

# UNIVERSIDAD DE SONORA

## DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Actividad antiproliferativa del extracto metanólico de  
*Asparagus spp.* sobre las líneas celulares cancerígenas  
HeLa y A-549

### TESIS

Que para obtener el grado de

Químico Biólogo Clínico

Presenta

**Fátima Paulina Pelayo Martínez**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Fátima Paulina Pelayo Martínez**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Químico Biólogo Clínico otorgado por la Universidad de Sonora, Unidad Regional Norte, Campus Caborca.

---

Presidente

Dra. Dora Edith Valencia Rivera

---

Asesor Externo

Dra. Jael Quintero Vargas

---

Secretario

Dra. Beatriz Montaña Leyva

---

Vocal

Dr. Jesús Ortega García

---

Suplente

M.C. María del Carmen García Moraga

## **DEDICATORIAS**

### **A Dios:**

Por haberme cuidado y guiado por el buen camino y permitirme llegar a una de las metas más importantes de mi carrera y haber aprendido de los errores y los obstáculos que se me presentaron y por hacerme tan feliz con lo que me ha dado: familia, amigos y compañeros.

### **A mis Papás:**

Porque han sido el ejemplo a seguir, por haberme guiado por este camino y no dejar que me rindiera antes de haber luchado, porque haberlos tenido a ustedes ha sido lo mejor que me ha pasado en este mundo. Siempre estaré eternamente agradecida con ustedes, los amo mucho.

### **A mi hermano Juan:**

Por haberme cuidado en mi estancia en Hermosillo para que vea que cuando uno se propone las cosas de corazón si se pueden alcanzar las metas y siempre alcancé las metas.

### **A mi familia y amigos:**

Por apoyarme siempre en mis decisiones, gracias por estar conmigo siempre cuando los he necesitado.

Que dios los bendiga siempre.

## AGRADECIMIENTOS

A la que fue mi casa durante estos cuatros años, a la Universidad de Sonora Unidad Regional Norte por haberme dado las facilidades y oportunidad de haber estudiado aquí por todas las enseñanzas que me dejó y el arma que me dió para luchar en el futuro de mi vida.

Le agradezco a mi directora de tesis la **Dra. Dora Edith Valencia Rivera** por darme el apoyo y oportunidad para cumplir esta meta; estaré siempre agradecida con usted.

A mi asesora externa la **Dra. Jael Quintero Vargas** por su apoyo y comprensión, por todas las enseñanzas que me dejó durante mi estancia en Hermosillo por brindarme su confianza muchas gracias estaré eternamente agradecida.

Al **Dr. Jesús Ortega** por brindarme apoyo durante el proyecto de tesis y ser mi profesor muchas gracias.

A la **Dra. Beatriz Montaña Leyva** por brindarme el apoyo durante el proyecto de tesis.

A la **M.C. María del Carmen García Moraga** por brindarme conocimientos durante mi carrera y apoyarme con sus consejos, gracias.

## CONTENIDO

	Página
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	iv
<b>LISTA DE TABLAS</b>	v
<b>ABREVIATURAS</b>	vi
<b>RESUMEN</b>	viii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	4
2.1. Cáncer	4
2.1.1. Epidemiología del cáncer	5
2.2. Productos naturales	8
2.3. Generalidades de <i>Asparagus spp.</i>	10
2.4. Actividades biológicas del espárrago	14
2.4.1. Actividad antiproliferativa de <i>Asparagus spp.</i> sobre líneas celulares cancerígenas	16
2.5. Métodos para evaluar viabilidad celular	16
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	18

<b>4. OBJETIVOS</b>	19
4.1. General	19
4.2. Específicos	19
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	20
5.1. Materia prima	20
5.2. Liofilización del espárrago	20
5.3. Obtención de los extractos metanólicos	21
5.4. Líneas celulares	21
5.5. Evaluación de la actividad antiproliferativa	22
5.6. Análisis estadístico	23
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	24
6.1. Rendimiento de la extracción metanólica	24
6.2. Actividad antiproliferativa de los extractos metanólicos del espárrago	27
<b>7. CONCLUSIONES</b>	33
<b>8. RECOMENDACIONES</b>	34
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	35
<b>10. APÉNDICES</b>	41
A. Método de reducción de MTT	41

B. Preparación del medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (D-MEM)	43
C. Preparación de PBS 10X	45

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Modelo esquemático de carcinogénesis.	6
2. Rizoma y raíces de una planta de espárrago.	12
3. Tallo y helecho de una planta de espárrago, con flores, frutos y semillas.	13
4. A) Espárrago completo. B) Espárrago parte comestible (EPC). C) Espárrago parte no comestible (EPNC).	25
5A. Actividad antiproliferativa del EPC sobre la línea celular normal L-92.9	30
5B. Actividad antiproliferativa del EPNC sobre la línea celular normal L-929.	30
6A. Actividad antiproliferativa del EPC sobre la línea celular HeLa.	31
6B. Actividad antiproliferativa del EPNC sobre la línea celular HeLa.	31
7A. Actividad antiproliferativa del EPC sobre la línea celular A-549.	32
7B. Actividad antiproliferativa del EPNC sobre la línea celular A-549.	32

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Rendimiento del proceso de liofilización del espárrago.	26
2. Rendimiento de la extracción metanólica.	26
3. Actividad antiproliferativa ( $IC_{50}$ ) de los extractos metanólicos de espárrago.	28

## ABREVIATURAS

MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
EPC	Espárrago parte comestible
EPNC	Espárrago parte no comestible
HeLa	Línea celular cancerígena (Carcinoma de cérvix humano)
A-549	Línea celular cancerígena (Carcinoma de pulmón humano)
L-929	Línea celular normal (Tejido conectivo subcutáneo de ratón)
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria a la cual se reduce al 50 % la proliferación celular
µg	Microgramos
mL	Mililitros
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
cm	Centímetro
MCF7	Línea celular cancerígena (Adenocarcinoma de mama humano)
HepG2	Línea celular cancerígena (Carcinoma de hígado humano)
FDA	Diacetato de fluoresceína
°C	Grados centígrados
Kg	Kilogramos

g	gramos
mBar	Milibar (unidad de presión)
p:v	Relación peso-volumen
rpm	Revoluciones por minuto
ATCC	American Type Collection
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
μL	Microlitros
DMSO	Dimetilsulfóxido
mg/mL	Miligramos por mililitro
nm	Nanómetros
EUA	Estados Unidos de América

## RESUMEN

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, solo superado por las enfermedades cardiovasculares. Esta enfermedad se produce por una alteración de las células corporales e inicia cuando dichas células empiezan a comportarse de una manera anormal, se multiplican excesivamente y se forma el tumor o neoplasma. La medicina alternativa es un grupo de diversos sistemas de cuidados médicos y de salud, de prácticas y productos que no se consideran, por ahora, que forman parte de la medicina convencional y la mayoría de los tratamientos alternativos tienen como propósito fortalecer el organismo y controlar los efectos secundarios de los tratamientos convencionales. El espárrago es una planta herbácea perenne de la familia de las *Liliáceas*, que soporta factores climáticos extremos. Es un producto perecedero cuyo brote tierno denominado turión es considerado un alimento gourmet por su exclusivo consumo y sus altos precios. Entre los principales atributos de esta hortaliza se cuentan el ser un producto bajo en calorías, en grasa y colesterol, con alto contenido de vitaminas A, C, tiamina (B<sub>1</sub>) y riboflavina (B<sub>2</sub>), así como rico en potasio y en fosfato de calcio. El objetivo principal de este estudio fue evaluar la actividad antiproliferativa del extracto metanólico del espárrago (*Asparagus spp.*) sobre las líneas celulares cancerígenas: HeLa (carcinoma de cérvix humano) y A-549 (carcinoma de pulmón humano). Para evaluar el efecto antiproliferativo de los extractos metanólicos del espárrago se utilizó el método estándar de las sales de tetrazolio (MTT). El extracto metanólico de la parte comestible del espárrago

(EPC) mostró mayor actividad antiproliferativa que el extracto metanólico de la parte no comestible (EPNC) sobre las líneas cancerígenas utilizadas (HeLa y A-549), con un valor de  $IC_{50}$  de  $2563.4 \pm 4.5$  y  $2853.6 \pm 22.8 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Estos resultados indican que los espárragos de la región de Caborca, Sonora poseen baja actividad antiproliferativa.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en vías de desarrollo. Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que el 80 % de la población mundial utiliza la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de estos tratamientos implica el uso de extractos o sus principios activos. La OMS define a las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. México es un país rico en biodiversidad vegetal por lo que ofrece una fuente inagotable de plantas con propiedades medicinales que aún no se han estudiado. La medicina herbolaria es todavía de las más importantes en regiones rurales de nuestro país, debido a que presentan menores efectos secundarios que los medicamentos sintéticos (Domingo *et al.*, 2003). En la actualidad, las plantas representan el recurso natural más utilizado para la búsqueda de compuestos bioactivos y se encuentran en estudio una gran diversidad de familias de ellas, entre las que se encuentran *Umbelliferae*, *Euphorbaceae*, *Papaveraceae* y *Liliaceae* (Pérez *et al.*, 2005; Bagiu *et al.*, 2012).

*Asparagus officinalis* L. (espárrago hortícola) es una planta herbácea que pertenece a la familia de las Liliáceas, la cual soporta factores climáticos extremos. El espárrago es una planta dioica y perenne comprendida dentro del

género *Asparagus*. Este género incluye más 100 especies originarias del sur de Europa, Asia y África, algunas de ellas con valor ornamental y solo una con valor hortícola (*Asparagus Officinalis L.*) (Gatti *et al.*, 2001). Esta planta es usada tradicionalmente en la farmacopea española como tónico estomacal, diurético, laxante y antihemorrágico; también para prevenir la formación de cálculos renales y biliares, e incluso como anticancerígeno (Fuentes-Alventosa, 2009). Existen en la actualidad reportes en la literatura acerca de la amplia gama de actividades biológicas que posee el espárrago, entre las que se pueden mencionar: actividad antifúngica (Wang *et al.*, 2001; Sautour *et al.*, 2007), antiparasitaria (Debebe *et al.*, 2012), hepatoprotectora (Rupesh *et al.*, 2011), hipoglucemiante (Somani *et al.*, 2012), antioxidante (Kongkaneramt *et al.*, 2011), anticancerígena (Almehdar *et al.*, 2012; Mitra *et al.*, 2012), entre otras. Entre los principales componentes bioactivos presentes en el espárrago destacan los flavonoides, las saponinas, los esteroides, los fructanos, asparagina, arginina, tirosina y polisacáridos de la pared celular, así como el espárrago cuenta con minerales como potasio, fósforo, calcio y magnesio, así como ácido fólico, vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, C, E. (Amaro *et al.*, 1999). En México, las investigaciones sobre esta hortaliza están enfocadas al mejoramiento en la calidad y productividad del cultivo, pero el estudio acerca de sus propiedades biológicas es limitado; por lo cual es necesario profundizar en el conocimiento de los compuestos bioactivos presentes en el espárrago y su función en la prevención de diversas enfermedades. Con base a las propiedades biológicas reportadas en espárrago cultivado en otras regiones del mundo es de gran relevancia encontrar un valor agregado a un producto hortícola de gran

importancia económica en la región de Caborca, Sonora mediante el estudio de la actividad anticancerígena del espárrago.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Cáncer

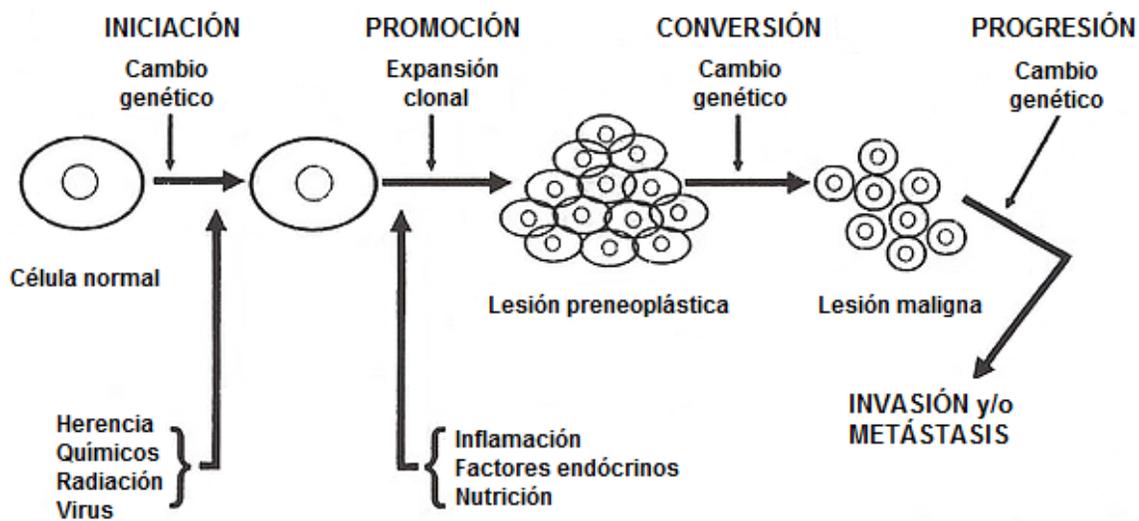
El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, superado solo por las enfermedades cardiovasculares y se caracteriza por una alteración del equilibrio entre la proliferación y mecanismos normales de muerte celular (Herrera y García, 2003). Este padecimiento es el resultado de dos procesos sucesivos: el aumento descontrolado de la proliferación de un grupo de células que da lugar a un tumor o neoplasia, y la posterior adquisición por estas células de capacidad invasiva, que les permite diseminarse desde su sitio natural en el organismo, colonizar y proliferar en otros tejidos u órganos (proceso conocido como metástasis) (Cavenee y White, 1995). El cáncer se origina cuando ciertos factores ambientales o exógenos (agentes químicos, físicos y biológicos, incluyendo ciertas infecciones virales y parasitarias), actúan conjuntamente con factores endógenos (constitución genética) y endocrinos provocando modificaciones en el genoma. Los agentes etiológicos son los que ocasionan de modo directo la transformación maligna y desencadenan una variedad de mecanismos genéticos y bioquímicos que conducen a la aparición de una tumoración, llamándose a este proceso carcinogénesis (Herrera y García, 2003). El cáncer implica cambios en el metabolismo celular que influyen en la función mitocondrial, y la supresión de la apoptosis está relacionada con una inhibición de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (Galluzzi *et al.*, 2006). Una de las características distintivas de las células cancerosas es su

incrementada resistencia a la inducción de apoptosis, mecanismo clave en el control del crecimiento y regulación de la homeostasis de los tejidos.

El proceso de carcinogénesis comprende cuatro fases principales. La primera fase del modelo de carcinogénesis se llama iniciación. En esta etapa interviene un agente iniciador, el cual tiene la capacidad de inducir cambios físicos o estructurales en los genes. Esto ocurre en el lapso en que las células se dividen, de tal manera que las células hijas fijan el daño y quedan iniciadas. Estas células iniciadas crecen con una velocidad ligeramente superior a las normales, y pueden pasar inadvertidas durante un período muy largo. En la segunda fase, denominada promoción, un agente promotor interviene sobre estas células e induce la proliferación celular. Por lo regular se requieren meses o años. La tercera etapa es llamada transformación, ya que una célula preneoplásica se convierte en una que expresa el fenotipo maligno. La última etapa es la progresión, o adquisición de nuevas alteraciones genéticas que provocan un aumento de la malignidad, con capacidad invasiva y metastásica (**Figura 1**) (Herrera y García, 2003; Anand *et al.*, 2008).

### **2.1.1. Epidemiología del cáncer**

La importancia del problema del cáncer se define con dos parámetros: 1) las cifras de incidencia del cáncer o nuevos casos que aparecen cada año y 2) las cifras de mortalidad anual por cáncer (Senra, 2002). Factores genéticos y



**Figura1.** Modelo esquemático de carcinogénesis (Herrera y García, 2003).

medioambientales contribuyen al incremento en la morbilidad y mortalidad de distintos tipos de cáncer (Cavia *et al.*, 2007).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que una de las principales causas de muerte en las mujeres es el cáncer, principalmente de tipo ginecológico. Sin embargo, los hombres no se encuentran exentos de esta enfermedad, de tal manera que dentro del grupo de tumores malignos que se ha encontrado que afectan a ambos sexos, el cáncer de pulmón, tráquea y bronquios tiene mayor incidencia en los varones (WHO, 2013). Asimismo, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) señala al cáncer cérvico-uterino como un importante problema de salud pública entre las mujeres del mundo en desarrollo, especialmente en América Latina y el Caribe. Igualmente reporta que, aún cuando esta enfermedad puede evitarse en gran medida, los esfuerzos colectivos para prevenirla no han logrado disminuir su efecto en la región de las Américas (PAHO, 2012).

En México, al igual que en el plano internacional, existe un incremento en los casos de cáncer (INEGI, 2010). Durante 2009 las principales causas de morbilidad hospitalaria en la población mexicana fueron por tumores malignos en los órganos hematopoyéticos (leucemias en su mayoría) con 17.9%; órganos digestivos con 14.8%; y mama con 12.5% de los casos; en contraste, los tumores del labio, de la cavidad bucal y de la faringe (1.6%); ojo y sus anexos (0.5%) y los tumores malignos (primarios) de sitios múltiples independientes (0.1%), presentan los porcentajes más bajos (INEGI, 2012).

Entre los hombres, las principales causas de morbilidad hospitalaria se presentaron en órganos hematopoyéticos (22.8%); órganos digestivos (17.5%); y del tejido linfático y afines que incluye sarcoma de Kaposi y linfoma de células T, periférico y cutáneo (9.8%). Mientras los que reportaron menos casos fueron en tumores de ojo y sus anexos (0.6%); mama (0.4%); y los tumores malignos (primarios) de sitios múltiples independientes (0.1%) (INEGI, 2012).

En las mujeres, el cáncer de mama constituye la principal causa de morbilidad hospitalaria (22.0%); seguida de los tumores de los órganos hematopoyéticos (14.1%) y de los órganos genitales femeninos (13.5%). En contraste, las tasas más baja se observan para el cáncer de labio, de la cavidad bucal y de la faringe (1.2%), ojo y sus anexos (0.5%) y los tumores malignos (primarios) de sitios múltiples independientes (0.1%) (INEGI, 2012).

## **2.2. Productos naturales**

El término productos naturales es frecuentemente utilizado de manera indistinta al concepto de metabolitos secundarios, los cuales resultan de gran interés debido a sus efectos biológicos en otros organismos (Hanson, 2003). Existen varios programas para la detección de compuestos bioactivos en múltiples especies, los cuales han permitido el desarrollo de nuevos fármacos, como el taxol, compuesto ampliamente utilizado para el tratamiento de varios tipos de cáncer (Boik, 2001). Los productos naturales muy frecuentemente juegan un

papel en la regulación de las interacciones entre plantas, microorganismos, insectos y animales. Éstos pueden ser sustancias empleadas para defensa, con la finalidad de repeler a los organismos predadores, o para favorecer la reproducción y distribución de la especie por medio de la atracción de insectos polinizadores, también estas moléculas biológicas desempeñan un papel en la comunicación química actuando como hormonas (Morrissey, 2009). Los metabolitos secundarios, parecen no participar directamente en el crecimiento y desarrollo, asociándose más con funciones especiales, como lo puede ser de defensa, y su biosíntesis se halla restringida a fases específicas del desarrollo, tanto del organismo como de las células especializadas, y a períodos de estrés causados por la deficiencia de nutrientes, factores ambientales, o el ataque de microorganismos. El metabolismo secundario se puede definir como la biosíntesis, transformación y degradación de compuestos endógenos mediante proteínas de especialización (Azcón y Talón, 2000).

La utilización de productos naturales con finalidad terapéutica remota a épocas sumamente antiguas y aun en nuestros días continúan siendo importantes, pues el desarrollo de la medicina moderna conllevó al perfeccionamiento de fármacos efectivos sintetizados a partir de precursores obtenidos de plantas medicinales (Lee, 1999). La gran mayoría de los agentes farmacéuticos utilizados en padecimientos tales como el cáncer tienen su origen, de una u otra manera, a partir de fuentes naturales. Actualmente, el interés por los productos naturales en la síntesis de fármacos se ha incrementado. En el año de 1961, nueve

compuestos derivados de plantas fueron aprobados para su utilización como agentes anticancerígenos, siendo vinblastina, vincristina, vinorelbina, etopósido, tenipósido, paclitaxel, docetaxel, topotecan e irinotecan (Lee, 1999). Se estima que más del 40% de los medicamentos actuales tiene su origen en los productos naturales (Hanson, 2003).

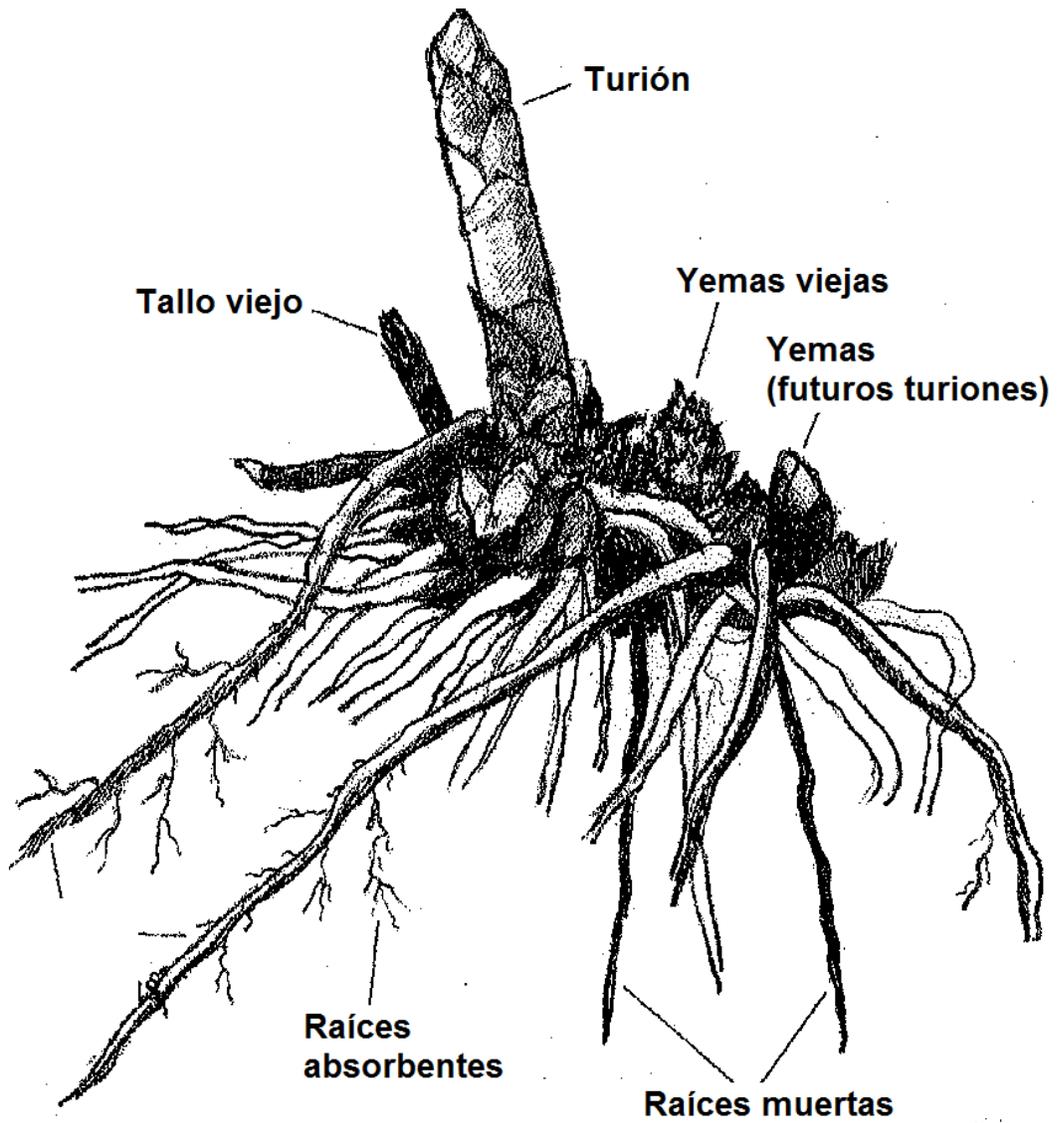
### **2.3. Generalidades de *Asparagus spp.***

El espárrago (*Asparagus officinalis* L.) es una especie herbácea perenne, monocotiledonea, nativa de Europa y Asia. Pertenece a la familia de las Liliaceae junto con otras 150 especies. Dentro el género *Asparagus* existen otras que no son comestibles, pero que son usadas como plantas ornamentales (*A. sprengeri*, *A. plumosus*, *A. laricinus* y *A. racemosus*) (Fuentes Alventosa, 2009). Como cultivo el espárrago se desarrolló en la zona del Mediterráneo y se expandió hacia el noroeste de Europa en la época de los romanos. Se adapta a una gran variedad de ambientes, tales como climas desérticos (norte de México, Perú), mediterráneos (Chile central y California), marinos (sur de Chile, Nueva Zelanda, Inglaterra) y templados fríos (Polonia) por lo cual hoy en día es un cultivo de amplia distribución mundial (Del Pozo 1999). La planta del espárrago posee una parte subterránea, la cual está constituida por un rizoma y el sistema radical, que en conjunto forman lo que se denomina “corona” (**Figura 2**) y una parte aérea compuesta por tallos erectos, ramos y hojas, los cuales constituyen el helecho;

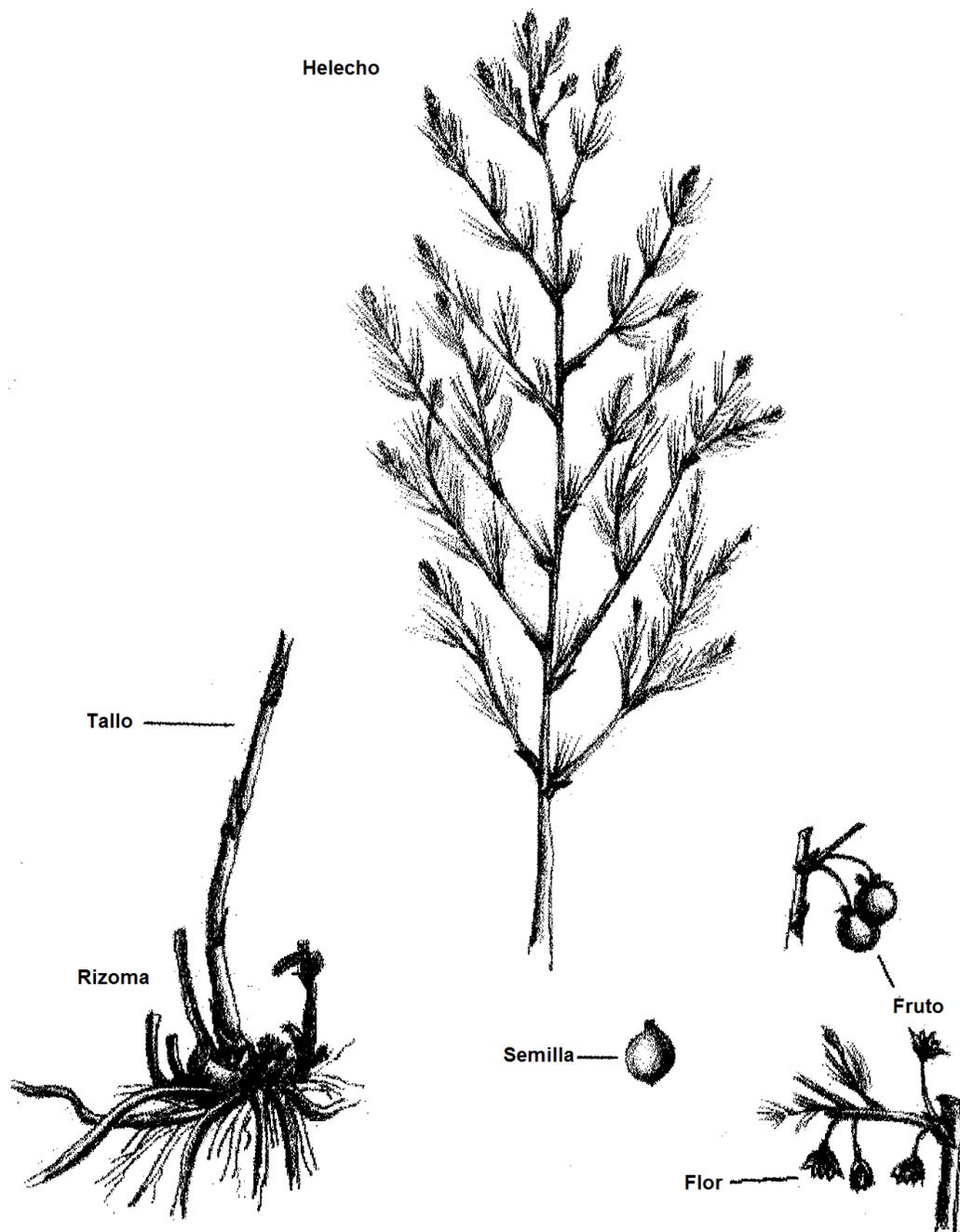
sobre el cual se desarrollan las flores y frutos (**Figura 3**) (Del Pozo 1999; Fuentes Alventosa, 2009).

Los primeros vestigios de espárragos aparecieron en forma de pinturas en los monumentos egipcios hace más de 5,000 años. Eran dibujados atados en manojos con dos o tres ligaduras, los cuales eran utilizados como ofrenda a los dioses. Actualmente, el espárrago es cultivado aproximadamente en 40 países, ocupando México el cuarto lugar en producción. A nivel nacional la producción se concentra en los estados de Baja California Norte, Baja California Sur, Guanajuato y Sonora, destacando este último por su volumen de producción (OEIDRUS, 2009). El municipio de Caborca, es el principal productor de espárrago en Sonora, aportando alrededor del 60% de la producción, y esto debido a que las características edafológicas y el clima desértico de la zona le aportan una calidad especial al producto (Valencia, 2007).

La hortaliza del espárrago se clasifica en dos grupos principales: el espárrago verde y el espárrago blanco. Desde el punto de vista botánico, el espárrago blanco y verde constituye la misma planta. La diferencia entre uno y otro surge de la forma en que ha crecido el brote. Mientras los brotes jóvenes de los espárragos están creciendo dentro de la tierra, son de color blanquecino, pero cuando emergen del suelo y se exponen a la luz, adquieren una coloración verde debido a que la misma activa la función clorofílica.



**Figura 2.** Rizoma y raíces de una planta de espárrago (Del pozo 1999).



**Figura 3.** Tallo y helecho de una planta de espárrago, con flores, frutos y semillas (Del Pozo 1999).

El espárrago blanco, por lo tanto, se recolecta tan pronto como emerge de la tierra, mientras que los verdes se espera a cortarlos cuando alcanzan una altura sobre el suelo de unos 20 cm (Perfetti, 1999). Desde el punto de vista agrícola, el espárrago verde tiene una mejor adaptación a diferentes tipos de suelos y condiciones geográficas. Es más fácil su mecanización por lo que se requieren menores labores de cultivo y costos de producción, existiendo una menor exigencia de mano de obra y una mayor flexibilidad en las fechas de la recolección (Fuentes-Alventosa, 2009). Las características organolépticas y los usos culinarios de cada tipo de espárrago son diferentes. El verde se caracteriza por tener mayor valor nutritivo, textura carnosa y firme, aroma más intenso y sabor ligeramente más dulce, mientras el blanco tiene un mayor contenido en azúcares y más fibra. Ambos tipos de espárragos son cultivados a nivel mundial, aunque tradicionalmente el tipo blanco se ha cultivado en China y Europa, mientras que el tipo verde en México, en el sur de la Península Ibérica, Estados Unidos y Europa.

#### **2.4. Actividades biológicas del espárrago**

El espárrago, además de ser una hortaliza muy apreciada por sus características organolépticas y nutricionales, se puede considerar un alimento de gran calidad funcional ya que contiene diversos fitoquímicos que le confieren una actividad biológica importante (Bast, 2005). Entre estos compuestos destacan los

compuestos de tipo fenólicos (como ácidos hidroxicinámicos y flavonoides), saponinas, esteroides, fructanos y polisacáridos de la pared celular. Estudios farmacológicos (Yu *et al.*, 1996; Kamat *et al.*, 2000; Wiboonpun *et al.*, 2004) han demostrado que extractos de espárrago poseen diversas actividades biológicas, siendo de especial interés la capacidad antioxidante y la actividad antitumoral (Kongkaneramt *et al.*, 2011; Almehdar *et al.*, 2012). Otra actividad biológica de gran importancia reportada en el espárrago es su capacidad de influir sobre el metabolismo de lípidos y ayudar a disminuir los niveles de colesterol en el organismo, esta propiedad ha sido atribuida a la presencia de algunos esteroides y saponinas (García *et al.*, 2011), sin embargo, este tipo de compuestos también han sido reportados con actividad anticancerígena (Shao *et al.*, 1996). En las últimas décadas se han realizado investigaciones que han revelado que las saponinas procedentes de diferentes vegetales disminuyen los niveles de colesterol en plasma, tanto en animales de experimentación como en humanos. Grandes micelas formadas por la interacción de saponinas con los ácidos biliares conllevan al aumento de su excreción, cuando se consumen alimentos ricos en saponinas (Oakenfull, 1986; Oakenfull *et al.*, 1990). Por lo tanto, el metabolismo acelerado del colesterol en el hígado causa una disminución del colesterol en plasma.

#### **2.4.1. Actividad antiproliferativa de *Asparagus spp.* sobre líneas celulares cancerígenas**

Yang Shen y colaboradores (Yang Shen *et al.*, 2011) reportaron la presencia de una saponina, aspachioside, aislada por primera vez de *Asparagus cochinchinensis* la cual mostró importante actividad antiproliferativa en la línea celular carcinógena, A-549 (carcinoma de pulmón humano). Se ha reportado que espárrago (*Asparagus officinalis L.*) cultivado en la región de Arabia Saudita posee actividad antiproliferativa sobre distintas líneas celulares carcinógenas, con valores de IC<sub>50</sub> (concentración inhibitoria a la cual se reduce al 50 % la proliferación celular) bajos (MCF7, HeLa, HepG2: 19.9, 33.0 y 23.0 µg/mL respectivamente) (Almehdar *et al.*, 2012). Asimismo Park y colaboradores en el 2011 reportaron actividad antiproliferativa importante del extracto hidroalcohólico de *Asparagus cochinchinensis* sobre la línea celular HepG2, con un valor de IC<sub>50</sub> de 72.33±0.34 µg/mL (Park *et al.*, 2011).

#### **2.5. Métodos para evaluar viabilidad celular**

La viabilidad celular se define como la identificación de células vivas o muertas en una muestra total. La viabilidad celular se puede identificar cualitativa o cuantitativamente por: 1) cambios morfológicos, 2) cambios en la permeabilidad de la membrana, 3) cambios en la actividad enzimática y/o 4) métodos colorimétricos e inmunoensayos.

Una de las técnicas más utilizadas para evaluar la viabilidad celular son aquellas en las que se utilizan colorantes con propiedades de fluorescentes, los cuales se dividen en ensayos de exclusión y de inclusión. Entre los primeros encontramos los colorantes orgánicos, como el azul tripano, eosina, rojo Congo y eritrosina B, así como el Ioduro de propidio o el bromuro de etidio. Los ensayos de inclusión evalúan la integridad de la membrana celular, siendo los más utilizados el Dicetato de Fluoresceína (FDA) o la calceína. Estos se caracterizan por atravesar la membrana plasmática, se hidrolizan por las esterasas y dan lugar a una fluorescencia dentro de la célula, siempre que ésta se encuentre en estado funcional (Widholm, 1972).

Otra técnica para determinar la viabilidad en suspensiones celulares, es el método conocido como MTT, este es un ensayo colorimétrico cuantitativo que mide la actividad metabólica de las células en fase de proliferación activa. Este método se basa en la capacidad que presenta la succinato deshidrogenasa mitocondrial de las células eucariotas vivas para convertir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) que es de color amarillo y actúa de sustrato, en un producto azul oscuro (formazán), lo cual se traduce en un incremento en los valores de absorbancia de la muestra, cuya cantidad es directamente proporcional al número de células vivas (Mosmann, 1983).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El espárrago representa uno de los principales cultivos de la región de Caborca, Sonora, México; el cultivo de esta hortaliza posee alta rentabilidad debido a que posee alta demanda en el mercado internacional. Adicionalmente, ocasiona gran derrama económica y generación de empleos para la zona durante todo el año, pero principalmente durante la cosecha. Actualmente existen reportes en la literatura acerca de una amplia gama de actividades biológicas que esta hortaliza posee, sin embargo, no hay estudios sistemáticos sobre las actividades biológicas del espárrago que se cultiva en la región de H. Caborca, Sonora. Motivo por el cual es necesario incrementar el conocimiento acerca del espárrago lo cual daría un valor agregado a este producto de tanta importancia económica para la región; ya que este vegetal podría ser fuente potencial para la búsqueda de compuestos químicos bioactivos con posibilidad de aplicaciones como nuevos tratamientos contra el cáncer, los cuales se busca que sean más efectivos y con menos efectos secundarios que los que existen actualmente, impactando de manera positiva en el bienestar de los pacientes así como en la continuidad del tratamiento.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. General

Evaluar la actividad antiproliferativa del extracto metanólico de espárrago (*Asparagus spp.*) frente a las líneas celulares HeLa, A-549 y L-929.

### 4.2. Específicos

- 1) Generar el extracto metanólico de espárrago (*Asparagus spp.*).
- 2) Determinar la actividad antiproliferativa del extracto metanólico de *Asparagus spp.* en líneas celulares cancerígenas de humano HeLa (carcinoma de cérvix) y A-549 (carcinoma de pulmón), así como en la línea celular normal L-929 (tejido conectivo subcutáneo murino).

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Materia prima**

El espárrago utilizado como materia prima en este trabajo fue recolectado por Caballero (Caballero, 2013) en el campo San José (longitud norte 30°40'02", longitud oeste 112°11'52"), el cual está ubicado en la Costa del Estado de Sonora en el tramo carretero Caborca – Desemboque. Dicha recolección se realizó durante la cosecha de febrero de 2013. El vegetal cortado se transportó a temperatura ambiente en bolsas plásticas y congelado en el laboratorio a -20 °C hasta su procesamiento.

### **5.2. Liofilización del espárrago**

La muestra del vegetal fue descongelada a temperatura ambiente. Una vez descongelado el espárrago (2 Kg) fue lavado con abundante agua corriente y posteriormente con agua destilada. El espárrago se dividió en dos partes, parte comestible, EPC (parte verde del vegetal, 1600 g) y parte no comestible, EPNC (parte blanca del vegetal, 400 g). Ambas partes fueron cortadas en pequeños trozos uniformes de aproximadamente 1 cm. Las muestras fueron congeladas a -20 °C en bolsas plásticas de cierre hermético y posteriormente fueron liofilizadas con la finalidad de deshidratarlas. El proceso de liofilización se llevó a cabo durante 10 días continuos a una temperatura de -48 °C y una presión de 0.120 mBar (Caballero, 2013) en un liofilizador LABCONCO freezone 2.5.

### **5.3. Obtención de los extractos metanólicos**

Las muestras liofilizadas (EPC y EPNC) fueron trituradas hasta obtener un polvo, el cual se colocó en un matraz y se le adicionó metanol absoluto en una proporción 1:10 (p:v). La mezcla se mantuvo en agitación constante por un período de 10 días a temperatura ambiente y protegida de la luz. Una vez transcurrido el tiempo se filtró con papel Whatman No.4. El filtrado recuperado se concentró en un rotavapor (Buchi switzerland, modelo R-215) a presión reducida, 130 rpm y a temperatura constante la cual fue aproximadamente de 40 °C. Los extractos metanólicos fueron almacenados en oscuridad a -20 °C hasta su utilización (Hernandez *et al.* 2007).

### **5.4. Líneas celulares**

Para la evaluación de la inhibición de la proliferación celular se utilizaron las líneas celulares cancerígenas, HeLa (carcinoma de cérvix humano), A-549 (carcinoma de pulmón humano), así como en la línea celular normal L-929 (tejido conectivo subcutáneo murino) las cuales fueron adquiridas de ATCC (American Type Collection, Rockville, MD, USA). Los cultivos se mantuvieron en el medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado al 5% con suero fetal bovino (SFB) a una temperatura de 37°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad relativa de 80-90% en una incubadora Isotherm (Fisher Scientific, USA) (Valencia *et al.*, 2012).

## 5.5. Evaluación de la actividad antiproliferativa

Para evaluar el efecto antiproliferativo de los extractos metanólicos del espárrago (EPC y EPCN) sobre las distintas líneas celulares, se utilizó el método estándar de las sales de tetrazolio (MTT) (Mosmann 1983) con ligeras modificaciones (Hernandez *et al.*, 2007). Los ensayos se realizaron utilizando cultivos celulares en fase de crecimiento logarítmico. Se obtuvieron suspensiones celulares de 200,000 células/mL, las cuales fueron incubadas en placas de 96 pozos de fondo plano (Costar, Corning, N.Y. USA) ( $1 \times 10^4$  células por pozo, 50  $\mu$ L) en presencia de diferentes concentraciones de los extractos a evaluar. Los cultivos se incubaron a una temperatura de 37°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad relativa de 80- 90% en una incubadora Isotherm (Fisher Scientific, USA) por 48h. En experimentos preliminares, se estableció que el uso de DMSO en un rango de 0.06 – 2.0% no causa daño en las células. Previamente, los extractos metanólicos de espárrago se disolvieron en DMSO y subsecuentemente se disolvieron en medio de cultivo. En las últimas 4 horas de incubación con los extractos se adicionaron 10  $\mu$ L de MTT (5 mg/mL) para determinar la proliferación celular. El ensayo de MTT es un método colorimétrico que mide la proliferación y viabilidad de un cultivo celular. Se basa en la habilidad de las enzimas mitocondriales deshidrogenasas (reductasas), presente solo en células viables, de unirse a los anillos de la sal de tetrazolio (MTT) de coloración amarilla [bromuro de 3-(4,5-dimetitiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio], para reducirlo a cristales de formazán de color azul-púrpura; dichos cristales son impermeables a la

membrana celular, dando como resultado una acumulación de éstos dentro de las células sanas. La reducción de esta sal sólo se realiza en células vivas y la cantidad de formazán es proporcional al número de células vivas. Los cristales de formazán resultantes se solubilizaron con isopropanol ácido y la absorbancia de la solución colorida se obtuvo a 570 nm – 655 nm en un lector de ELISA (Multiskan EX, ThermoLabSystem).

## **5.6. Análisis estadístico**

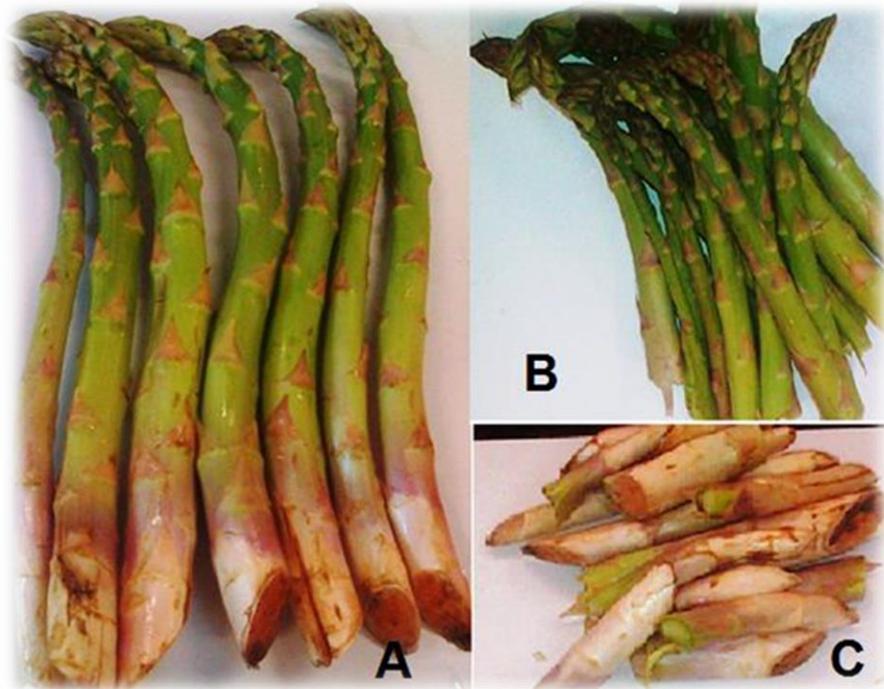
Para análisis de los datos se realizó una estadística descriptiva y comparación de medias.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Rendimiento de la extracción metanólica

Se procesaron 2 Kg de espárrago el cual fue recolectado en el mes de febrero de 2013. El vegetal se dividió en dos partes: la parte verde del turión (espárrago parte comestible, EPC) y la parte blanca (espárrago parte no comestible, EPNC) (**Figura 4**). Posteriormente, se cortaron en trozos pequeños uniformes (de 1 cm aproximadamente). Se obtuvieron 1600 g de EPC y 400 g de EPNC. Ambas partes del espárrago fueron congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se procedió a su liofilización; después de la liofilización se obtuvieron 124.6 g del espárrago parte comestible y 44.7 g de la parte no comestible; lo cual indica un alto contenido de agua en el vegetal, 92.2 % de agua en EPC y 88.8% de agua en EPNC (**Tabla 1**). Estos resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Caballero en el 2013, quien en su trabajo también obtuvo mayor contenido de agua en la parte verde del espárrago (EPC, 93.04%) que en la no comestible del vegetal (EPNC, 90.95%).

La extracción metanólica se llevó a cabo utilizando una proporción 1:10 (p:v). En la **Tabla 2** se muestran los porcentajes de rendimiento para el EPC y EPNC. Se obtuvo mayor rendimiento de extracción en el EPNC que para el EPC, 24.4% y 18.7%, respectivamente. Estos resultados fueron mayores que los obtenidos por Caballero (2013), quien reportó un rendimiento del 2.1% para el extracto



**Figura 4.** A) Espárrago completo. B) Espárrago parte comestible (EPC). C) Espárrago parte no comestible (EPNC).

**Tabla 1.** Rendimiento del proceso de liofilización del espárrago.

<b>Parte del espárrago</b>	<b>Peso del espárrago fresco (g)</b>	<b>Peso del espárrago liofilizado (g)</b>	<b>Contenido de agua (%)</b>
**EPC	1600	124.6	92.2
*EPNC	400	44.7	88.8

\*\*EPC.- Parte comestible del espárrago. \*EPNC.- Parte no comestible del espárrago

**Tabla 2.** Rendimiento de la extracción metanólica.

<b>Parte del espárrago</b>	<b>Peso del espárrago (g)</b>	<b>Extracto metanólico recuperado (g)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
**EPC	124.6	23.3	18.7
*EPNC	44.7	10.9	24.4

\*\*EPC.- Parte comestible del espárrago. \*EPNC.- Parte no comestible del espárrago.

metanólico de la parte comestible del espárrago (EPC) y 0.85 % para el extracto de la parte no comestible del espárrago (EPNC).

## **6.2. Actividad antiproliferativa de los extractos metanólicos del espárrago**

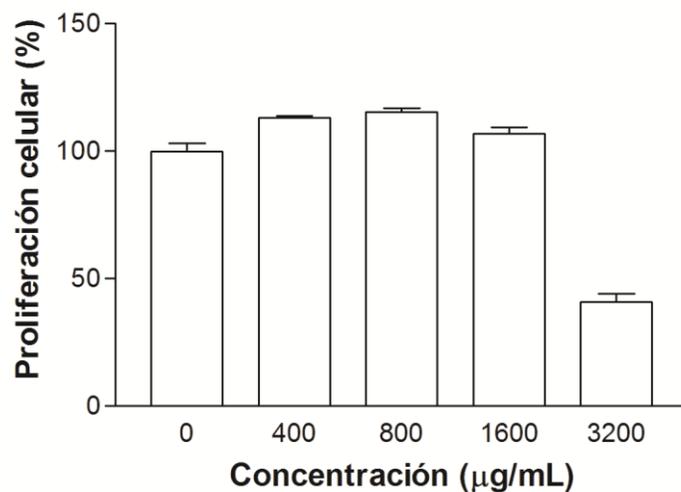
Para evaluar la actividad antiproliferativa de los extractos metanólicos del espárrago (EPC y EPNC), se realizaron ensayos *in vitro* utilizando las líneas celulares cancerígenas: HeLa y A-549, así como la línea celular normal L-929. Las concentraciones evaluadas fueron 400, 800, 1600 y 3200  $\mu\text{g/mL}$ . El extracto metanólico de la parte comestible del espárrago (EPC) mostró mayor actividad antiproliferativa que el extracto metanólico de la parte no comestible (EPNC) sobre las líneas cancerígenas utilizadas (HeLa y A-549), con un valor de  $\text{IC}_{50}$  de  $2563.4 \pm 4.5$  y  $2853.6 \pm 22.8$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Sin embargo, el EPC también ejerció actividad antiproliferativa frente a la línea celular normal utilizada como control, L-929 ( $\text{IC}_{50}$  de  $3002.7 \pm 4.5$   $\mu\text{g/mL}$ ), lo cual no es un efecto deseable, ya que se buscan bioactivos que presenten actividad diferencial preferente hacia células cancerígenas. En el caso del extracto metanólico de la parte no comestible del espárrago (EPNC) se observaron valores de  $\text{IC}_{50}$  mayores a 3200  $\mu\text{g/mL}$  (corresponde la concentración máxima evaluada) frente a todas las líneas celulares utilizadas. En la **Tabla 3** se muestran los valores

**Tabla 3.** Actividad antiproliferativa ( $IC_{50}$ )<sup>a</sup> de los extractos metanólicos de espárrago

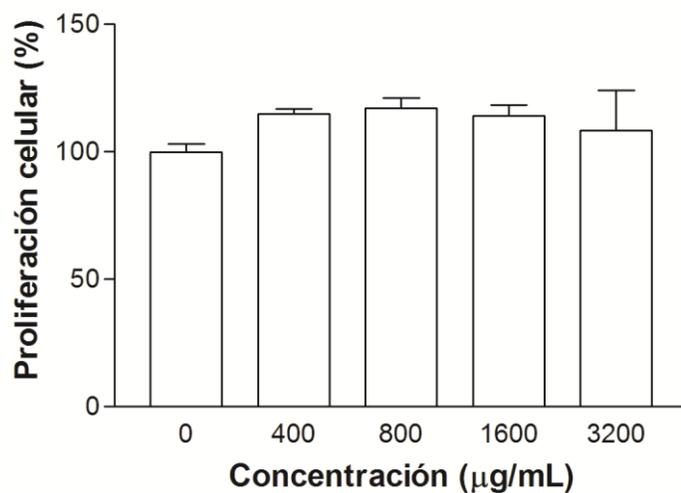
Extracto metanólico	Líneas celulares		
	L-929	HeLa	A-549
Espárrago parte comestible (EPC)	3002.7 ± 4.5	2563.4 ± 27.8	2853.6 ± 22.3
Espárrago parte no comestible (EPNC)	> 3200	> 3200	> 3200

<sup>a</sup>  $IC_{50}$ . Los valores de extractos de espárrago ( $\mu\text{g/mL}$ ) representan la media de por lo menos tres experimentos independientes  $\pm$  la desviación estándar.

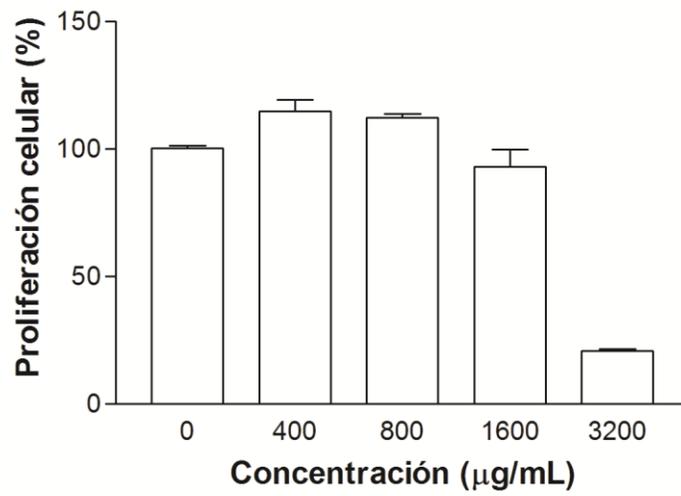
de  $IC_{50}$  para cada uno de los extractos evaluados en las líneas celulares mencionadas. De acuerdo a los criterios del Instituto Nacional del Cáncer de los EUA, en cual considera que un extracto tiene actividad alta si la  $IC_{50}$  es  $\leq 30$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , media si es de 31-60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y baja si es de 61-99  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Moo-Puc, 2009); tanto el EPC como el EPNC se consideran de baja actividad antiproliferativa. En las **Figuras 5A y 5B** se muestra la actividad antiproliferativa de EPC y EPNC, respectivamente, sobre la línea celular normal L-929; asimismo en la **Figura 6A y 6B** la actividad antiproliferativa de EPC y EPNC frente a la línea cancerígena HeLa y en la **Figura 7A y 7B** sobre la línea celular cancerígena A-549. Park y colaboradores en el 2011, reportaron valores menores de  $IC_{50}$  para extracto hidro-alcohólico (etanol 70%) para extracto de *Asparagus conchinchinesis* ( $127.55 \pm 4.50$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sobre la línea celular cancerígena HepG2 (carcinoma de hígado humano), la cual disminuyó (fue más efectivo) al utilizar las fracciones de acetato de etilo y butanol del extracto hidro-alcohólico, las cuales presentaron valores de  $IC_{50}$  de  $75.92 \pm 0.08$  y  $16.09 \pm 0.24$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente (Park *et al.*, 2011).



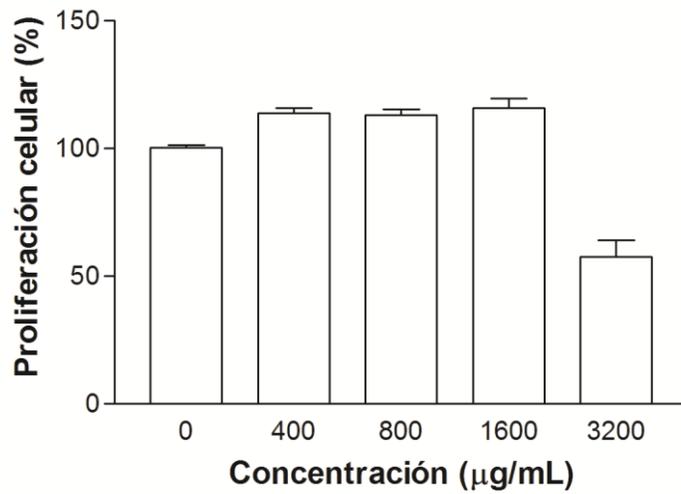
**Figura 5A.** Actividad antiproliferativa del EPC sobre la línea celular normal L-929.



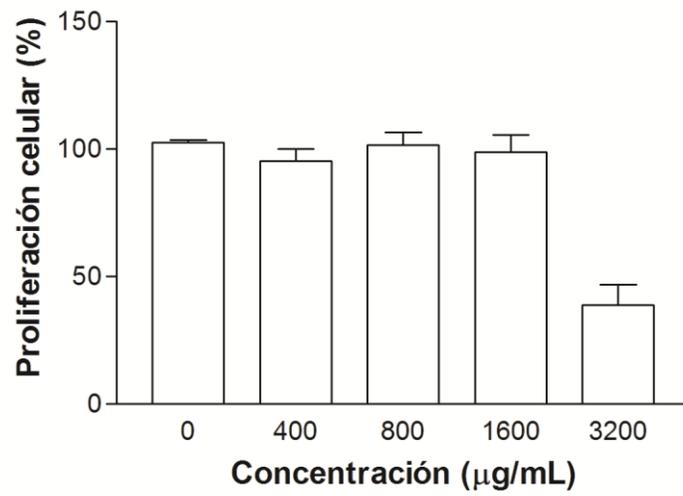
**Figura 5B.** Actividad antiproliferativa del EPNC sobre la línea celular normal L-929.



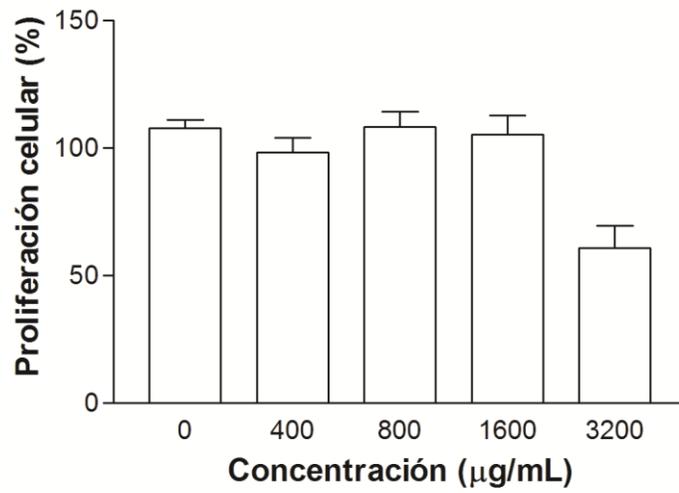
**Figura 6A.** Actividad antiproliferativa del EPC sobre la línea celular HeLa.



**Figura 6B.** Actividad antiproliferativa del EPNC sobre la línea celular HeLa.



**Figura 7A.** Actividad antiproliferativa del EPC sobre la línea celular A-549.



**Figura 7B.** Actividad antiproliferativa del EPNC sobre la línea celular A-549.

## 7. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

- Los extractos metanólicos del espárrago de la región agrícola de la Costa de Caborca, Sonora poseen baja actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares HeLa y A-549.
- El extracto metanólico de la parte comestible del espárrago (EPC) mostró mayor actividad antiproliferativa que el extracto metanólico de la parte no comestible del espárrago (EPNC) sobre las líneas celulares utilizadas.
- El EPC mostró actividad antiproliferativa diferencial entre las líneas celulares cancerígenas (HeLa y A-549) y la línea celular normal (L-929).

## 8. RECOMENDACIONES

- Fraccionar el extracto metanólico del espárrago (EPC) con la intención de mejorar la actividad antiproliferativa de este.
- Realizar la caracterización química del espárrago de la región de Caborca, Sonora con el objetivo de aislar e identificar el o los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa encontrada.
- Evaluar otras actividades biológicas en los extractos metanólicos del espárrago, algunas como hipoglucemiante, antimutagénica, antibacteriana, entre otras.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Almehdar, H., Abdallah, H.M., Osman, A.M., Abdel-Sattar, E.A. 2012. In vitro cytotoxic screening of selected saudi medicinal plants. *Journal of Natural Medicines*. 66, 406-412.

Amaro, M.A., Moreno, R., Sánchez, P.J., Zurera, G. 1999. Nutricional changes in the essential trace elements content of asparagus during industrial processing. *Food Research International*. 32, 479-486.

Anand, P. Kunnumakara, A.B., Sundaram, C. Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S., Sung, B., Aggarwa, B.B. 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research*. 25, 2097-2116.

Azcón-Bieto, J. Talón, M. 2000. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Mc Graw-Hill.

Bagiu, R.V., Vlaicu, B., Butnariu, M. 2012. Chemical composition of in vitro antifungal activity screening of the *Allium Ursinum L. (Liliaceae)*. *International Journal of Molecular Sciences*. 13, 1426-1436.

Bast, A. 2005. Functional food of nutraceuticals. In: *Proceedings of the XI International Asparagus Symposium*. International Society for Horticultural Science. *Acta Horticulturae*.

Boik, J. 2001. Cancer at the cellular level / clinical considerations. Part I and part III in natural compounds in cancer therapy. Promising nontoxic antitumor agents from plants & and other natural sources. *Quality Books*. 1, 251-267.

Caballero-Murrieta, A. 2013. Actividad antioxidante del extracto metanólico de *Asparagus spp.* Tesis licenciatura. Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora.

Cavenee, W.K, White, R.L. 1995. The genetic basis of cancer. *Science American*. 272, 72-79.

Cavia, M., López, A., Hernando, B., López, S., García, C., Coma, M. Muñiz, P. 2007. Estado redox celular y cáncer. Influencia sobre el tratamiento con citostáticos. *Revista Electrónica de Biomedicina*. 2, 45-51.

Debebe Yared, Yalemtehay Mekonneny Asfaw Debella. 2012. In vivo antimalarial activities of fractionated extracts of *Asparagus africanus* in mice infected with *Plasmodium berghei*. *Pharmacologyonline* 3, 88-94.

Del Pozo-Lira., A. El cultivo del espárrago. 1999. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. 6, 9-28.

Domingo, D., López-Brea, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista especializada quimioterapia*. S. E. D. Madrid, Hospital universitario de la princesa. 385-393.

Fuentes-Alventosa J.M. 2009. Caracterización de componentes bioactivos del espárrago verde: obtención de ingredientes funcionales a partir de los subproductos generados durante su transformación industrial. Tesis Doctoral. Servicio De Publicaciones de la Universidad de Córdoba. ISBN-13: 978-84-692-9388-1.

Galluzzi, L., Larochette, N., Zamzami, N., Kroemer, G. 2006. Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy. *Oncogene*. 25, 4812-4830.

García M.D., De la Puerta R., Sáenz M. T., Marquez-Martín A., Fernández-Arche M. A. 2011. Hypocholesterolemic and hepatoprotective effects of "Triguero" *Asparagus* from Andalusia in rats fed a high cholesterol diet. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012, 1-6. doi:10.1155/2012/814752.

Gatti, I., López A., Picardi, L., Cointry, E. 2001. Selección de progenitores en espárrago. *Horticultura Brasileira*. 21,162-165.

Hanson, J. 2003. The classes of natural products and their isolation. Ch 1. In *natural products: The secondary metabolites*. The Royal Society of Chemistry. 1-33. Cambridge, UK.

Hernandez, J., Goycolea, F.M., Quintero, J., Acosta, A., Castaneda, M., Dominguez, Z., Robles, R., Vazquez-Moreno, L., Velázquez, E.F., Astiazaran, H., Lugo, E., Velázquez,

C. 2007. Sonoran propolis: Chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Medica*. 73, 1469-1474.

Herrera, A.G, García, M.G. 2003. Manual de oncología: procedimientos medicoquirúrgicos. Segunda edición. Instituto Nacional de Cancerología (México), McGraw-Hill.

INEGI. 2010. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

INEGI. 2012. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

Kamat J., Bloor K., Devasagayam P.A., Venkatachalam S.R. 2000. Antioxidant properties of *Asparagus racemosus* against damage induced by irradiation in rat liver mitochondria. *Journal. Ethnopharmacol.* 71, 425–435.

Kongkaneramt, L., Witoonsaridsilp, W., Peungvicha, P., Ingkaninan, K., Waranuch, N., Sarisuta, N. 2011. Antioxidant activity of antiapoptotic effect of *asparagus racemosus* root extracts in human lung epithelial H460 cells. *Experimental of Therapeutic Medicine*. 2, 143-148.

Lee, K. 1999. Anticancer drug design based on plant-derived natural products. *Journal of Biomedical Science*. 6, 236-250.

Mitra, S.K., N. Prakash, S. Sundaram, R. 2012. Shatavarins (containing shatavarin IV) with anticancer activity from the roots of *Asparagus Racemosus*. *Indian Journal of Pharmacology*. 44, 732-736.

Moo-Puc, Robledo D, Freile-Pelegrín 2009. *In vitro* cytotoxic and antiproliferative activities of marine macroalgae from Yucatán, Mexico. *Ciencias Marinas*. 35, 1-14

Morrissey, J. 2009. Biological activity of defence-related plant secondary metabolites. Ch. 13. In *Plant-derived Natural Products*, Springer (Ed), 283-299. Cork, Ireland.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cyto-toxicity assays. *Journal of Immunology Methods*. 65, 55-63.

Oakenfull D. 1986. Aggregation of saponins and bile acids in aqueous solution. *Australian Journal of Chemistry*. 39, 1671-1683.

Oakenfull D., Sidhu G.S. 1990. Could saponins be a useful treatment for hypercholesterolemia. *European Journal of Clinical Nutrition*. 44, 79-88.

OIEDRUS, Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable del Estado de Sonora. 2009. Anuario por producto: espárrago. <http://www.oeidrus-sonora.gob.mx>

Pan American Health Organization (PAHO). 2012. <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/NC/pcc-cc-sit-lac.htm>

Park, M., Cheon, M.S., Kim, S.H., Chun, J.M., Lee, A.Y., Moon, B.C., Yoon, T., Kil Choo, B.K., Kim, H.K. 2011. Anticancer activity of *Asparagus cochinchinensis* extract and fractions in HepG2 cells. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 54, 188-193.

Pérez, R., Ávila, A., Edgill, R., Colon, Y., Quesada, W., Bello, J., Panfet, C. 2005. Actividad antitumoral de una mezcla de polisacáridos obtenida de la especie *Argemone mexicana*. L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 10, 3-4.

Perfetti del Corral J.J. 1999. Espárrago producción y comercio. *Inteligencia de Mercados*. 11, 1-7. ISSN 0124-1338.

Rupesh-Kumar, M, Fasalu-Rahiman, O.M, Tamizh-Mani, T., Mohamed-Iyas, K., Satya-Kumar, B., Phaneendra, P., Surendra, B. 2011. Evaluation of hepatoprotective activity of *Asparagus Racemosus* root against paracetamol induced acute liver injury rats. *Pharmacologyonline*. 1, 1059-1066.

Sautour, M.,T. Miyamoto, M.-A., Lacaille-Dubois, M.A. 2007. Steroidal Saponins from *Asparagus Acutifolius*. *Phytochemistry*. 68, 2554-2562.

- Senra, A. 2002. El cáncer: Epidemiología, etiología, diagnóstico y prevención. Madrid, España. Elsevier Science. 7.
- Shao, Y., Chin, C.K., Ho, C.T., Ma, W., Garrison, S.A., Huang, M.T. 1996. Anti-tumor activity of the crude saponins obtained from *Asparagus*. *Cancer Letters*. 104, 31-36.
- Somani, R., Singhai, A., Kumar S., Prashant J., Dilpesh. 2012. *Asparagus racemosus* Willd (*Liliaceae*) ameliorates early diabetic nephropathy in STZ induced diabetic rats. *Indian Journal of Experimental Biology*. 50, 469-475.
- Valencia-Mungaray, J.M. 2007. El Espárrago de Caborca: vida, ingreso, trabajo y fama mundial. *SonoraEs*. 37, 6-9.
- Valencia, R., Alday E., R. Robles-Zepeda, A. Garibay-Escobar, J.C. Gálvez-Ruiz, M. Salas-Reyes, M. Jiménez-Estrada, D. Velázquez-Contreras, E., Hernández, J. Velázquez, C. 2012. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of sonoran propolis. *Food Chemistry*. 131, 645-651.
- Wang, H.X., Ng, T.B. 2001. Isolation of a novel deoxyribonuclease with antifungal activity from *Asparagus Officinalis* seeds. *Biochemical of Biophysical Research Communications*. 289, 120-124.
- Wiboonpun, P., Phuwapraisirisan, P., Tip-pyang, S. 2004. Identification of antioxidant compound from *Asparagus racemosus*. *Phytotherapy Research*. 18, 771-773.
- Widholm, J.M. 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranin for determining viability of cultured plant cell. *Stain Technology*. 47, 189-194.
- WHO (World Health Organization). 2013. Cancer Control Programme Department of Chronic Diseases and Health Promotion (CHP). <http://www.who.int/cancer/en/>
- Yang Shen, Cong-Li Xu, Wei-Dong Xuan, Hui-Liang Li, Run-Hui Liu, Xi-Ke Xu, Hai-Sheng Chen. 2011. A new furostanol saponin from *Asparagus cochinchinensis*. *Archives of Pharmacal Research*. 34, 1587-1591.

Yu, S., Chee-Kok, C., Chi-Tang, H., Wei, M., Garrison, S.A. Ho, C. Huang, M.-T. 1996. Anti-tumor activity of the crude saponins obtained from *Asparagus*. *Cancer Letters*. 104, 31-36.

## 10. APÉNDICES

### Apéndice A.

#### **Método de reducción de MTT**

Este método se fundamenta en la reducción de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT). Este es un colorante amarillo pálido, soluble en agua, el cual es reducido tempranamente en células viables, por componentes de la cadena respiratoria, a formazán (cristales azul violeta, insolubles en agua), fundamentalmente por la respiración (deshidrogenasas mitocondriales); la reducción de esta sal sólo se realiza en células vivas y la cantidad de formazán es proporcional al número de células vivas.

#### **Preparación de la solución de MTT de 5 mg/mL**

##### **Reactivos**

- MTT (Sigma – Aldrich)
- PBS 1X estéril

##### **Equipo**

- Campana de flujo laminar (purifier class II Biosafety cabinet, LABCONCO).
- Balanza analítica.
- Jeringa (estéril).
- Filtros de 0.22um (Millipore GSWPO2500).
- Vortex.

**Procedimiento:**

- 1) Pesar 5 mg de MTT por cada mililitro de solución que se desee preparar en un tubo cónico (Falcon).
- 2) Con una pipeta estéril, adicionar PBS 1X (1 mL por cada 5 mg de MTT) y agitar vigorosamente en vortex.
- 3) Esterilizar la solución por filtración con ayuda de una jeringa estéril y un filtro Millipore de 0.22  $\mu\text{m}$ .
- 4) Almacenar en un tubo cónico estéril, protegido de la luz a -20 °C hasta su uso.

## **Apéndice B.**

### **Preparación del medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (D-MEM)**

El medio de cultivo celular constituye un elemento fundamental para el cultivo “*in vitro*” de células, tejidos, desarrollo de embriones, etc. Los medios de cultivo tienen una serie de componentes generales y específicos cuya presencia y concentraciones estará en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización. El medio de cultivo D-MEM se utiliza para cultivos de todo tipo de líneas celulares, este medio de cultivo se suplementa con suero fetal bovino al 5% o al 10% según sea la aplicación.

### **Preparación para 1 L de medio de cultivo**

#### **Reactivos**

- D-MEM 13.37 g
- L- Arginina 0.116 g
- L-Asparagina 0.036 g
- Bicarbonato de Sodio 2 g
- HEPES 2.38 g

\*Nota ajustar pH en el rango de 7.2 - 7.4

- Piruvato de sodio 10 mL
- L-Glutamina 7.5 mL
- Penicilina 10 mL
- Suero fetal bovino al 5% (50 mL)

En 1000 mL de agua destilada adicionar todos los reactivos antes mencionados y agitar en un vaso de precipitado hasta que se disuelvan completamente. Posteriormente ajustar el pH en un rango de 7.2 - 7.4 (debe utilizarse NaOH 1N o HCl 1 N).

Una vez ajustado en pH se esteriliza por filtración dentro de una campana de flujo laminar. Se almacena en un frasco estéril a 4 °C hasta su uso.

## **Apéndice C.**

### **Preparación de PBS 10X**

#### **Reactivos**

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.19 g)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1.2 g)
- $\text{NaCl}$  (8.5 g)

#### **Equipo**

Campana de flujo laminar

Balanza analítica digital

Bomba de vacío

Sistema de filtración (sterile aseptic system, millipore corporation)

Espátula

Para preparar 1 L de solución pesar las cantidades de los reactivos indicadas anteriormente y verterlos en una vaso de precipitado que contenga 800 mL de agua destilada, agitar un poco asegurando que quede bien disuelto. Después se aforar con agua destilada hasta 1 L.

