas humanas.

##### **5.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Determinar el efecto citotóxico *in vitro* del extracto de azafrán en diferentes líneas celulares cancerígenas humanas y su IC<sub>50</sub>.
- Conocer si existe algún efecto citotóxico *in vitro* de algunos componentes del extracto de azafrán en células cancerígenas humanas.
- Determinar el efecto citotóxico del selenito de sodio en células cancerígenas humanas y determinar su IC<sub>50</sub>.
- Conocer si existe algún efecto citotóxico al combinar el extracto de azafrán con el selenito de sodio en células cancerígenas humanas *in vitro*.
- Determinar si afecta el extracto de azafrán, el selenito de sodio o la combinación de ambos en la síntesis de ácidos nucleicos.

## **6. MATERIAL Y METODOS**

### **6.1 Reactivos**

Selenito de sodio que fue comprado a la compañía Sigma Chemical (St Louis MO).  
Medio Eagle's Modificado Dulbecco's (D-MEM) adquirido a la compañía Gibco BRL (Grand Island, N.Y.).

Suero Fetal bovino (SFB) marca Hy-Cclone (Road Logan, UT).

Antibiotico penicilina estreptomocina marca Sigma ( St Louis MO).

Marcadores radiactivos: 3H- Timidina y 3H- Uridina marca Amersham (Farmacia Biotech UK)

Metanol marca Merck (KgaA, Germany).

Acetonitrilo marca Merck (KgaA, Germany).

Las sales ocupadas para la elaboración de PBS, como son cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) marca Merck (KgaA, Germany).

EDTA ( ácido etilendinitrotetraacético) marca Sigma ( St Louis MO).

SDS ( Dodecil sulfato) marca Sigma ( St Louis MO).

TCA (ácido tricloroacético) marca Merck (KgaA, Germany).

### **6.2 Material desechable**

Cajas de cultivo de 35 mm y 100 mm de diámetro, frascos de 75 cm<sup>2</sup>, pipetas serológicas de 1.0, 5.0 y 10 ml., tubos cónicos con volumen de 15 y 50 ml, microplacas con 24 pozos, criotubos de 2 ml, todos fueron adquiridos a la compañía Costar (Coming, NY)

### **6.3 Material Biológico**

Las líneas celulares ocupadas pertenecen a la American Type Culture Collection (ATCC) y fueron donadas por el Dr. Alejandro García Carrancá del Instituto Nacional de Cancerología.



### **6.3.1 Carcinoma hepatocelular humano (Hep G2)**

La obtención de esta línea se debió al derivado del tejido de hígado de un hombre de 15 años de edad, caucásico, su número de patente es el 4,393,133.

Las células que presentan este carcinoma se les puede reconocer fácilmente porque se puede observar en ellas suficiente glucógeno que forma un citoplasma claro.

Produce  $\alpha$ -fetoproteína, albumina,  $\alpha$ 2-macroglobulina,  $\alpha$ 1-antitripsina, transferrina, haptoglobina, ceruloplasmina, plasminogeno, fibrinogeno.  $\alpha$ 1-ácido glicoproteínico,  $\alpha$ 2-HS glicoproteína,  $\beta$ -lipoproteínas y una proteína vinculada con el retinol.

### **6.3.2 Carcinoma de colon humano (SW480)**

Fue aislado por A. Leibovitz's *et al*, en un periodo de 5 años (1971 - 1975). El origen del tumor es grado III - IV de adenocarcinoma de colon. Se obtuvo de una paciente de 82 años de edad, de origen caucásico con tipo de sangre AB.Rh+

### **6. 3.3. Adenocarcinoma de cervix humano (HeLa)**

Fue aislado por G.O. Gey, W.D. Coffman y MT Kubicek en febrero de 1951 de una mujer de 31 años que presentó carcinoma de cervix. Fue el primer tejido humano aneuploide mantenido en crecimiento continuo, donde se pudo realizar de 76-88 pases. En 1954 fue congelado y hasta 1959 nuevamente utilizado.

Ingresó a la lista de ATCC en 1961, contiene el virus de papiloma humano 18 (HPV-18).

En estudios *in vitro* se indica que los virus del papiloma humano de alto riesgo (tipo 16, 18, 3, 33) tienen la capacidad de volverse malignos y están relacionados con ciertos oncogenes virales (genes E6 y E7).

Los genes E6 se unen al gen supresor tumoral p53 y acelera su degradación proteolítica.

#### **6.3.4. Rbdomiosarcoma (A-204 tumor del músculo esquelético humano)**

Fue propagada por D.J. Giard y descrita en ATCC en 1973, se obtuvo de una persona que contaba con un año de edad de sexo femenino.

En estudios citogenéticos se menciona un rearreglo cromosómico como las translocaciones que condicionan la formación de genes quiméricos como los cromosomas 2 y 13 (q53; q 14).

#### **6.4 Obtención del extracto de azafrán**

Los estigmas secos de azafrán puro (*Crocus sativus L.*) de origen español “La mancha”, se adquirieron en una tienda comercial local y fueron almacenados para su conservación a una temperatura de 4°C y obscuridad total. Para obtener el extracto, se maceraron en un mortero, por cada 100 mg de azafrán se agregaron 2.5 ml de agua desionizada a 75°C y posteriormente se congelaron a -72 °C durante 24 horas.

Pasado este tiempo, se centrifugó a 11 000 g durante 15 minutos en una centrífuga Marathon 21k/R, el sobrante se liofilizó en un equipo Savant/ Novalyphe NL150, la porción sólida que se obtuvo del extracto se pesó y se empleó para determinar la citotoxicidad en las células cancerígenas humanas *in vitro*.

#### **6.5. Separación de los componentes por HPLC**

Se maceraron los estigmas del azafrán con una mezcla de metanol y agua desionizada para obtener una porción de 2 mg/ml. de solución y se dejaron durante 2 horas a temperatura ambiente, con movimientos constantes y evitando que la luz le diera directamente (Tarantilis, 1995).

Posteriormente se centrifugó a 30. 000 g. durante 20 minutos y se filtró a través de una membrana (Nylon Acroside Waters 13); de 0.45 µm de porosidad.

La muestra filtrada se aplica en un sistema cromatográfico, que consiste en un equipo Waters (Millipore Corp Milfoord, U.S.A.) con un sistema de distribución de disolventes Modelo 600 E y un detector de fotoarreglo de diodos UV, con una longitud

de onda larga múltiple acoplado a una computadora (Optiflex 466/LE DELL) y un control de sistema con el programa Millennium 2000 Waters.

Para la resolución del extracto total a nivel analítico, se utiliza una columna de fase reversa (Waters) de 4.6 x 250 mm. de diámetro interno.

La fase móvil consiste en un gradiente lineal de metanol-agua del 10 al 100% en 15% de acetonitrilo, para identificar a los componentes del extracto de azafrán, sin sufrir ninguna alteración, también se incluye ácido acético al 1% (Merck).

Se usa un tiempo máximo de 60 minutos para cada elución con un flujo de 0.5 ml/minuto en la fase móvil y un volumen de inyección con la muestra de 50µl. a éstos se les realiza una detección a 250, 420 y 440 nm. de longitud de onda.

También se utiliza una columna de fase reversa (Waters) de 20 x 250 mm. de diámetro interno y se ajusta el flujo a 9.45 ml/minuto, con un volumen de inyección de 500µl. del extracto de azafrán.

#### **6.6. Ensayo de formación de colonias celulares**

Se siembran  $10^6$  células en cajas de 100 mm. con 15 ml. de medio de cultivo D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino para su proliferación. Cuando se obtiene una confluencia del 100% , a la monocapa celular se le agrega tripsina a una concentración de 0.05% para desprender las células y formar 5 grupos con cuatro repeticiones en cajas de 35 mm., se espera nuevamente hasta la formación de la monocapa celular y se aplican cuatro concentraciones diferentes de selenito de sodio que son de 10, 50, 100 y 200 µM, y un testigo al cual no se le aplica nada; se dejan incubar en un equipo (Nuair), durante 1 hora con los siguientes parámetros controlados: 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de aire, 37° C y una humedad constante, pasado este tiempo se elimina el medio de cultivo que contiene las diferentes concentraciones del selenito de sodio, se lavan con PBS pH 7.0 , se agrega 1 ml. de tripsina con una concentración del 0.05% para desprender las células de las cajas y

posteriormente se realizan diversas diluciones hasta obtener 200 células en 3 ml de medio, las cuales son sembradas en cajas Petri de 35 mm. y se dejan incubar durante 10 días con los parámetros ya mencionados.

Pasado este tiempo, se elimina el medio y a las colonias formadas, se les lava con 3 ml. de Buffer de fosfatos pH 7.0 y se fijan en las cajas con 3 ml. de metanol durante 5 minutos, se dejan secar las cajas y finalmente se tiñen con Giemsa líquido en una concentración V/V 1:6 giemsa-agua destilada. Las colonias con diámetro mayor de 0.5 mm. son contadas para determinar su inhibición.

Con el extracto de azafrán, se realiza el mismo proceso descrito con el selenito de sodio, pero el tiempo de incubación es de 3 horas con las siguientes concentraciones por cuadruplicado: 50, 100, 200 y 400  $\mu\text{g/ml}$  y el testigo.

Para cada uno de los componentes del azafrán se aplican concentraciones de 200  $\mu\text{g/ml}$ ; para la combinación de ambos se deja incubar durante 2 horas con el extracto de azafrán en concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{g/ml}$  y 1 hora con el selenito de sodio 10  $\mu\text{M}$  (Abdullaev, 1992).

La manera en que se calcula el  $\text{IC}_{50}$  es por medio de una curva realizada con las diferentes concentraciones de los compuestos seleccionados para este estudio y posteriormente extrapolado en el porcentaje de 50% de inhibición.

#### **6.7. Determinación de síntesis de ácidos nucleicos en las células**

Se forman monocapas de células tumorales humanas en cajas Petri de 35 mm con confluencia del 100%; a las cuales se les agregó el extracto de azafrán, el selenito de sodio y la combinación de ambos con las diferentes concentraciones mencionadas en los ensayos de formación de colonias, se dejan incubar durante una hora con el selenito de sodio, 3 horas con el extracto de azafrán y en la combinación 2 horas con azafrán y una con selenito.

La síntesis de DNA y RNA se determina al incorporar los precursores radiactivos (Abdullaev *et al*, 92) como:  $^3\text{H}$  – Timidina para el primero y  $^3\text{H}$  – Uridina para el

segundo, en una concentración final de  $3\mu$  Ci/ml. Estos se aplican en el medio de cultivo, y este se agrega en la monocapa celular durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se elimina el medio, enseguida las células son lavadas con PBS pH 7.6, se agrega EDTA-SDS (la concentración de SDS es al 0.1% y 10 mM para el EDTA, preparado con PBS y ajustado a un pH de 7.4), se dejan 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente son lisadas con ácido tricloroacético al 10% frío ( $4^{\circ}$  C). El precipitado que se forma, es colectado en un filtro Watman GF/C con una porosidad de  $0.45\ \mu\text{m}$ , previamente lavado en 4 tiempos con ácido tricloroacético al 5% (TCA), en un manifold de 24 pozos (Technology life) se dejan secar los filtros y son colocados en viales que contienen 4 ml de líquido de centelleo. La lectura de las cuentas emitidas (cpm) son realizadas en un contador de centelleo Beckman LS6500. El blanco se obtiene realizando el mismo proceso, pero el filtro contiene células a las que no se aplica ningún tratamiento.

#### **6.8. Análisis estadístico**

Los datos se analizaron usando el paquete Statistical Analysis System (SAS, Institute Inc. Cary NC 27511, USA Release 6.02). Los valores fueron significativos cuando  $P < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

Los experimentos realizados demuestran los efectos citotóxicos del extracto de azafrán, el selenito de sodio, la combinación de ambos y los componentes aislados del extracto de azafrán, los cuales se determinan por su efecto en la síntesis de ácidos nucleicos con marcadores radiactivos en la formación de colonias celulares humanas *in vitro*. Para todos los experimentos se toma como testigo a las células sin tratamiento.

### 7.1. Efecto citotóxico del extracto de azafrán en diferentes células tumorales humanas *in vitro*

Las concentraciones se aplican y dejan incubando durante 3 horas, como se menciona previamente en métodos, con 50, 100, 200 y 400µg/ml de extracto de azafrán en el medio de cultivo, después se elimina y se deja incubando 10 días para dejar que se formen las colonias. En las células de carcinoma epitelial cervical se observan los siguientes porcentajes de inhibición: 34, 42, 55 y 82 % respectivamente comparados con el testigo que presenta 0% (Cuadro 7.1.1.). El comportamiento de las células es dosis dependiente, cuando se aumenta las concentraciones del extracto, aumenta la inhibición en la proliferación celular; también se compara con los porcentajes de las concentraciones menores de las otras líneas celulares y ésta muestra el mayor incremento con un 4% más con respecto a las células de carcinoma de colon; 9% más que rhabdomyosarcoma y un 24% con respecto a las de carcinoma hepatocelular.

El rango total de inhibición entre la menor y mayor concentración aplicada es del 48%, siendo estos valores semejantes a los que presentan las células de carcinoma de colon (SW480). Su IC<sub>50</sub> se obtiene a los 165 µg/ml (Cuadro 7.1.5. )

En las células de carcinoma hepatocelular (HepG<sub>2</sub> ), la inhibición en las cuatro concentraciones aplicadas son: 10, 37, 44 y 69 % de la menor a la mayor concentración respectivamente (Cuadro 7.1.2.), su comportamiento también es dosis dependiente,

pero éstas células muestran la mayor resistencia al extracto de azafrán cuando se les aplica la concentración de 50 µg/ml.

Su IC<sub>50</sub> se obtiene a los 220 µg/ml (Cuadro 7.1.5).

En las células de rabdomiosarcoma (A-204), los porcentajes de inhibición son: 25, 51, 62 y 98 %, de menor a mayor concentración al formarse las colonias (Cuadro7.1.3.), es la que alcanza la mayor inhibición y se le considera la más sensible al extracto de azafrán; su IC<sub>50</sub> se encontró a los 95 µg/ml de extracto (Cuadro 7.1.5.).

Finalmente las células de carcinoma de colon (SW480), dan como resultado 30, 35, 51 y 63 % de inhibición en las dosis aplicadas (Cuadro 7.1.4.), que al comparar estos resultados con las otras líneas celulares en las concentraciones de 100 y 400µg/ml de extracto de azafrán, muestran los valores menores obtenidos y su IC<sub>50</sub> se encontró a los 195 µg/ml (Cuadro7.1.5. ).

Los rangos de inhibición que se obtienen con todas las líneas celulares comprenden de un 10% al 98% (Gráfica 1), cuando se determina el IC<sub>50</sub> las células más resistentes al extracto de azafrán son las de carcinoma hepatocelular (HepG<sub>2</sub>), posteriormente las de carcinoma de colon (SW480), adenocarcinoma de cervix (HeLa) y las células de rabdomiosarcoma (A-204); es decir HepG<sub>2</sub> > SW480 > HeLa > A-204.

**Cuadro 7.1.1 Inhibición *in vitro* de las células HeLa con extracto de azafrán .**

<b>Dosis aplicadas</b>	<b>Promedio de colonias formadas</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
Testigo	68± 4.5	0
50 µg /ml	45± 3.1	34
100 µg /ml	39± 2.6	42
200 µg /ml	31±3.8	55
400 µg /ml	12±8.1	82

**Cuadro 7.1.2. Inhibición *in vitro* de las células HepG<sub>2</sub> con extracto de azafrán .**

<b>Dosis aplicadas</b>	<b>Promedio de colonias formadas</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
Testigo	58±5.6	0
50 µg /ml	52±0.7	10
100 µg /ml	37±2.4	37
200 µg /ml	32±0.9	44
400 µg /ml	18±7.3	69



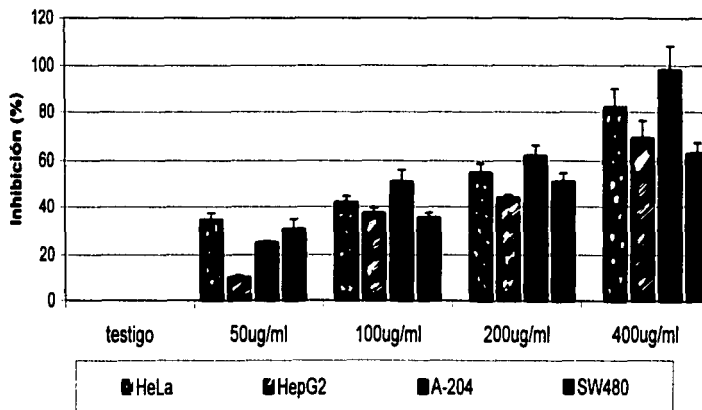
**Cuadro 7.1.3. Inhibición *in vitro* de las células A-204 con extracto de azafrán .**

<b>Dosis aplicadas</b>	<b>Promedio de colonias formadas</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
Testigo	60±3.4	0
50 µg /ml	45±0.4	25
100 µg /ml	31±5.1	51
200 µg /ml	37±4.2	62
400 µg /ml	59±10.2	98

**Cuadro 7.1.4 Inhibición *in vitro* de las células SW480 con extracto de azafrán .**

<b>Dosis aplicadas</b>	<b>Promedio de colonias formadas</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
Testigo	79±2.9	0
50 µg /ml	55±4.3	30
100 µg /ml	51±2.1	35
200 µg /ml	39±3.7	51
400 µg /ml	29±4.3	63

**Gráfica 1. Porcentaje del inhibición en diferentes células cancerígenas humanas *in vitro***



Comportamiento dosis-dependiente en las cuatro líneas celulares con el extracto de azafrán donde las de rabdomiosarcoma (A-204) logran la mayor inhibición.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Cuadro 7.1.5. Concentración de inhibición al 50% (IC<sub>50</sub>) con extracto de azafrán en cultivo de células malignas humanas *in vitro*.**

Tipo de células	µg/ml de extracto de azafrán
A-204	• 95
HeLa	• 165
SW480	• 195
HepG <sub>2</sub>	• 220

## 7.2. Separación de los componentes del azafrán y su efecto citotóxico

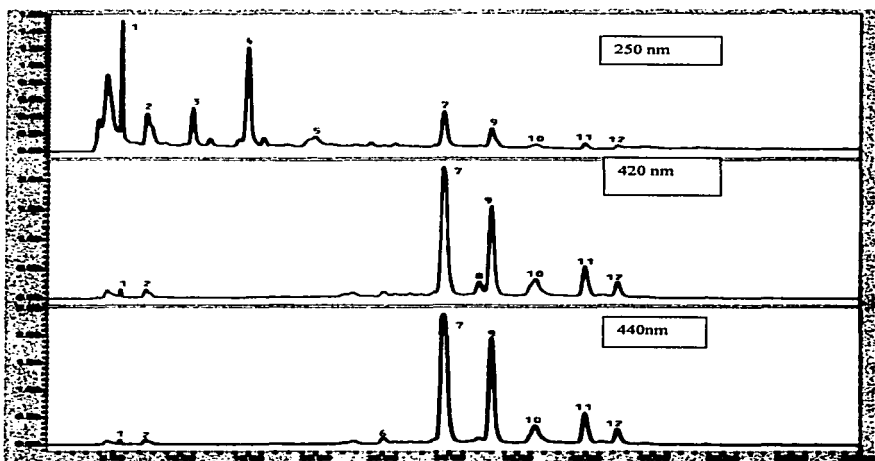
Al aislar los diferentes componentes del extracto de azafrán por HPLC fase reversa se emplean diferentes longitudes de onda: 250nm, 420nm para la fracción 8 y 440nm para la fracción 6; con la obtención total de 12 fracciones, las cuales son identificadas por su tiempo de retención (Rt). Las tres primeras fracciones corresponden a isoformas de crocina, al igual que las fracciones 7, 8, 9 y 12; la fracción 4 es la picrocrocina, la fracción 5 es la picrocrocina ácida. La fracción 6 es el kaemferol y representa el porcentaje menor como componente del extracto, motivo por el que no se le puede determinar su efecto citotóxico. También se identifica al safranal en la fracción 10 y la crocetina en la 11; y el componente más abundante es la trans-crocina 4 localizada en la fracción 7 (Figura 7.2.1.).

De los doce componentes separados, a once se les determina su efecto citotóxico en células de adenocarcinoma de cervix humano (HeLa). Se escoge solo una línea debido a que las cantidades no son suficientes y se tiene que hacer una selección, la línea celular antes mencionada es seleccionada por ser la más importante, debido a que representa la tasa de mayor mortalidad en México por cáncer.

La concentración que se elige para conocer su efecto citotóxico de los componentes es 200µg/ml, ya que es la concentración que más se aproxima al IC<sub>50</sub> obtenido con el

extracto total. Las células tienen una inhibición en su proliferación con todos los componentes; siendo la trans- crocina 3 la que presenta la máxima inhibición con un porcentaje del 36% en la formación de colonias y el safranal es el que logra el menor porcentaje de inhibición con un 3% (gráfica 2 y cuadro 7.2 ).

**Figura 6. Separación de doce componentes del extracto de azafrán por HPLC en diferentes longitudes de onda.**

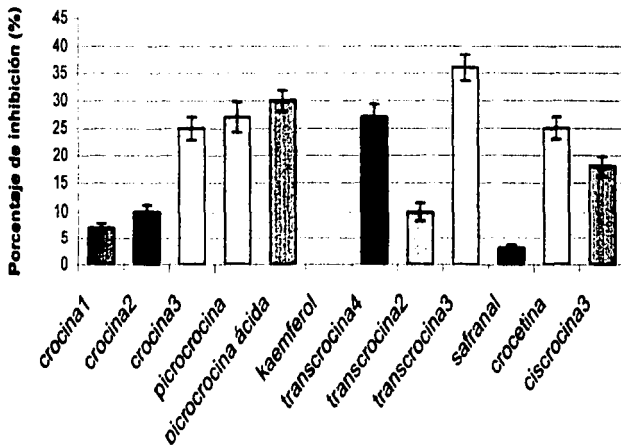


La fracción 8 se obtuvo en 420 nm y la fracción 6 a 440 nm. La transcrocina4 es la fracción más abundante y se puede aislar en las tres longitudes de onda (7)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALTA DE  
CONTENIDO

**Gráfica 2. Inhibición de los diferentes componentes del extracto de azafrán en células *HeLa***



Todos los componentes aislados del azafrán y aplicados a células *HeLa* presentan inhibición. El carotenoide transcrocina3 es el que logra el mejor efecto de citotoxicidad.

**Cuadro 7.2.1. Tiempo de retención y porcentaje de inhibición de los componentes del extracto de azafrán en células HeLa.**

<b>Pico</b>	<b>Rt (min)</b>	<b>Componente</b>	<b>% de inhibición en la formación de colonias</b>
1	6	Crocina 1	7± 0.9
2	8	Crocina 2	10± 1.2
3	11	Crocina 3	25± 2.1
4	15	Picrocrocina	27± 2.7
5	20	Picrocrocina ácida	30± 1.9
6	25	Kaemferol	No determinado
7	29	Trans crocina 4	27± 2.3
8	32	Trans crocina 2	10± 1.6
9	33	Trans crocina 3	36± 2.4
10	37	Safranal	3± 0.6
11	40	Crocetina	25± 2.0
12	42	Cis crocina 3	18± 1.8

TESIS CON  
FALLA DE CUCEN

40

### **7.3. Efecto citotóxico del selenito de sodio en diferentes células tumorales humanas *in vitro*.**

Las concentraciones ocupadas en esta parte experimental son de 10, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  de selenito de sodio, al testigo no se le aplica ninguna concentración y se le toma como parámetro para asignar 0% de inhibición. Los porcentajes de inhibición obtenidos en las células de adenocarcinoma de cervix (HeLa) de menor a mayor concentración aplicadas son de 26, 34, 42 y 52% en la formación de colonias respectivamente (Cuadro 7.3.1.); su comportamiento es dosis dependiente y muestra la mayor sensibilidad en la concentración de 10  $\mu\text{M}$  comparada con las otras líneas celulares; pero resultó ser la más resistente a 200  $\mu\text{M}$ . Su  $\text{IC}_{50}$  se encuentra en la concentración 186  $\mu\text{M}$  (Cuadro 7.3.5.).

Los porcentajes de inhibición en la formación de colonias para las células de carcinoma hepatocelular (HepG<sub>2</sub>), son de 9, 34, 40 y 56% respectivamente de menor a mayor concentración (Cuadro 7.3.2.); siendo la línea celular que tiene mayor resistencia al efecto que causa el selenito de sodio en la concentración a 10  $\mu\text{M}$ . Su  $\text{IC}_{50}$  se determina a una concentración de 164  $\mu\text{M}$  (Cuadro 7.3.5.).

Las células de Rbdomiosarcoma obtienen 17, 31, 38 y 53% de inhibición en su formación de colonias (Cuadro 7.3.3.). En las concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{M}$ , presentan una mayor resistencia al efecto citotóxico del selenito con respecto a las otras células estudiadas. Su  $\text{IC}_{50}$  se determina a los 185  $\mu\text{M}$  (Cuadro 7.3.5.).

Las células de carcinoma de colon tienen los siguientes porcentajes de inhibición 20, 33, 44 y 61% , de menor a mayor concentración respectivamente (Cuadro 7.3.4.). En las concentraciones de 100 y 200  $\mu\text{M}$  los porcentajes con respecto a las otras líneas celulares presentan una mayor inhibición y resultan ser las más sensibles al selenito de sodio. El  $\text{IC}_{50}$  lo presenta en los 144  $\mu\text{M}$  (Cuadro 7.3.5.).

Las diferentes concentraciones de selenito de sodio aplicadas en las líneas celulares cancerígenas *in vitro*, permiten obtener un rango de 9% al 61% de inhibición. Las células de carcinoma hepatocelular (Hep G<sub>2</sub>) cuando se les determina su  $\text{IC}_{50}$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

presentan el menor porcentaje de inhibición por lo que resultaron ser las más resistentes al efecto de este compuesto, mientras que las de carcinoma de colon (SW480) son las más sensibles al presentar el mayor porcentaje. Las células en orden decreciente en sensibilidad para este compuesto es de la siguiente manera: carcinoma de colon (SW480) con  $144 \mu\text{M}$  > carcinoma hepatocelular (Hep G<sub>2</sub>) con  $164 \mu\text{M}$  > rabdiosarcoma (A-204) con  $185 \mu\text{M}$  > adenocarcinoma cervical (HeLa) con  $187 \mu\text{M}$  (Gráfica 3).

El efecto en las cuatro líneas celulares es semejante en las concentraciones de 50 y 200  $\mu\text{M}$ ; sin embargo en la concentración de  $10 \mu\text{M}$  se observa una diferencia marcada en la sensibilidad celular.

**Cuadro 7.3.1 Inhibición *in vitro* de las células HeLa con selenito de sodio.**

Dosis aplicadas	Promedio de colonias formadas	Porcentaje de inhibición
Testigo	$50 \pm 1.8$	0
10 $\mu\text{M}$	$37 \pm 2.6$	26
50 $\mu\text{M}$	$33 \pm 1.7$	34
100 $\mu\text{M}$	$29 \pm 5.1$	42
200 $\mu\text{M}$	$24 \pm 7.2$	52

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Cuadro 7.3.2. Inhibición *in vitro* de las células HepG<sub>2</sub> con selenito de sodio.**

<b>Dosis aplicadas</b>	<b>Promedio de colonias formadas</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
Testigo	80±2.6	0
10 µM	73±1.5	9
50 µM	53±1.8	34
100 µM	48±4.7	40
200 µM	35±3.4	56

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Cuadro 7.3.3. Inhibición *in vitro* de las células A-204 con selenito de sodio.**

<b>Dosis aplicadas</b>	<b>Promedio de colonias formadas</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
Testigo	45±3.8	0
10 µM	37±0.9	17
50 µM	31±3.7	31
100 µM	28±4.5	38
200 µM	21±6.4	53

**Cuadro 7.3.4. Inhibición *in vitro* de las células SW480 con selenito de sodio.**

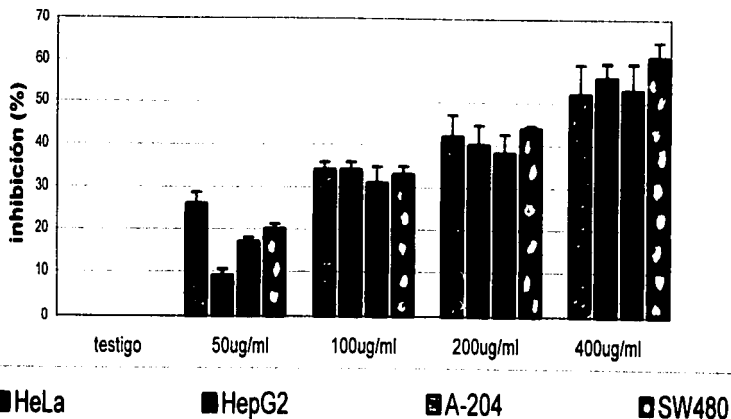
<b>Dosis aplicadas</b>	<b>Promedio de colonias formadas</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
Testigo	70±6.5	0
10 µM	56±1.1	20
50 µM	47±1.8	33
100 µM	39±0.5	44
200 µM	27±3.5	61

**Cuadro 7.3.5. Concentración de inhibición a 50% (IC<sub>50</sub>) en cultivo de células malignas humanas *in vitro* con selenito de sodio**

<b>Línea celular</b>	<b>µM de selenito de sodio</b>
SW480	144
HepG2	164
A-204	185
HeLa	186

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 3. Porcentaje de inhibición causado por el selenito de sodio en diferentes células cancerígenas humanas *in vitro*



El comportamiento de las células es dosis dependiente y en carcinoma de colon se logró la mayor inhibición

#### **7.4. Efecto citotóxico del extracto de azafrán en combinación con el selenito de sodio sobre células cancerígenas humanas *in vitro*.**

El porcentaje de inhibición que alcanzan las células de adenocarcinoma cervical (HeLa), al combinar 50 µg/ml de extracto de azafrán con 10µM de selenito de sodio, es mayor que el obtenido cuando son aplicados solos. El extracto de azafrán incrementa su inhibición un 12%, mientras que el selenito de sodio un 14%, lo que indica que existe un efecto aditivo al combinarlos.

El mismo efecto aditivo se manifiesta al aplicar 100 µg/ml de extracto de azafrán con 10 µM de selenito de sodio, pero en estas concentraciones los porcentajes se incrementan en un 17% y 19 % respectivamente, y nuevamente el selenito manifestó mayor efectividad (cuadro 7.4.1. y gráfica 4).

El proceso es igual para las otras líneas celulares; en las de carcinoma hepatocelular (HepG<sub>2</sub>), los porcentajes de inhibición aumentan en un 6% con el azafrán y un 29% con el selenito de sodio, el cual cuadruplica su efectividad cuando se le combina.

Para las dosis de 100 µg/ml del extracto de azafrán con 10µM de selenito, los valores aumentan un 19 y 42% que los logrados en forma individual y donde nuevamente el selenito presenta seis veces más toxicidad sobre estas células (cuadro 7.4.2 y gráfica 5). En las de rhabdomyosarcoma (A-204), en las concentraciones 50µg/ml + 10µM, aumenta la inhibición para la formación de colonias un 23% con el extracto de azafrán y 28% con el selenito de sodio. Para 100µg/ml + 10µM; incrementa 26% el azafrán y 31% el selenito de sodio. (cuadro 7.4.3. y gráfica 6).

Para las células de carcinoma de colon (SW480), la primera combinación de los dos agentes aumenta un 14% para el extracto de azafrán y un 28% para selenito que los obtenidos en forma individual y en la combinación de 100µg/ml + 10µM, aumenta 17% con el extracto de azafrán y 31% con el selenito (cuadro 7.4.4. y gráfica 7).

Los datos anteriores establecen que, en todas las células empleadas en esta investigación existe una mayor toxicidad al combinar el agente natural con el sintético, que el obtenido

TELAS CON  
FALLA DE ORIGEN

en forma individual, debido a que los porcentajes de inhibición aumentan y esto nos permite determinar que hay un efecto aditivo.

**Cuadro 7.4.1. Efecto citotóxico en células HeLa al combinar extracto de azafrán con el selenito de sodio**

Dosis aplicadas	Promedio de colonias formadas	Porcentaje de inhibición
Testigo	55±6.1	0
10µM de Se	39±3.6	29
50µg / ml de extracto de azafrán	38±4.8	31
100µg / ml de extracto de azafrán	37±3.1	32
10µM de Se + 50µg / ml de extracto de azafrán	31±4.3	43
10µM de Se + 100µg / ml de extracto de azafrán	29±3.7	48

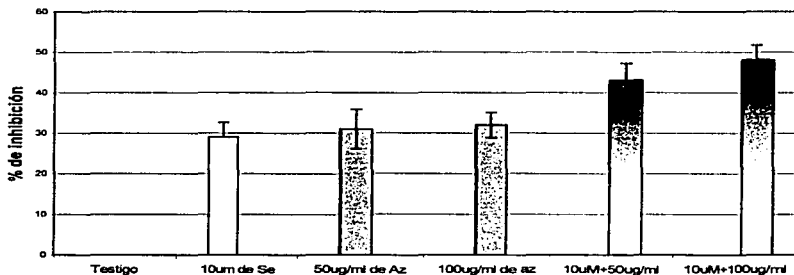
TESIS CON  
FALSA DE GEN

**Cuadro 7.4.2. Efecto citotóxico en células HepG<sub>2</sub> al combinar extracto de azafrán con selenito de sodio**

<b>Dosis aplicadas</b>	<b>Promedio de colonias formadas</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
Testigo	36±5.1	0
10µM de Se	33±1.0	8
50µg / ml de extracto de azafrán	25±5.3	31
100µg / ml de extracto de azafrán	22±5.4	38
10µM de Se + 50µg / ml de extracto de azafrán	24±2.8	37
10µM de Se + 100µg / ml de extracto de azafrán	18±2.8	50

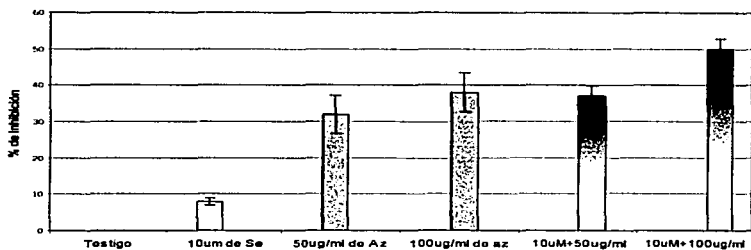
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Gráfica 4. Inhibición in vitro de las células HeLa al combinar selenito de sodio y extracto de azafrán**



Efecto aditivo presentado en la combinación de los dos agentes, con un 43 y 48% de inhibición

**Gráfica 5. Inhibición in vitro de las células HepG2 al combinar selenito de sodio y extracto de azafrán**



Se presenta un efecto aditivo al combinarse los dos agentes quimiopreventivos, donde el selenito al combinarse su efectividad llega a un 50%

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Cuadro 7.4.3. Efecto citotóxico en células A-204 al combinar extracto de azafrán con selenito de sodio**

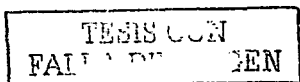
<b>Dosis aplicadas</b>	<b>Promedio de colonias formadas</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
Testigo	94±3.6	0
10µM de Se	79±1.9	16
50µg / ml de extracto de azafrán	74±3.6	21
100µg / ml de extracto de azafrán	62±2.8	34
10µM de Se + 50µg / ml de extracto de azafrán	53±6.2	44
10µM de Se + 100µg / ml de extracto de azafrán	50±1.5	47

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

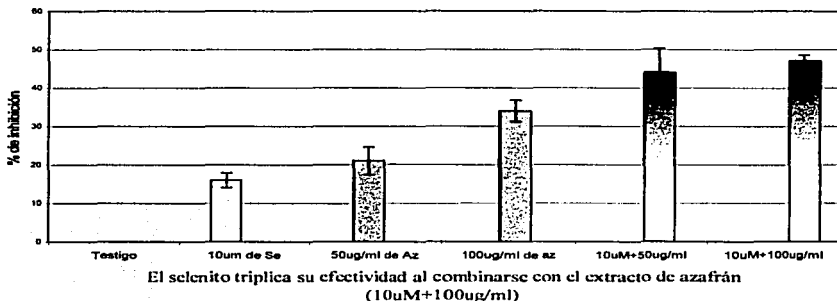


**Cuadro 7.4.4. Efecto citotóxico en células SW480 al combinar extracto de azafrán con el selenito de sodio.**

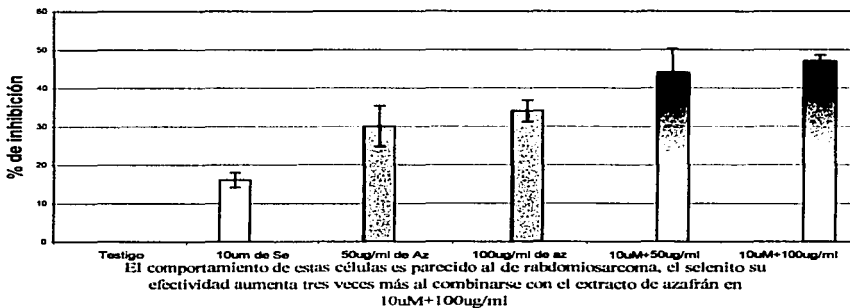
<b>Dosis aplicadas</b>	<b>Promedio de colonias formadas</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
Testigo	55±3.8	0
10µM de Se	46±1.9	16
50µg / ml de extracto de azafrán	39±5.3	30
100µg / ml de extracto de azafrán	37±2.8	34
10µM de Se + 50µg / ml de extracto de azafrán	31±6.2	44
10µM de Se + 100µg / ml de extracto de azafrán	29±1.5	47



**Gráfica 6. Inhibición in vitro de las células A-204 al combinar selenito de sodio y extracto de azafrán**



**Gráfica 7. Inhibición in vitro de las células SW480 al combinar selenito de sodio y extracto de azafrán**



TESIS CON  
FALI A 1977  
EN

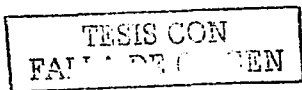
### **7.5. Efecto del extracto de azafrán en combinación con el selenito de sodio en la síntesis de ácidos nucleicos en las células cancerígenas *in vitro*.**

Las células después de haberlas incubado con extracto de azafrán en concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{g/ml}$ , con selenito de sodio 10  $\mu\text{M}$  y su combinación, se les aplica durante 30 minutos en el medio de cultivo donde se encuentran creciendo  $^3\text{[H]}$ -Timidina y  $^3\text{[H]}$ -Uridina, los resultados que se generan son reportados como el porcentaje de inhibición que sufre la síntesis de DNA y RNA al incorporarse este material en las células de adenocarcinoma de cervix ( HeLa), rabdomiosarcoma (A-204) y carcinoma hepatocelular. Los valores que se toman para las células como testigo son los siguientes: HeLa sin inhibición son 42,000 c.p.m = RNA y 74,000 c.p.m = DNA; para A-204 el RNA= 51,000 c.p.m. y DNA= 67.000 c.p.m. y para las células HepG<sub>2</sub> el RNA= 38,000 c.p.m. y DNA= 54,000 c.p.m.

Es eliminada la línea celular de carcinoma de colon (SW480) debido a que los resultados obtenidos al combinar el selenito de sodio con el extracto de azafrán son similares a la de rabdomiosarcoma, pero ésta última se escoge, porque resulta ser más sensible con el extracto de azafrán.

La mayor inhibición que presenta la síntesis del DNA en las células que se incuban previamente con selenito de sodio es carcinoma epitelial cervical (HeLa) con un 20%, las de rabdomiosarcoma (A-204) con un 16% y las células de carcinoma hepatocelular (Hep G<sub>2</sub>) presentó un 10%. En la síntesis de RNA también hay una inhibición del 25% para las células HeLa, 18% en las A-204 y un 13% en las HepG<sub>2</sub>. Así el selenito de sodio muestra una mayor inhibición en la síntesis de RNA con respecto al DNA en las células estudiadas (Tabla 7.5.1 ).

El extracto de azafrán cuando se incuba con las células en concentraciones de 50 $\mu\text{g/ml}$ , tanto el DNA como el RNA sufren una inhibición en su síntesis, para el caso del primero en las células HeLa es de 28%, HepG<sub>2</sub> un 23% y A-204 un 21%; para el RNA, las células HeLa y A-204 presentaron la misma inhibición de un 24% y las de carcinoma hepatocelular un 27%.



En la concentración de 100µg/ml de azafrán el DNA de las células HeLa presentan una inhibición del 34%, en las A-204 un 32% y en las HepG<sub>2</sub> un 29% y el RNA 37% , 34% y 32% respectivamente, el extracto de azafrán en esta concentración mostró una mayor inhibición en el ARN con respecto al DNA.

Cuando se realiza la incubación en donde se combina el selenito de sodio con el extracto de azafrán (10µM + 50µg), la inhibición en la síntesis de RNA se presenta en un rango que va del 44 al 50%; y para el DNA del 41 al 48%, donde los valores obtenidos son superiores que los obtenidos en forma individual, lo que permite determinar que existe un efecto aditivo(cuadro 7.5.1).

Al combinar 10µM de selenito de sodio + 100µg/ml de extracto de azafrán, tanto la síntesis de DNA y RNA disminuyeron más del 50%, siendo las células de rabdomiosarcoma las que presentaron la mayor inhibición en la síntesis de ácidos nucleicos con un 62% para el DNA y un 65% para el RNA (gráficas 8 y 9) .

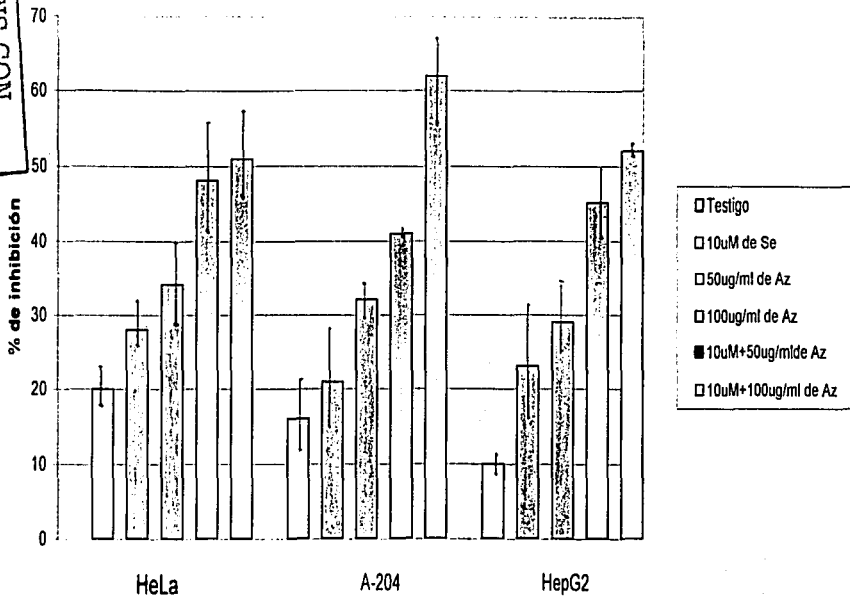
**Cuadro 7.5.1. El extracto de azafrán y selenito de sodio inhiben la síntesis de ácidos nucleicos en células malignas humanas *in vitro***

Concentraciones	HeLa		A-204		Hep G <sub>2</sub>	
	ADN	ARN	ADN	ARN	ADN	ARN
<b>Control</b>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<b>10 µM selenito</b>	20±6.24	25±5.57	16±5.57	18±4.58	10±2.00	13±3.61
<b>50 µg/ml azafrán</b>	28±5.57	24±4.58	21±4.36	24±3.61	23±7.8	27±7.02
<b>100 µg/ml azafrán</b>	34±6.24	37±4.36	32±2.65	34±9.17	29±7.00	32±3.46
<b>10 µM selenito +50 µg/ml azafrán</b>	48±7.55	50±2.65	41±0.58	44±5.57	45±4.36	48±8.66
<b>10µM selenito + 100 µg/ml azafrán</b>	51±6.24	56±5.57	62±6.24	65±3.46	52±1.00	54±4.58

TESIS CON  
FALTA DE  
TEN

TESTES CON  
FALTA A DRA. GON

Gráfica 8. Inhibición causada en células malignas humanas por el extracto de azafrán en combinación con el selenito de sodio

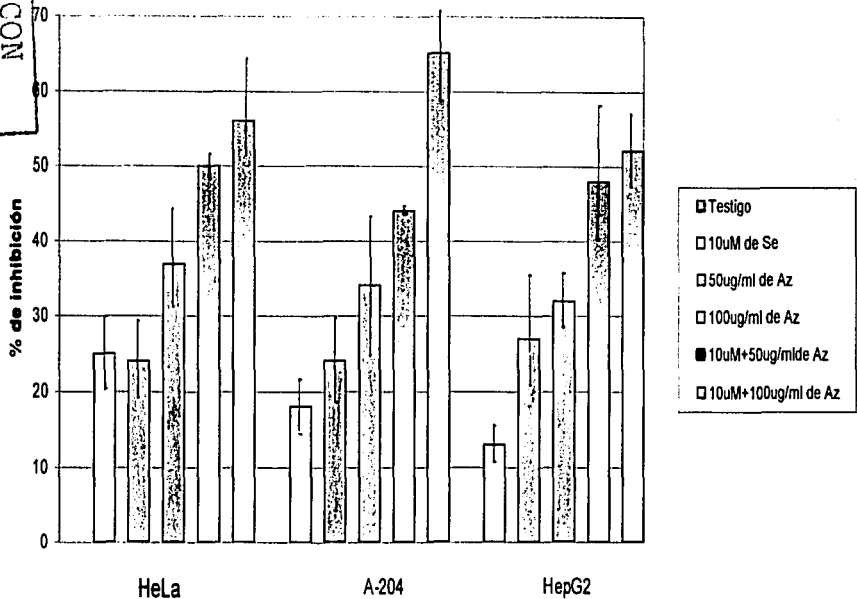


Al aplicar 3 uCi de [H]-Timidina se determina la inhibición que sufrió el DNA de las células cancerígenas al aplicar los dos agentes

55

TESIS CON  
FALLA A DE ORIGEN

Gráfica 9. Inhibición causada en células malignas humanas por el extracto de azafrán en combinación con el selenio de sodio en su síntesis de RNA



Al aplicar 3 uCi de [H]-Uridina se determina la inhibición que sufrió el RNA de las células cancerígenas al aplicar los dos agentes

56

## 8. DISCUSIÓN

El extracto de azafrán indicó poseer una actividad citotóxica en todas las líneas celulares empleadas en este trabajo al inhibir el crecimiento para formar colonias y donde su mayor efectividad la logró con las células de carcinoma de colon.

La principal causa son sus componentes carotenoides, los cuales se pudieron aislar y probar a once de ellos en células de adenocarcinoma cervical (HeLa) y todos provocaron una inhibición, de esta manera el azafrán por poseer varios componentes potencialmente citotóxicos, resultó ser más efectivo que otra especie rica en carotenos o vitamina A (Nair et al. 1994).

Y al poseer varios componentes carotenoides citotóxicos para las células cancerígenas, estos actúan como antioxidantes y poseen la capacidad de reaccionar con los radicales libres y neutralizar sus efectos, alterando el metabolismo carcinogénico y estos efectos se ven reflejados en la inhibición que presentó el crecimiento celular ( Bruce, 1983; Bendich, 1989; Olson 1989; Oberdieck, 1991; Tarantilis, 1994; Abdullaev, 2002).

A nivel intracelular se ha reportado que mantiene reducido al glutatión, así como sus equivalentes ( GSH-R y GSH-S), considerándose la enzima antioxidante principal por poseer un grupo tilo libre que reacciona con los radicales libres, neutraliza sus efectos que lleva a cabo con otras enzimas, en procesos de nutrición celular, aminoácidos que poseen grupos SH como la metionina y cisteína, las proteínas, logrando efectos que directa e indirectamente mantienen los niveles funcionales intracelulares, por lo tanto el extracto de azafrán no sólo inhibe el crecimiento celular, sino que también potencia liza el efecto del glutatión, por lo que también es una alternativa para ocuparlo como quimiopreventivo ( Nair, 1993).

TESIS CON  
FALLA DE CUMPLIMIENTO

En los experimentos realizados en las células con marcadores radiactivos se observa como afecta la síntesis de DNA y RNA al existir una inhibición, lo que indica probablemente que el extracto de azafrán y sus componentes actuaron como las drogas anticancerosas, es decir, su efecto lo realizan directamente en los ácidos nucleicos, como los alquilantes que dañan el DNA en sus uniones covalentes o los antimetabolitos que bloquean los precursores de los nucleótidos. También su intervención con el DNA podría ser porque interactúa con la topoisomerasa II, que como ya se ha reportado en estudios previos, esta enzima está involucrada en la replicación del DNA y es la que mantiene su estructura tridimensional necesaria para llevar a cabo la transcripción, reparación y recombinación (Martín, 1991; Manfait, 1991; Morjani, 1993)

Lo trascendente del extracto de azafrán es su efecto citotóxico en las diferentes líneas celulares, lo que puede indicar que esta involucrado en una función elemental en el ciclo celular o en varias funciones intracelulares que alteran o bloquean su proliferación, de ahí que el origen de la célula no afecte al azafrán para manifestar su efecto inhibitorio; entre estos procesos se podrían mencionar a la detoxificación de xenobióticos, mantener los niveles de grupos SH de las proteínas, cambiar un tilo por disulfuro, remover los hidroxiperóxidos, radicales libres y aminoácidos que se transportan a través de la membrana y a los carcinógenos no les permite continuar con la síntesis de ácidos nucleicos ( Frenkel, 1988, 89; Meister, 2000)

En un pretratamiento que se realizó con el extracto de azafrán en las células tumorales, se determinó que induce casi el doble de los niveles basales de compuestos intracelulares que contienen grupos sulfhidrilos SH ( Abdullaev, 1995), lo cual sirve como una explicación para la inhibición formada en la formación de colonias.

También se ha visto que en las células cancerígenas *in vitro* neutraliza el efecto de compuestos que presentan electrones no apareados en su orbita externa y afecta moléculas de la membrana e intracelulares, las lesiones que provoca pueden

TESIS CON  
FALLA DE CONTENIDO



causar una muerte celular programada (Abdullaev y Frenkel, 1992; Abdullaev 1996; Abdullaev; 1997) .

Al tratar de aplicarlo como un componente quimiopreventivo, ayuda a evitar la carcinogénesis, evitando el desarrollo de una neoplasia, ya que el extracto puede prevenir o controlar la interferencia de los cambios o mutaciones iniciales, la progresión de una célula iniciada en el proceso carcinogénico con cambios fenotípicos (Levi, 1992; Misset, 1998), demostrando poseer una actividad antiproliferativa y antioxidante, pues actúa incrementando los niveles de los  $\beta$ -carotenos, vitamina A y al glutation reducido que interviene en la reparación de las lesiones preneoplásicas, como se ha observado en otros organismos ( Chen, 1982; Nair, 1994).

En una longitud de onda de 250 nm se pudo aislar siete isoformas de la crocina, las cuales presentaron efecto inhibitorio. En un estudio previo Escribano (1999), menciona que en ésta misma longitud el extracto de azafrán posee una fracción con un peso molecular de 30 Kd, que inhibe el crecimiento celular, debido a que altera los enlaces disulfuro intracadena en los polipéptidos que actúan como complejos en el ciclo celular provocando apoptosis (Bruce, 1983; Boulikas, 1995)

Por otro lado, en los resultados se observó que el selenito de sodio, provoca inhibición en el crecimiento de colonias celulares y en la síntesis de los ácidos nucleicos, que puede estar relacionado con los enlaces de selenotrisulfuro que forman ( Frenkel, 1988, 89; Abdullaev, 1994). En estudios previos se ha visto que las células cancerígenas involucran al selenito de sodio en un proceso de estrés oxidativa, la cual termina fragmentando el DNA (Moriani, 1993), impidiendo su reparación y provocando la muerte celular (figura 8.1)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Se ha observado que la inhibición que presentó la síntesis de RNA, cuando actuó el selenito de sodio en las células cancerígenas, interactúa con las proteínas y forma selenoproteínas que contienen selenocisteína (SeCys), la cual se incorpora específicamente en la cadena del RNA en el loci del codon uracil-guanina-adenina por la modificación de la co-traslación de la serina provocando alteraciones en el ciclo celular y muerte celular, siendo este un posible mecanismo de acción a nivel molecular (Stadtman, 1996).

Si se propone como un agente quimiopreventivo, la manera en la que posiblemente actúa es evitando que se desarrolle un tumor, debido a que se incrementan los niveles del glutatión reducido (GSH) manteniendo los grupos tilo de las proteínas y las formas reducidas de otros compuestos y se encarga de proteger a toda la célula del daño oxidativo causado por los radicales libres (Leal, 1998).

Actúa también con los compuestos que poseen enlaces sulfhidrilos y se ha comprobado que, el selenito de sodio en bajas concentraciones y exposiciones cortas como las aplicadas en este estudio, forman selenotrisulfuros como se indica en la siguiente reacción:

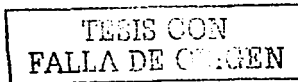


Logrando un equilibrio intracelular (Lanfear, 1994; Thompson, 1994, Lú, 1995).

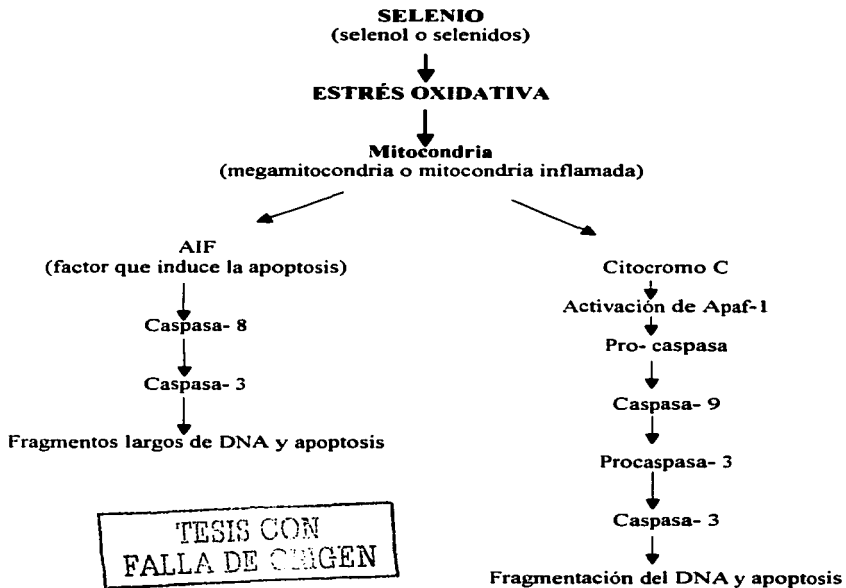
Puede intervenir como antioxidante y prevenir la iniciación de la carcinogénesis aunque no se sabe en forma específica su acción, pero posiblemente sea la reducción de la expresión de una o varias selenoproteínas que pueden estar alterando el ciclo celular.

El selenio *in vitro*, se acumula en el citosol, mitocondrias y núcleo, dando como respuesta la muerte programada de las células y alteraciones en el ciclo celular (Spallholz, 2001) y permitiendo el crecimiento normal de las células no dañadas en su material genético ( Medina, 1982; Wyllie, 1992).

Como ya se menciona los grupos SH son importantes en la célula, ya que estos están involucrados al inicio del metabolismo celular, en una reacción no enzimática para



**Figura 8.1. Iniciación de la apoptosis causada por selenio**



Los radicales libres promueven la formación de enlaces cruzados mediados por sus compuestos sulfhidrilos en aminoácidos débiles como la metionina, histidina, cistina y lisina provocando una alteración en toda la célula (Moriani, 1993).

formar selenotrisulfuros, que se incrementan en los niveles intracelulares y puede dar la potencialidad del selenito como agente quimiopreventivo.

Una vez que el selenito ha formado selenosulfuros, estos inducen al gen p53, que a su vez provoca la apoptosis, aunque en estudios recientes se menciona que también el selenito podría estar involucrado en la ruta del factor Ap-1 $\kappa$  y que actúa como una respuesta a la estrés oxidativa y cuando el selenito se une a este factor de transcripción nuclear ( NF-  $\kappa$ B) responde al estado redox intracelular e inhibe los genes que controlan el crecimiento celular en un proceso muy semejante al de los protooncogenes en la inducción y activación de factores reguladores nucleares que inician la transcripción del DNA ( Meger, 1993, Galter, 1994, Harrison, 1996) .este proceso se inicia cuando a nivel celular hay un incremento del glutatión oxidado (GSSG) el cual trsloca a NF- $\kappa$ B decreciendo la replicación de las cadenas del DNA:: pero cuando los niveles del glutatión oxidado son relativamente altos, provocan la reducción de los niveles de tirodoxina que a su vez detienen la función de NF- $\kappa$ B (Galter, 1994).

Cuando se combino el extracto de azafrán con el selenito de sodio lo que se logró fue la unión de los posibles procesos mencionados, dándonos como resultado un efecto aditivo que se vio reflejado en los porcentajes de inhibición celular obtenidos muy por encima de los logrados en forma independiente de cada uno de estos agentes citotóxicos. Un factor importante para las células es la cantidad de compuestos sulfhidrilo que poseen, ya que estos están involucrados al inicio del metabolismo celular, sin embargo es necesario conocer más sobre los mecanismos que provocan el efecto aditivo, con nuevas metodologías más específicas que nos indiquen cual es el mecanismo que ocupan estos compuestos para lograr dicho efecto en las células cancerígenas.

TESIS CON  
FALLA DE CALLEN

## 9. CONCLUSIONES

1. Este trabajo permitió incrementar las evidencias del extracto de azafrán como un agente muy importante en la quimioprevención; porque contiene compuestos carotenoides que causan citotoxicidad de las células malignas humanas estudiadas *in vitro*.
2. El extracto de azafrán tiene un efecto inhibitorio dosis dependiente sobre el crecimiento de las células malignas humanas *in vitro*.
3. Por el método semipreparativo HPLC se obtuvieron 12 componentes del azafrán: crocina 1, crocina 2, crocina 3, picrocrocina, picrocrocina ácida, kaemferol, Trans crocina 2, transcrocina 3, trans crocina 4, safranal, crocetina y cis crocina 3..
4. Los componentes del azafrán, en su mayoría son carotenoides que causaron el efecto inhibitorio sobre las células cancerígenas HeLa *in vitro* y el que obtuvo mayor efecto fue trans crocina 3.
5. El selenito de sodio presentó un efecto inhibitorio dosis dependiente sobre el crecimiento de las células malignas estudiadas.
6. La combinación del extracto de azafrán con el selenito de sodio, presentó un efecto aditivo en el crecimiento de las células malignas en comparación con los mismos agentes solos.
7. La combinación del extracto de azafrán con el selenito de sodio presentó un efecto inhibitorio aditivo sobre la síntesis de DNA y RNA, siendo una explicación del mecanismo molecular de estos agentes en las células cancerígenas.
8. Los resultados de este trabajo permiten proponer que el azafrán y el selenito de sodio solos y especialmente en combinación, pueden ser agentes quimiopreventivos potencialmente efectivos contra el cáncer.

TESIS CON  
FALLA DE CALIDAD

## 10. REFERENCIAS

Abdullaev FI, Rzaeva NA, Abdullaev MM. Distribution of selenium in macromolecules, cellular fractions and organs of rats. Reports of Azerbaijan Academy of Sciences 1982; 3: 115-119.

Abdullaev FI. The biochemical aspects of the effect of selenium in animal. Progress in Current Biology 1989; 108: 279-288.

Abdullaev FI, Christina Mac Vicar y Frenkel GD. Inhibition by selenium of DNA and RNA synthesis in normal and malignant human cells in vitro. Cancer Letters 1992; 65: 43-49.

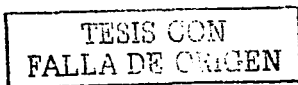
Abdullaev FI y Frenkel GD. Effect of saffron on cell colony formation and cell nucleic acid and protein synthesis. Biofactors 1992; 3 (3): 201-204.

Abdullaev FI y Frenkel GD. The effect of saffron on intracellular DNA, RNA and protein synthesis in malignant and non malignant human cells. Biofactor 1992; 4 (1): 43-45.

Abdullaev FI. Biological effects of saffron. 1993; 4 (2): 83-86.

Abdullaev FI y Frenkel GD. Time-course of cellular nucleic acid synthesis by selenite. Journal of inorganic biochemistry 1994; 55: 113-121.

Abdullaev FI. Inhibitory effect of crocetin on intracellular nucleic acid and protein synthesis in malignant cells. Toxicology Letters 1994; 70: 243-251.



**Abdullaev FI. El azafrán en investigaciones biológicas y médicas. 1995**

**Abdullaev FI y González de Mejía E. Inhibition of colony formation of HeLa cells by naturally occurring and synthetic agents. Bio Factors 1995/1996; 5 (3): 133-138.**

**Abdullaev FI. y González de Mejía E. Antitumor Effect of Plant Lectins. Natural Toxins 1997; 5: 157-167.**

**Abdullaev FI. y González de Mejía E. Actividad antitumoral de compuestos naturales: Lectinas y azafrán. Archivos Latinoamericanos de nutrición 1997; 47(3): 195- 202.**

**Abdullaev FI. y Frenkel GD. Saffron in biological and medicinal research. En: M. Negbi; Saffron *Crocus sativus L.*, Harwood Academic Publisher 1999; 103-113.**

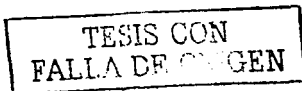
**Abdullaev FI. Saffron ( *Crocus sativus L* ) and its Possible Role in the Prevention Cancer in: Recent Progress in Medicinal Plants 2000; 8: 53- 67.**

**Abdullaev FI. Plant-derived agents. Against cancer. In: SK, Grupa, ed Pharmacology and Therapeutic in the new millennium. Norosa Publishing House. New Delhi, India 2001; 30: 345-354.**

**Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus L.*) *Experimental Bio Med*, 2002; 247: 20-25.**

**Abe K, Saito H: Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation. *Phytother Res* 2000; 14: 149-152.**

**Basker D y Negbi M. Uses of saffron. *Econ Bot* 1983; 3: 228-236.**



**Bendich A y Olson JA. Biological actions of carotenoids. FASEB J 1989; 3:1927-1932.**

**Boulikas T. Phosphorylation of transcription factor and control of the cell cycle. Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression 1995; 5 (1): 1-77.**

**Bruce NA. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. Science 1983; 221: 1256-1264.**

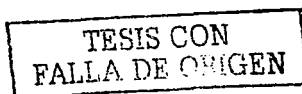
**Caffrey PB y Frenkel GD. Selenium compounds prevent the induction of drug resistance by cisplatin in human ovarian tumor xenografts in vivo. Cancer Chemother Pharmacol 2000; 46: 74-78.**

**Chang PY, Wang CK, Liang CT y Kuo W. The pharmacological action of Zang Hong Hua ( *Crocus sativus L.* ) Effects on the uterus and estrous cycle. Yao Hsueh Hsueh Pao 1964; 11: 94-100.**

**Chen J, Mabel P, Goetchius et al. Effects of Dietary Selenium and vitamin E on hepatic Mixed-Function oxidase activities and in vivo covalent binding of aflatoxin B1 in Rats J Nutr 1982; 112: 324-331.**

**Christensen MJ et al. Regulation of glutathione S-transferase gene expression and activity by dietary selenium. Biochemical and biophysical research communications 1994; 202: 271-277.**

**Clark LC. The epidemiology of selenium and cancer. Fed Proc 1985; 44: 2584-9.**





Clark LC, Combs GF Jr, Turnbull BW, Slate E, Arliberts D, Abele D et al. The nutritinal prevention of cancer with selenium 1983-1993: a randomized clinical trial. JAMA 1996; 276: 1957-1963.

Clark LC et al. Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial. 1998; 81: 730-734.

Combs GF y Combs SB. The role of selenium in nutrition. Academic Press 1986; 413-461

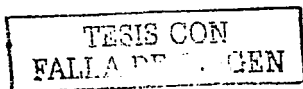
Combs GF Jr y Gray WP. Chemopreventive Agents: Selenium. 1998; 79( 3): 179-192.

Daegen JT et al. Determination of the Distribution of selenium between glutathione peroxidase selenoprotein P and Albumin in plasma. Analytical Biochemistry 1993; 208: 176-181.

Escribano J, Alonso GL, Cocu-Prados M, Fernandez J-A. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron ( *Crocus sativus L.* ) inhibith the grow of human cancer cells *in vitro*. Cancer Lett 1996; 100: 23-30.

Escribano J, Ríos I, Fernández JA. Isolation and cytotoxic properties of novel glycoconjugate from corms os saffron plant *Crocus sativus L.* Biochimica et biophysica Acta 1999; 1426: 1217-222.

Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M, Fernandez JA Crocin, safranal and picrocrocin from saffron ( *Crocus sativus L.* ) inhibit the growth of human cancer cells *in vitro*. Cancer Lett 2000; 100 (1-2): 23-30.



Fender, PH y Wirmer F. *Chim Acta* 1975; 581: 1608-1620.

Frenkel GD y Falvey D. Evidence for the involvement of sulhydryl compounds in the inhibition of DNA synthesis by selenite. *Mol Pharmacol* 1988; 34: 573-577.

Frenkel GD y Falvey D. Involvement of cellular sulhydryl compounds in the inhibition of DNA and RNA synthesis by selenite. *Wendri A. de Selenium in Biology and Medicine*. Berlin, Springer-Verlag 1989; 79-82.

Gainer JL y Jones JR. The use of crocetin in experimental arterosclerosis. *Experientia* 1975; 31: 548-549.

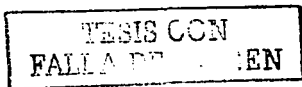
Ganther HE. *J.Am Coll. Toxicol* 1986; 5: 1-5.

Hossein H y HM Younesi. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and metal extracts in mice. *BMC Pharmacology* 2002; 2:7

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) Mortality Statistics, México, 2001.

Ip C y Ganther HE. Activity of methylated forms os selenium in cancer prevention. *Cancer Research* 1990; 50: 1206-1211.

Ip C, Vadhanavkit S. y Ganther H. Cancer chemoprevention by aliphatic selenocyanates: effect of chain length on inhibition of mammary tumors and DMBA adducts. *Carcinogenesis* 1995; 16: 35-38.



**Ip, Clement. Lessons from basic Research in Selenium and Cancer prevention. American Society for Nutritional Sciences 1998; 1845- 1854.**

**Kasumov FJ The extract of saffron flowers. Gos. Plan. Press, Baku, Azerbaijan. 1970**

**Kok, FJ, De Bruijn AM, Hofman A, Vermeeren RY y Valkenburg HA. Is suerum selenium a risk factor for cancer in men only?. Am J Epidemiol 1987; 125: 12-16.**

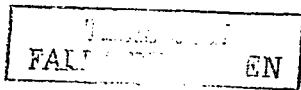
**Leal, Pérez Miriam. Mecanismos de acción de la luteína, ellicopeno y el ester apocarotenoico sobre el efecto citotóxico y genotóxico de la toxina T-2 en pollos de engorda. Tesis Doctoral. UAQ.130 p. 1998.**

**Li N, G.Lin Y, Kwan W y Min ZD. Simultaneous quantification of five mayor biologically active ingredients of saffron by higt-performance liquid cromatography. J Chromatografy A 1999; 849 (2): 349-355.**

**Lozano P, Delgado D, Gómez D, Rubio M, Iborra JL, Anon. Destructive Method to determined the safranal content of saffron ( *Crocus sativus L.*) by supercritical carbon dioxide extraction combined with higt-performance liquid chromatography and gas chromatography. J Biochem Biophys Methods 2000; 43: 367-378.**

**Malcolm LH, Colin KW, Watts et al. Inhibition of AP-1 binding and transcription by gold and selenium involving conserved cysteine residues in Jun and Fos. Proc Natl Acad Sci 1995; 92: 4497-4501.**

**Martin YC. Computer assisted rational drug design In: Langonc. J. (Ed) Methods in Enzymology Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications (part B:**



ESTA TESIS NO DEBE  
SER DEVOLVIDA A LA BIBLIOTECA

**Antibodies and Antigens. Nucleic Acids. Polysachcarides and Drugs Press Inc 203; 587. 1991.**

**Medina D, Lane H. And Oborns CJ Uptake and localization of selenium-75 in mammary epithelial cell lines in vitro. Cancer Letters 1982; 15: 301-310.**

**Medina D y Morrison D. Current ideas on selenium as a chemopreventative agent. Pathol Immunopathol Res 1988; 7: 187- 199. 1988**

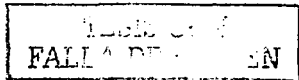
**Meeker HC, Eskew ML, W Scheuchenzuber R, Scholz and A. Zarkower. Antioxidant Effects on Cell-Mediated Immunity. Journal of Leukocyte Biology 1985; 38: 451-458.**

**Menfait M, Morjani H, Efremov R, Angibousi J-F, Polissiou M, y Nabiev F. High sensitive detection of intracellular carotenoids in single living cancer cells aprovech Raman spectroscopy In: Spectroscopy of Biological Molecules Royal Society of Chemistry (UK) Hester R.E and Ginng, RB (Eds) 303-304. 1991.**

**Milner JA, Greeder GA y Poirier KA. Selenium and transplantable tumors. In Selenium in Biology and Medicine. Chapter 13, pp. 146-159. J.E. Spallholz, J.L. Martin and H.E. Ganther, Eds. AVI Publishing Co. Westport CT. 1981.**

**Minoru Sugiura, Yukihiro Shoyama, Hiroshi Saito y Kazuho Abe. The effects of ethanol and crocin on the induction of long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampal slices. Jpn. J Pharmacol 1995; 67: 395-97.**

**Miwa . T. The proprieties of saffron. Japanese J Pharmacol 1954; 4: 63-73.**



Morimoto S, Umezaki Y, Shoyama Y, Saito H, Nishi K y Trino N. Post-Harvest degradation of caroteno id gucose esters in saffron. *Planta Med* 1994; 60: 438-440.

Morjani H, Riou J-F, Nabiev F, Lavelle Y y Manfait M. Molecular studied by surface enhanced Raman scartering spectroscopy. *Cancer Lett* 1993; 53: 4784-4790.

Muñoz, López de Bustamante. *Plantas medicinales y aromáticas, estudio, cultivo y procesado*. Ed. Mundi Prensa. 1987.

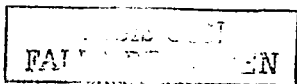
Morjani H, Riov JF, Nabiew Y, Lavelle F y Manfait M. Molecular and cellular interaction between intoplicine, DNA and topoisomerase II studied by surface. Enhanced Raman scattering spectroscopy. *Cancer Res* 1993; 53: 4784-4790.

Nadkarni KM. *Crocus sativus*, *Nigella sativa*, in K.M. Nadkarni (ed) *Indian Materia Medica Popular Prakashan, Bombay*. 386-411; 1976.

Nair SC, Pannikar B y Panikar KR. Antitumoral activity of saffron (*Crocus sativus*) *Cancer Letters* 1991; 57: 109-114.

Nair SC, Salomi JM, Varghese CD, Panikkar B y Panikkar KR. Effect of saffron on thymocyte proliferation, intracellular glutathione levela and its antitumor activity. *BioFactor* 1992; 4 (1): 51-54.

Nair SC, Salomi MJ, Varghese CD, Panikkar B y Panikkar KR. Effect of safron on thymocyte proliferation, intracellular glutatione leveles and its antitumor activity. *Biofactors* 1992; 4(1): 51.54.



Nair SC, Varghese CD, Panikar KR, Kurumboor SK y Parathod RK. Effects of saffron on Vitamin A levels and its antitumour in mice. *Int J Pharmacog* 1994; 32 ( 2) : 105-114.

Nair SC, Kurumboor SK y Hasegawa JH. Saffron chemoprevention in biology and medicine: A review. *Cancer Biotherapy* 1995; 10(4): 257-264.

Ni, X. Research progress on saffron (*Crocus sativus* L) *Zhongcaoyao* 1992 23: 100-107.

Oberdieck, R. Contribution to knowledge and analysis of saffron *Crocus sativus* L. *Dtsch. Lebensm.Rundsch.* 1991; 87(8): 246-252.

Olson JA. Provitamin A fuctions of carotenoids: the conversion of beta-carotene into vitamin A. *J Nutr* 1989; 119: 127-134.

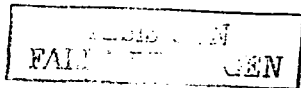
Olson JA. Biological actions of carotenoids *Jnutr* 1989; 119: 94-96.

Pérez, Bueno M. El azafrán. Cultivo, enfermedades, remedios, industrialización. Ed Mundi Prensa. 1989.

Pfander H.; Schurtenberger, H. Biosynthesis of C<sub>20</sub> -carotenoids in *Crocus sativus*. *Phytochemistry* 1982, 21, 1039-1042.

Ríos JL, Recio MC, Giner RM y Máñez S. An Update Review of saffron and its Active constituents. *Phytotherapy Research* 1996; 10: 189-193.

Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE et al. Selenium: Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase. *Science* 1973; 179: 588-590.



**Safinter. All Rights Reserved 1997.**

**Salomi MJ, Nair SC y Pinikkar KP.**Inhibitory effects of *Nigella sativus* and saffron (*Crocus sativus*) on chemical carcinogenesis in mice and its non-mutagenic activity. *Proc Ker Sci* 1990; Congress 3, 125, 1990.

**Salomi MJ, Nair SC y Panikkar KP.** Inhibitory effects of *Nigella sativus* and saffron *Crocus sativus* on chemical carcinogenesis in mice. *Nutrition and Cancer* 1991; 16 (1): 67-72.

**Schrauzer GN.** *Biology Trace Elemen Res* 1992; 33, 51.

**Shamberger RJ.** The genotoxicity of selenium. *Mutat.Res.* 1985; 154(1): 29-48.

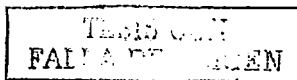
**Spallholz JE, Martin JL, Gerlach ML y Heinzerling RH.** Immunologic Responses of mices Fed Diet Supplemented with Selenite Selenium. *Proceedings of the Society for Experimental Medicine and Biology* 1973; 143: 685-689.

**Speranza G, Dada G, Manitto P, Monti D y Gramatica P.** 13-Cis-crocin: a new crocinoid of saffron. *Gazz Chim. Ital* 1984; 114: 189-192.

**Stoner GD, Morse MA y Kelloff GJ.** Prospective in cancer chemoprevention. *Environ Health Pers* 1997; 105, suppl. 4: 945-954

**Swan DK, Foro B.** Chemoprevention of cancer: Review of the literature. *ONF* 1997; 24: 719-727.

**Szita, E.** The spice of antiquity: saffron. *Vintage* 1987; 16(2): 12-19.



Tarantilis PA, Polissicu M, Morjani H, Avot P, Bel Jebbar A. y Manfait M. Anticancer activity and structure of retinoic acid and carotenoids of *Crocus sativus* L. On HL60 cells. *Anticancer Res* 1992; 12: 1989-1992.

Tarantilis PA, Morjani H, Polissiou M y Manfait M. Inhibition of growth and induction of differentiation of promyelocytic leukemia (HL-60) by carotenoids from *Crocus sativus* L. *Anticancer Res* 1994; 14: 1913-1918.

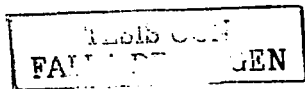
Tarantilis PA, Tsoupras G y Polissiou M. Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography – UV- visible photodiode- array detection-mass spectrometry. *J. Chromatography* 1995; 699 (1-2): 107-118.

Verma SK y A. Bordia. Antioxidant property of Saffron in man. *Indian J Med Sci* 1998; 52 (5): 205-207.

Wartenberg LW In: Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanism II. Kukoda, Shankel and Waters (Eds). Plenum Publishing Corporation. NY- London. 155-166. 1990.

Winterhalter P, Straubinger M. Saffron- renewed interest in an ancient spice. *Food Rev Int* 2000 16 (1): 39-59.

Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11: 95-103.





**Yu SY, Chu Y J, Gong XL, Hou C, Li WG, Gong HM y Xie, JR. regional variation of cancer mortality incidence and its relation to selenium levels in China. Biol Trace Elem Res 1985; 7:21-29.**

**Zargari A: Medicinal Plants. Tzhran, University Press 1990, 4: 574-578**

**Zhang Y, Shoyama MY, Sugiura y Saito H. Effects of *Crocus sativus L.* On the etanol induced impairment of passive avoidance performances in mice. Biol Pharm Bull 1994; 17 (2): 217-221.**

**Zhou Q, Sun Y y Zhang X. Saffron *Crocus sativus L.* J. Traditional Chinese Med 1987; 28: 59-61.**