

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Determinación de cardenólidos y actividad antiproliferativa de *Asclepias subulata* (Decne 1844) cultivada bajo estrés hídrico, para el desarrollo de un potencial fitofármaco



TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

Héctor Guillermo Bustamante Armenta

Hermosillo, Sonora

Noviembre de 2018

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

Esta tesis se realizó en el Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de Sonora, bajo la dirección del Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda. Los recursos fueron obtenidos parcialmente del proyecto 83642 apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a mi familia, que siempre han estado ahí para mí en buenos y malos momentos, en especial a mi mamá, papá, mis hermanas (Ambar y Lisset), tía maye, manina y mis sobrinos (Dante y Luna).

" Dulces son los frutos de la adversidad que, semejante al feo y venenoso sapo, lleva en la cabeza una preciosa joya''. **William Shakespeare**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Sonora mi alma mater, al Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, al Departamento de Agricultura y Ganadería y al Departamento de Investigaciones Científicas y tecnológicas.

Agradezco a CONACYT por otorgarme una beca para realizar esta tesis.

Agradezco a mi director de tesis, Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda, quien siempre me tuvo mucha fe y me brindó dirección.

A mis sinodales, Dra. Luisa Rascón Valenzuela, Dr. Julio César Rodríguez y Dr. Jesús López Elías, por ayudarme a realizar esta tesis y por todos sus consejos.

Gracias a los maestros que contribuyeron en mi formación académica, Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras, Dr. Luis Ángel Medina Juárez, M.C. Claudia Celeste Molina Domínguez, M.C. Martha Judith Valdez Ortega y Dr. Jesús Efraín Alday Noriega.

A mis compañeros de laboratorio: Shava, Thania, Lulú Víctor, Raúl, Alex, Mariana, Francisco, Samaria, Selene, Iván, Fabiola, Machuy, Viviana e Ivonne, los cuales siempre me brindaron su apoyo.

A mis amigos Ricardo, Gilberto, Brisa, Sarahi, Teresita, Leonardo, Luis Mario y topo en verdad han sido y son de mucho apoyo, en especial agradezco sus chistes-payasadas-carrillas que alegran la vida.

CONTENIDO

FORMA DE APROBACIÓN	ii
DEDICATORIAS.....	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTAS DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	xi
OBJETIVOS	xii
Objetivo general	xii
Objetivos específicos.....	xii
RESUMEN.....	xiii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	3
Cáncer un Problema de Salud Publica	3
Plantas Medicinales para Tratar el Cáncer.....	3
<i>Asclepias subulata</i> una Planta Medicinal Contra el Cáncer.....	4
Composición química y actividad biológica de <i>Asclepias subulata</i>	6
Metabolitos secundarios	8
Estrés en la producción de metabolitos secundarios	9
Fitofármacos.....	11
Potenciales Fitofármacos.....	11
Establecimiento de un cultivo.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Químicos	15
Colecta y germinación de las semillas de <i>Asclepias subulata</i>	15
Cultivo y condiciones de <i>Asclepias subulata</i>	16

Cálculo de la biomasa	18
Preparación de las muestras de <i>Asclepias subulata</i>	18
Preparación del extracto etanólico crudo de <i>Asclepias subulata</i>	18
Cromatografía de Líquida de Alta Resolución (HPLC)	19
Líneas celulares	19
Evaluación de la actividad antiproliferativa	20
Análisis estadístico	21
RESULTADOS Y DISCUSIONES	22
Germinación, trasplante y cultivo de <i>Asclepias subulata</i>	22
Determinación mensual de biomasa aérea de <i>Asclepias subulata</i> cultivada bajo estrés hídrico	27
Actividad antiproliferativa de extractos etanólicos de <i>Asclepias subulata</i>	33
Cuantificación de cardenólidos de extractos etanólicos de <i>Asclepias subulata</i>	39
Correlación entre biomasa, cardenólidos y actividad antiproliferativa	48
CONCLUSIONES	59
ACTIVIDADES ACADÉMICAS DERIVADAS DEL ESTE TRABAJO.....	59
BIBLIOGRAFÍA	60
APENDICES	65

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. A) <i>Asclepias subulata</i> , arbusto de 30 cm de alto, en periodo de floración B) Flores de <i>A. subulata</i> , C) Fruto de <i>A. subulata</i> . Fuente de A y B: http://swbiodiversity.org/seinet/taxa/index.php?taxon=3798 Fuente de C: https://es.wikipedia.org/wiki/Asclepias_subulata	5
Figura 2. Glucósidos Cardenólidos aislados de extractos hidroalcohólicos de <i>Asclepias subulata</i> (Rascon y col., 2016b).	7
Figura 3. Diseño experimental de un cultivo de <i>Asclepias subulata</i> cultivado en primavera.	17
Figura 4. Diseño experimental de un cultivo de <i>Asclepias subulata</i> cultivado en otoño.	17
Figura 5. Plantas en etapa de floración de <i>Asclepias subulata</i> trasplantada en otoño, a los 6 meses de ser trasplantada.	26
Figura 6. Plantas de <i>Asclepias subulata</i> trasplantada en otoño, a los 18 meses de ser trasplantada, a la izquierda podemos observar los tratamientos de riego y a la izquierda los de déficit hídrico.	26
Figura 7. Evaluación mensual de biomasa aérea en <i>Asclepias subulata</i> cultivada en otoño. En el eje de la Y se muestra los gramos por planta seca y en el eje X los meses.	29
Figura 8. Evaluación mensual de biomasa aérea en <i>Asclepias subulata</i> trasplantada en primavera. En el eje de la Y se muestra los gramos por planta seca y en el eje X los meses.	31
Figura 9. Espectro de HPLC de tratamiento de un extracto etanólico proveniente de déficit hídrico de <i>Asclepias subulata</i> trasplantada en otoño, señalando los tiempos de retención (RT) de corotoxigenina y calotropina a $\lambda = 220$ nm.	40
Figura 10. Correlación de calotropina y corotoxigenina de extractos etanólicos de <i>Asclepias subulata</i> trasplantada en primavera.	44
Figura 11. Correlación de calotropina y corotoxigenina de extractos etanólicos de <i>Asclepias subulata</i> trasplantada en otoño.	47
Figura 12. Correlación de corotoxigenina y biomasa de extractos etanólicos de <i>Asclepias subulata</i> trasplantada en otoño.	49

Figura 13. Correlación de calotropina y biomasa de extractos etanólicos de <i>Asclepias subulata</i> trasplantada en otoño.	50
Figura 14. Correlación de actividad antiproliferativa y corotoxigenina de extractos etanólicos de <i>Asclepias subulata</i> trasplantada en otoño.	51
Figura 15. Correlación de actividad antiproliferativa y calotropina de extractos etanólicos de <i>Asclepias subulata</i> trasplantada en otoño.	52
Figura 16. Correlación de corotoxigenina y biomasa de extractos etanólicos de <i>Asclepias subulata</i> trasplantada en primavera.....	53
Figura 17. Correlación de calotropina y biomasa de extractos etanólicos de <i>Asclepias subulata</i> trasplantada en primavera.....	54
Figura 18. Correlación de actividad antiproliferativa y corotoxigenina de extractos etanólicos de <i>Asclepias subulata</i> trasplantada en primavera.	55
Figura 19. Correlación de actividad antiproliferativa y calotropina de extractos etanólicos de <i>Asclepias subulata</i> trasplantada en primavera.	56

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Medias de emergencia, tiempo de germinación e índice de velocidad de germinación de semillas de <i>Asclepias subulata</i> en condiciones de sombra utilizando ácido giberélico.	25
Tabla II. Determinación de biomasa de <i>Asclepias subulata</i> trasplantada en otoño bajo estrés hídrico.	30
Tabla III. Determinación de biomasa de <i>Asclepias subulata</i> trasplantada en primavera bajo estrés hídrico.	32
Tabla IV. Evaluación de actividad antiproliferativa en A549 de extractos etanólicos de <i>Asclepias subulata</i> trasplantada en otoño bajo estrés hídrico. ...	35
Tabla V. Evaluación de actividad antiproliferativa en A549 de extractos etanólicos de <i>Asclepias subulata</i> trasplantada en primavera bajo estrés hídrico.	36
Tabla VI. Promedios de IC ₅₀ µM de los tratamientos en diferentes líneas celulares.	38
Tabla VII. Cuantificación Corotoxigenina 3-O-glucopiranososa de extractos etanólicos de <i>Asclepias subulata</i> trasplantada en otoño bajo estrés hídrico. ...	41
Tabla VIII. Cuantificación Calotropina de extractos etanólicos de <i>Asclepias subulata</i> trasplantada en otoño bajo estrés hídrico.	42
Tabla IX. Cuantificación Corotoxigenina 3-O-glucopiranososa de extractos etanólicos de <i>Asclepias subulata</i> trasplantada en primavera bajo estrés hídrico.	45
Tabla X. Cuantificación Calotropina de extractos etanólicos de <i>Asclepias subulata</i> trasplantada en primavera bajo estrés hídrico.	46

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la concentración de cardenólidos y actividad antiproliferativa en extractos etanólicos de *Asclepias subulata* cultivada bajo estrés hídrico, para el desarrollo de un potencial fitofármaco.

Objetivos Específicos

1. Establecer las condiciones de cultivo para la domesticación de *Asclepias subulata*.
2. Evaluar el estrés hídrico y biomasa de *A. subulata*, en dos fechas de trasplante y sometida a diferentes condiciones de cultivo, por un año.
3. Determinar la concentración de los principales cardenólidos de *A. subulata*, cultivada en dos temporadas y sometida a diferentes condiciones de cultivo, por un año.
4. Comparar la relación entre biomasa y cardenólidos de *A. subulata*, sometidas a diferentes condiciones de cultivo.
5. Evaluar la actividad antiproliferativa de extractos etanólicos, provenientes de *A. subulata*, cultivada en dos fechas de trasplante y sometida a diferentes condiciones de cultivo, por un año, en las líneas celulares A549 y ARPE-19.

RESUMEN

Actualmente, el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, esta enfermedad es comúnmente tratada con terapias no específicas, una alternativa es el uso de fitofármacos. *Asclepias subulata* (AS) es una planta medicinal, cuyos extractos reportan una alta actividad antiproliferativa y selectividad sobre líneas celulares cancerígenas humanas. Como parte del desarrollo de un potencial fitofármaco es necesario establecer las condiciones de cultivo comercial de la planta. El objetivo del presente trabajo fue determinar el perfil de cardenólidos y actividad antiproliferativa de extractos etanólicos de AS, cultivada bajo estrés hídrico. Para ello, AS se germinó en casa sombra, después se trasplantó a campo en dos temporadas (primavera y otoño), en diferentes condiciones: (con déficit hídrico (DH), déficit hídrico con gel (DG), déficit hídrico doble hilera (DDH), riego (R), riego con gel (RG) y riego doble hilera (RDH)). Mensualmente, por un año, por cada tratamiento, se evaluó biomasa y actividad antiproliferativa mediante (MTT) y concentración de los cardenólidos corotoxigenina 3-O-glucopiranososa y calotropina mediante (HPLC). Los resultados para el cultivo trasplantado en otoño fueron: Biomasa para DH 91.3 ± 36 , DG 101.3 ± 15.2 , R 464.9 ± 90.3 y RG 575.9 ± 118.5 g/planta respectivamente. Mientras en el cultivo de primavera: Biomasa para DH 75.5 ± 22 , DG 68.2 ± 15.7 , DDH 77.6 ± 42.1 R 476.4 ± 112.9 , RG 441.2 ± 169.2 y RDH 430.2 ± 136.2 g/planta respectivamente. Los extractos etanólicos de AS en ambas fechas de siembra mostraron una fuerte actividad antiproliferativa en la línea celular A549 con $IC_{50} < 2 \mu\text{g/mL}$. Por otro lado, en ARPE-19, $IC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$. En general, la concentración de cardenólidos fue mayor en los tratamientos de déficit hídrico (superior a $100 \mu\text{g/mL}$ en los extractos etanólicos), la actividad antiproliferativa también fue mayor en estos tratamientos. Con los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye que AS puede ser cultivada en ambas estaciones del año, manteniendo una importante producción de los principios activos. Este

trabajo representa un avance importante en los estudios para el potencial desarrollo de un fitofármaco.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, el cáncer es la principal causa de mortalidad en países desarrollados y tiene el segundo lugar en los países en desarrollo. El cáncer es un proceso multifactorial que resulta de una sucesión de cambios genéticos en los cuales una célula normal es transformada en una maligna. Actualmente el cáncer es tratado con radioterapia y quimioterapia. El problema de estas terapias, son los efectos secundarios causados por tratamientos no específicos, por lo cual es de suma importancia desarrollar tratamientos opcionales con mejor selectividad hacia las células cancerígenas (WHO, 2016)

Una alternativa adicional para tratar el cáncer es el uso de fármacos de especies vegetales como *Cephalotaxus harringtonia*, *Camptotheca acuminata*, *Taxus brevifolia*, entre otros. Estos productos son obtenidos por procesos tecnológicamente adecuados, empleando exclusivamente materias primas vegetales, con finalidad profiláctica, curativa, paliativa o para fines de diagnóstico (Preuss y Bagchi, 2004; Wetzler y Segal, 2011).

Asclepias subulata es una planta medicinal mexicana que tiene potencial para el desarrollo de un fitofármaco. Rascón y col. (2015), demostraron que los extractos hidroalcohólicos de la planta tienen potente actividad antiproliferativa y selectividad sobre líneas celulares cancerosas humanas. Identificando como responsables de esta actividad biológica a compuestos cardenólidos, los cuales son identificables y cuantificables (Rascon y col., 2016a).

Agrawal y col. (2014) encontraron un incremento de estos metabolitos secundarios en *Asclepias syriaca*, cuando la planta cultivada era sometida a un estrés hídrico, los cardenólidos aumentaban con respecto a la planta control (Agrawal y col., 2014a). El establecimiento de un cultivo de una planta silvestre, como *A. subulata*, es necesaria para establecer escenarios donde se produzcan extractos con mayor actividad deseada. En teoría si *A. subulata* es domesticada

en un cultivo comercial podría variar su concentración de cardenólidos y cambiar su actividad biológica.

Por lo anterior mencionado, en este trabajo se propone determinar la concentración de cardenólidos con actividad antiproliferativa en extractos provenientes de *A. subulata* sometida a diferentes condiciones de estrés hídrico, con la finalidad de establecer estudios para el desarrollo de un posible fitofármaco.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Cáncer un Problema de Salud Publica

Actualmente, el cáncer va en aumento, debido al crecimiento y envejecimiento de la población, de igual manera, por malos hábitos como fumar, sobrepeso, poca actividad física, entre otros. Según GLOBOCAN, (Global Cancer Statistics), ocurrieron 14.1 millones de nuevos casos de cáncer y 8.2 millones de muertes en 2012 alrededor del mundo. El cáncer de pulmón encabeza las muertes de hombres en países poco desarrollados, por otro lado, el cáncer de mama presenta mayores cifras en mujeres (Torre y col., 2015).

El cáncer es causado por la transformación de células normales en células tumorales en un proceso en varias etapas que suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y agentes externos (WHO, 2015). Esta enfermedad es un serio problema de salud tanto en países desarrollados como subdesarrollados. El limitado éxito de las terapias clínicas incluyen el uso de radiación, quimioterapias y cirugía, por lo cual se necesitan estrategias alternativas en el manejo de esta enfermedad (Tagne y col., 2014). Actualmente se recurre a los agentes quimioterapéuticos para tratar el cáncer, dichos agentes ejercen su efecto eliminando células que están en continua división, estos agentes por lo tanto no son específicos para células tumorales y causan efectos citotóxicos eliminando células normales que se encuentran en división, como células foliculares del cabello, y mucosa gastrointestinal (Bayala y col., 2014).

Plantas Medicinales para Tratar el Cáncer

La popularidad de las medicinas herbales como suplementos naturales, particularmente para la cura y prevención del cáncer, ha ganado atención desde

los inicios del siglo XX. La concepción y desarrollo del cáncer es un proceso lento que pasa por varios años y etapas. A pesar de la complejidad de la progresión del cáncer, hay muchas oportunidades para intervenir en estas etapas de desarrollo. Afortunadamente, la naturaleza nos provee con una gran variedad de metabolitos benéficos en la forma de dieta y suplementos herbales, los cuales pueden interactuar en una o más etapas en la progresión del cáncer. Estos compuestos benéficos incluyen vitaminas, ácidos grasos esenciales, aminoácidos, y una gran variedad de nutrientes no esenciales llamados fitoquímicos (Nobili y col., 2009; Preuss y Bagchi, 2004).

De acuerdo con las guías de la Sociedad Americana del Cáncer y del Instituto Nacional del Cáncer, comer ciertos tipos de frutas y vegetales provee la primera línea de defensa en la prevención de la enfermedad. Algunos de esos fitoquímicos, como flavonoides, terpenos y polifenoles, protegen contra la oxidación celular y factores que derivan en cáncer. En general las plantas son fuente potencial de invención y desarrollo de nuevos fármacos quimio-protectores contra el cáncer, la mayoría de los tratamientos contra el cáncer han mejorado con el uso de metabolitos de plantas (Bayala y col., 2014; Nobili y col., 2009).

***Asclepias subulata* una Planta Medicinal Contra el Cáncer**

En México, hay 68 especies de *Asclepias* y 14 de ellas son usadas como plantas medicinales. *Asclepias subulata* Decne (1844) (Figura 1), es un arbusto que crece en el este de Arizona, en el sureste de los Estados Unidos de América, en México en el norte de Baja California y noroeste de Sonora. Es un arbusto que se erige como un racimo de tallos desnudos verde grisáceos, ya que pierde sus hojas a inicio de temporada; en la punta del tallo se encuentra la flor de color blanco amarillento, la cual consta de una corola reflexa con una serie de 5 columnas que terminan en forma de gancho; su fruto es un folículo glabro (Peinado y col., 1995). En Sonora, México, diferentes partes de *A. subulata* son



Figura 1. A) *Asclepias subulata*, arbusto de 30 cm de alto, en periodo de floración
B) Flores de *A. subulata*, C) Fruto de *A. subulata*. Fuente de A y B:
<http://swbiodiversity.org/seinet/taxa/index.php?taxon=3798> Fuente de
C: https://es.wikipedia.org/wiki/Asclepias_subulata

usadas por varios grupos étnicos (series y pimas) para tratar diferentes enfermedades, como desordenes gastrointestinales, cáncer, enfermedades oculares, entre otras (Estudillo y García, 1988; Fernández y col., 2008).

Composición Química y Actividad Biológica de *Asclepias subulata*

Rascón y col. (2015) realizaron una validación científica del uso medicinal de *A. subulata* mediante la evaluación *in vitro* de la actividad antiproliferativa de extractos, donde obtuvieron un extracto con metanol, del cual se realizaron fracciones con diferentes solventes (hexano, acetato de etilo y etanol). El extracto de metanol y las fracciones polares fueron las que obtuvieron una mayor respuesta antiproliferativa en diferentes líneas celulares humanas cancerígenas, incluyendo A549 (aveolar adenocarcinoma humano), PC-3 (prostático adenocarcinoma humano), HeLa (carcinoma de cérvix humano) y LS 180 (colorectal adenocarcinoma humano), con valores de IC₅₀ en el rango de 0.31-18 µg/mL. Cabe destacar que el extracto de metanol y sus fracciones mostraron selectividad hacia las células cancerígenas humanas sobre la línea celular normal, ARPE-19 (célula epitelial pigmentada retinal humana), con IC₅₀ ≥30 µg/mL (Rascon y col., 2015).

En los extractos se identificaron compuestos cardenólidos, los cuales son moléculas orgánicas caracterizadas por un núcleo esteroideo que cuenta con un grupo hidroxilo en la posición C14 y un anillo lactónico insaturado de cinco miembros en la posición C17. Después se purificaron y se aislaron cuatro cardenólidos (Figura 2) mayormente responsables de la actividad antiproliferativa: 12,16-Dihidroxicatropina, Calotropina, Corotoxigenina 3-O-glicopiranosido y Desglucouzarina. Todos estos compuestos mostraron una fuerte actividad antiproliferativa en líneas celulares cancerígenas humanas. Calotropina fue el compuesto con mayor actividad, con IC₅₀ de 0.013, 0.06 y 0.41 µM en las líneas celulares A549, LS 180 y PC-3; mientras que 12, 16-dihidroxicatropina mostró valores de 2.48, 5.62 y 11.7 µM, en las mismas

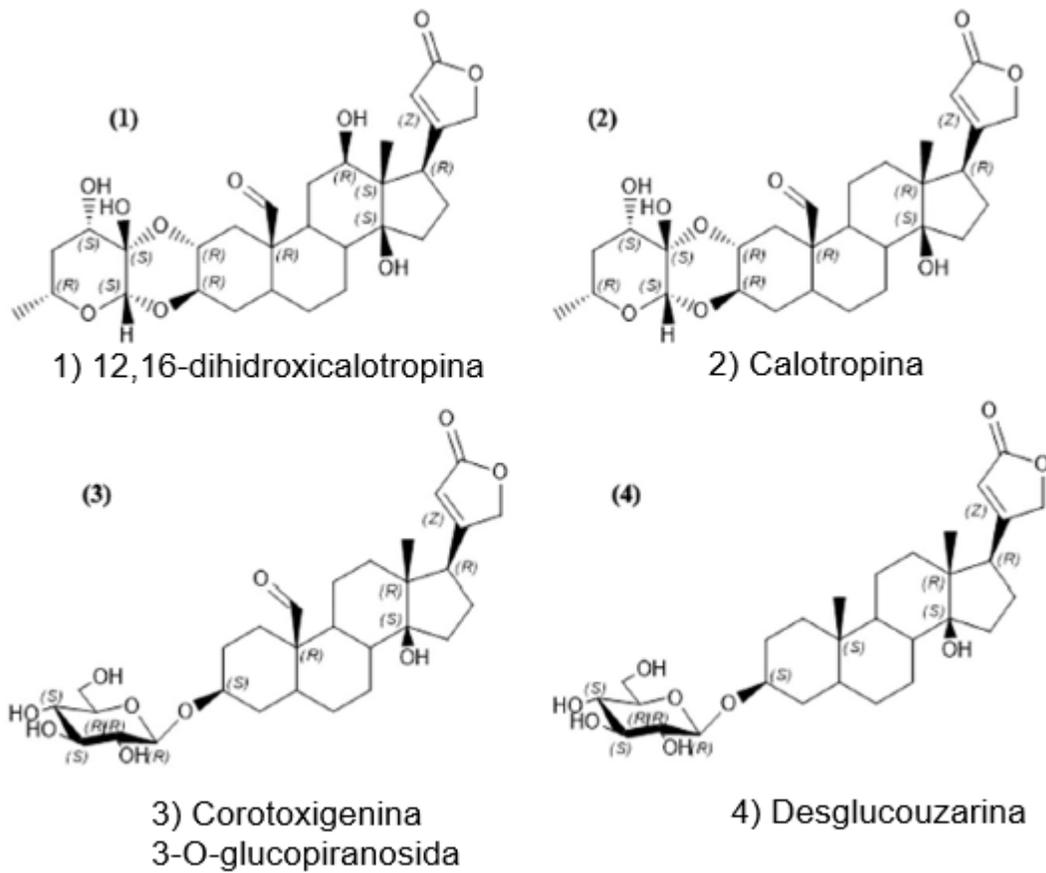


Figura 2. Glucósidos Cardenólidos aislados de extractos hidroalcohólicos de *Asclepias subulata* (Rascon y col., 2016b).

líneas celulares, en cuanto a corotoxigenina 3-O-glucopiranosido tuvo IC₅₀ de 2.64, 3.15 y 6.62 μM; y desglucouzarina mostró valores de 0.90, 6.57 y 6.62 μM. El control positivo, doxorubicina mostró IC₅₀ de 1.78, 6.99 y 3.18 μM. De estos estudios se destaca una mayor actividad antiproliferativa de estos cardenólidos que doxorubicina, una droga muy usada en quimioterapias (Rascon y col., 2016b).

Los cardenólidos mencionados pueden ser usados en un futuro para tratamientos contra el cáncer, el problema es que su síntesis es complicada debido a su complejidad química y el proceso de purificación de los cardenólidos de *A. subulata* silvestre tiene un bajo rendimiento, menor al 1% del peso en seco de la planta; por otro lado, el extracto etanólico muestra una potente actividad antiproliferativa y tiene un rendimiento del 13%. Por lo antes mencionado, una opción viable para el aprovechamiento de estas moléculas, es el establecimiento de un cultivo comercial de *A. subulata*, para el eventual desarrollo de un fitofármaco (Rascon y col., 2016b).

Metabolitos Secundarios

Los metabolitos secundarios son aquellos componentes que no tienen un rol fundamental en el mantenimiento de los procesos vitales de las plantas, sin embargo, son importantes para la interacción de la planta con su ambiente, además de su adaptación y defensa (alcaloides, terpenos, polifenoles, etc.). Estos juegan un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de las plantas. En plantas superiores, existe una gran variedad de metabolitos secundarios, los cuales son sintetizados de metabolitos primarios (carbohidratos, lípidos y aminoácidos). Estos son fuentes únicas de aditivos alimenticios, sabores y fármacos. La acumulación de ellos regularmente ocurre en plantas sometidas a estrés, incluyendo varios elicitores o moléculas señalizadoras. La proporción de esos componentes regularmente cae por debajo del 1% en peso seco y

dependen fuertemente en la fisiología y desarrollo estacional de la planta (Akula y Ravishankar, 2011).

Estrés en la Producción de Metabolitos Secundarios

Las plantas tienen que trabajar con varias y complejas interacciones, involucrando numerosos factores ambientales. En el curso de la evolución, ellas han tenido que evolucionar mecanismos específicos para adaptarse y sobrevivir eventos estresantes (Selmar y Kleinwächter, 2013). La exposición de plantas a estrés biótico y abiótico induce una disrupción en el metabolismo de la planta, implicando costos fisiológicos. El estrés abiótico es uno de los más importantes, causando un gran impacto en el crecimiento, consecuentemente, es responsable de bajos rendimientos y pérdidas en el campo. La pérdida puede alcanzar más del 50% en la mayoría de las especies de plantas. En cuanto al estrés biótico, este representa un desafío adicional, induciendo una fuerte presión en las plantas, añadiendo daño a través de patógenos o ataques herbívoros (Rejeb y col., 2014).

Un paso crucial en la defensa de plantas es el tiempo de percepción del estrés, para poder responder de manera rápida y eficiente. Después del reconocimiento, los mecanismos de defensa basales llevan a la activación de complejas cascadas de señales que varían de un estrés a otro. Después de la exposición a estrés biótico o abiótico, canales de iones específicos y cascadas de quinasas son activadas, especies reactivas de oxígeno (ROS), fitohormonas como ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno acumulado, reprograman la maquinaria genética resultado en reacciones de defensa y un incremento en la tolerancia de la planta, en orden de minimizar el daño biológico causado por el estrés (Rejeb y col., 2014).

El estrés abiótico abarca un amplio intervalo (alta y baja temperatura, sequía, alcalinidad, salinidad, estrés por UV, etc.) que son una amenaza

potencial para las plantas. El uso de elicitores ha sido ampliamente usada para incrementar la producción o inducción de metabolitos secundarios in vitro. La exposición a sequía o salinidad puede causar reacciones comunes en plantas. Ambos tipos de estrés llevan a la deshidratación celular, la cual causa estrés osmótico y remoción de agua del citoplasma hacia vacuolas (Rejeb y col., 2014).

El estrés por sequía mayormente afecta el crecimiento y desarrollo de la planta. Este estrés ocurre cuando el agua disponible en el suelo es reducida a un nivel crítico o no está disponible y las condiciones atmosféricas contribuyen a la continua pérdida de agua. Se ha observado tolerancia en casi todas las plantas cuando están sometidas a estrés por sequía. Este estrés surge de déficit de agua, usualmente acompañado por altas temperaturas y radiación solar. La sequía causa estrés oxidativo y ha sido reportado como elicitor de flavonoides y ácidos fenólicos en hojas de sauce. La sequía por estrés influye en cambios en la razón de clorofila a, b y carotenoides. Una reducción en el contenido de clorofila fue reportada en el algodón y *Catharanthus roseus*. Las condiciones de sequía disminuyen el contenido de saponinas en *Chenopodium quinoa* de 0.46% a 0.38% en peso seco. Se han reportado antocianinas acumuladas en sequía y a bajas temperaturas. Los tejidos vegetales que contienen antocianinas son usualmente resistentes a la sequía (Akula y Ravishankar, 2011).

La producción de metabolitos secundarios de las plantas, como cardenólidos, depende mayormente de factores bióticos y abióticos. Un ambiente controlado, con estrés específico, como estrés por sequía, puede disminuir la cantidad de biomasa y optimizar la producción de metabolitos secundarios de la planta. Se ha reportado que el estrés por sequía en plantas aumenta el contenido y composición de aceites esenciales, polifenoles, antioxidantes, entre otros. Por lo cual el agua es un factor abiótico más importante para la producción de metabolitos secundarios (Manukyan, 2011). Agrawal y col. (2014) encontraron incrementos de la producción de cardenólidos por *Asclepias syriaca* cultivada bajo déficit hídrico, comparada con la cultivada con riego sin estrés (Agrawal y

col., 2014b). Diversos estudios han mostrado que en varios cultivos el uso de geles de poliacrilamida ha incrementado la retención de agua, por lo tanto, se puede emplear el gel para añadir otro nivel de humedad en el cultivo (López y col., 2013a).

Fitofármacos

Potenciales Fitofármacos

La Organización Mundial de la Salud, (OMS), ha definido Fitomedicina como la aplicación de principios activos de origen vegetal en terapéutica, basado en el conocimiento científico moderno, usando la farmacodinamia, farmacocinética, estudios preclínicos, clínicos y la divulgación de éstos a través de medios reconocidamente validados por las comunidades. Estas ramas ayudan a transformar remedios caseros a medicina real, lo que beneficia a los consumidores (Villa y col., 2011)

La OMS ha confirmado que el 80% de la población mundial, especialmente millones de personas de las áreas rurales de los países en desarrollo, hacen uso de las medicinas herbales para sus necesidades de la salud. El uso de medicinas usadas tradicionalmente, (tés, tinturas, etc.), partes de plantas cortadas o pulverizadas y extractos no estandarizados carentes de calidad; además de poca información de eficacia clínica y efectos farmacológicos. Por lo cual es de gran importancia hacer estudios que validen estas medicinas provenientes de plantas (Garza y col., 2010)

El control de calidad es un proceso que debe cubrir todas las etapas, desde el cultivo del material vegetal hasta el control del producto terminal y la evaluación de su estabilidad y calidad a lo largo del tiempo. En general, el control de calidad se basa en tres importantes definiciones: identidad, pureza y contenido. La identidad se puede verificar por observaciones macro y

microscópicas. Fuentes confiables son los ejemplares de herbario. Sin embargo, en los últimos años se ha considerado importante también agregar el perfil cromatográfico y/o espectroscópico del material. La pureza está íntimamente ligada con la seguridad de las drogas y se refiere a la presencia de contaminantes como material extraño o metales pesados, contaminación microbiana, aflatoxinas, radiactividad y residuos de pesticidas que deben estar ausentes o por debajo de ciertos umbrales establecidos. Estas etapas del control de calidad son necesarias para el desarrollo de un fitofármaco, además se necesita hacer una estandarización del producto. La estandarización se puede definir como el establecimiento de la calidad farmacéutica reproducible comparando un producto con una referencia establecida y definiendo la cantidad mínima de uno o varios componentes de o grupos de componentes que deben estar presentes (Garza y col., 2010)

Establecimiento de un Cultivo

Antes de establecer un cultivo es importante germinar la planta medicinal, el uso de fitohormonas como el ácido giberélico puede aumentar la tasa de germinación. Las semillas y otros materiales de propagación deben ser específicos, de igual manera los proveedores deben de suministrar toda la información necesaria relacionada con la identidad y calidad. Las semillas deben ser preferentemente, libres de contaminación y enfermedades, con la finalidad de tener un crecimiento sano de la planta. Una vez concluido el proceso de germinación se procede a establecer las condiciones de cultivo (Araiza y col., 2011).

El cultivo de plantas medicinales requiere de cuidados intensivos y mantenimiento. Las condiciones y duración del cultivo dependen de la calidad de los materiales para llevar a cabo el cultivo. Si no existe alguna publicación de datos de cultivo, se deberán seguir los métodos tradicionales de cultivo (Akula y Ravishankar, 2011; Rejeb y col., 2014). Las plantas medicinales de la misma

especie pueden obtener diferencias significativas en su calidad cuando son cultivadas en diferentes sitios, debido a la influencia del suelo, el clima y otros factores (abióticos y bióticos). Esas diferencias pueden deberse a contrastes en los metabolitos secundarios. Por lo cual se deben tomar en consideración variables ecológicas y geográficas. El cultivo de plantas medicinales puede afectar el balance ecológico, en particular la diversidad genética y las relaciones entre la flora y la fauna. La calidad y crecimiento de las plantas medicinales puede ser afectada por otras plantas, otros organismos y actividades humanas. Las condiciones climáticas, por ejemplo, la cantidad de luz, lluvia y temperatura del suelo, influyen significativamente la calidad física y química de las plantas medicinales (Akula y Ravishankar, 2011; Rejeb y col., 2014).

El suelo debe contener las porciones apropiadas de nutrientes, materia orgánica y otros elementos para asegurar el crecimiento óptimo de la planta. Las condiciones óptimas de suelo incluyen el tipo de suelo, drenaje, retención de humedad, fertilidad y pH. El riego y el drenaje debe ser controlado y realizado de acuerdo con las necesidades individuales de la planta durante sus etapas de crecimiento. Las plantas medicinales deben ser recolectadas durante su temporada óptima para asegurar la producción del metabolito de interés. El tiempo de recolección depende de la parte de la planta a utilizar. El mejor momento para la recolección debe ser determinada de acuerdo a la cualidad y cantidad de constituyentes biológicamente activos en vez de la mayor producción de biomasa (Bauer, 1998; WHO, 2003).

La preparación de las muestras es el paso más importante en el desarrollo de métodos para el análisis de productos herbales. Las operaciones básicas implican un prelavado, secado o liofilización del material, molido, todo lo cual debe ser realizado de tal manera que garantice la reproducibilidad de los resultados. En un estudio de 20 plantas medicinales los extractos con mejor reproductividad y menores evidencias de descomposición fueron con obtenidos

con solución hidroalcohólica, por lo que se recomienda como primera opción (Garza y col., 2010)

El desarrollo, optimización y validación de métodos analíticos juega un papel importante en el descubrimiento, desarrollo y manufactura de la industria farmacéutica, incluyendo la de fitofármacos. La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es la técnica instrumental más empleada para el aislamiento, análisis y control de calidad de productos naturales bioactivos. Con base en los datos reportados por farmacopeas herbolarias y la revisión de artículos científicos, el HPLC con gradiente de elución, continúa siendo el método de elección para el análisis de marcadores en las preparaciones y productos botánicos, sobre todo si se trata de compuestos térmicamente lábiles. Las ventajas del HPLC incluyen su alta reproducibilidad, amplio rango lineal, fácil automatización y capacidad para analizar una gran diversidad de compuestos tanto volátiles como no volátiles. La sensibilidad de la técnica depende del sistema de detección empleado. Los detectores más comunes que se emplean en HPLC son ultravioleta-visible, siendo particularmente útiles los detectores de diodos (DAD), los cuales, permiten monitorear los espectros de las señales cromatográficas, para su identificación y análisis de pureza (Garza y col., 2010)

MATERIALES Y MÉTODOS

Químicos

Todos los solventes grado analítico tales como, etanol (PubChem CID: 702), ácido fórmico (PubChem CID: 284), y acetonitrilo (PubChem CID: 6342). El agua fue purificada mediante un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Medio Eagle modificado de Dulbelco (DMEM) alto en glucosa, solución de L-glutamina 200 mM, monohidrocloruro de L-arginina (PubChem CID: 87640969), L-asparagina (PubChem CID: 24890831), solución de piruvato de sodio 100 mM (PubChem CID: 24899804), solución de penicilina-estreptomina (PubChem CID: 86591708), hidroclicloruro de doxorubicina (PubChem CID: 31703), dimetilsulfóxido (DMSO) (PubChem CID: 679), solución de tripsina-EDTA 0.25% y MTT [3 - (4, 5 -dimethylthiazol-2-il) -2, 5-difeniltetrazolio] (PubChem CID: 64965), fueron comprados de Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, EUA). El suero fetal bovino (SFB) fue obtenido de Gibco Life Technologies (Grand Island, NY, EUA).

Colecta y Germinación de las Semillas de *Asclepias subulata*

Las semillas se recolectaron de los alrededores de Hermosillo, Sonora en el área conocida como Cerro del Bachoco, a los 29°08'43" N y 110°57'10" O. El trabajo de investigación se realizó en un invernadero comercial protegido con sombra, localizada en la costa de Hermosillo 29° 03' 18" N y 111° 05' 21" O). Se colocaron semillas de *A. subulata* en un recipiente con agua, con el objetivo de eliminar semillas consideradas como infértiles al permanecer flotando. Luego se sumergieron 50 semillas en una solución de ácido giberélico (0, 125, 250, 500 y 1000 ppm) durante 24 y 48 h, posteriormente con un colador se extrajeron las semillas y se colocaron a la sombra en papel estraza. Posteriormente, se prepararon 4 charolas de siembra de 200 cavidades cada una, llenándolas con un sustrato (*peat moss* en este caso) y colocando una semilla por cavidad. En

cada orificio de la charola se colocó una semilla previamente tratada a una profundidad de 0.5 cm. Después se colocaron las charolas bajo sombra a una temperatura de 25 °C, hasta la emergencia. El riego se realizó diariamente. Para evaluar la eficacia del tratamiento se evaluó la tasa de germinación y la aparición de la hoja verdadera (Araiza y col., 2011; López y col., 2013b).

Cultivo y Condiciones de *Asclepias subulata*

El trasplante se llevó a cabo en suelo en el Campo Experimental del Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora, lugar con clima desértico, a los 29°00'48" latitud norte, 111°08'07" longitud oeste, a 151 msnm. El invernadero tiene una superficie de 276 m². El suelo es de textura franco-arenosa y agua para riego de pozo con conductividad eléctrica de 0.57 dSm-1 y pH de 7.2. Las fechas de trasplante fueron en primavera del 2016 y otoño del 2016.

El trasplante se realizó en dos temporadas, primavera y otoño, en la primera fueron 12 hileras divididas de 11 m de longitud, con distanciamiento de 1 m entre plantas y 1 m entre hileras. Se sometieron a estrés hídrico (déficit de hídrico, déficit hídrico con poliacrilamida, déficit de hídrico a doble hilera, riego, riego con poliacrilamida y riego a doble hilera), (figura 3). En la temporada de otoño, fueron colocadas ocho hileras divididas de 11 m de longitud, con distanciamiento de 1.5 cm entre plantas y la distancia entre hileras de 1.5 m. Se sometieron a estrés hídrico (con déficit de hídrico, déficit hídrico con poliacrilamida, riego y riego con poliacrilamida), (figura 4). Una vez establecido el cultivo, se llevaron a cabo acciones preventivas y control químico de insectos y enfermedades. El riego se distribuyó a través de goteros a 30 cm de separación y gasto 1 L/h. Una vez establecidas las condiciones, las muestras para la preparación de extractos fueron realizadas 6 meses después del trasplante de otoño y para el trasplante de primavera fueron 12 meses después.

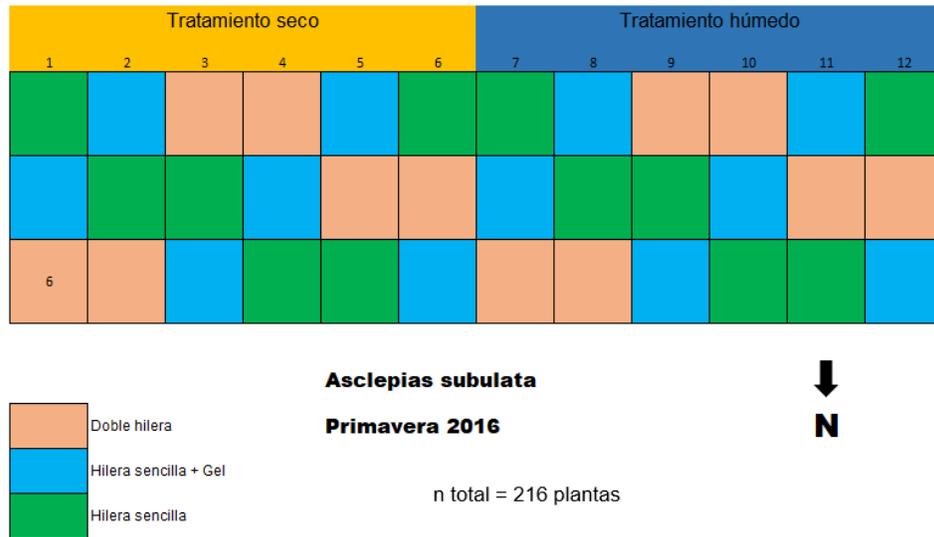


Figura 3. Diseño experimental de un cultivo de *Asclepias subulata* cultivado en primavera.

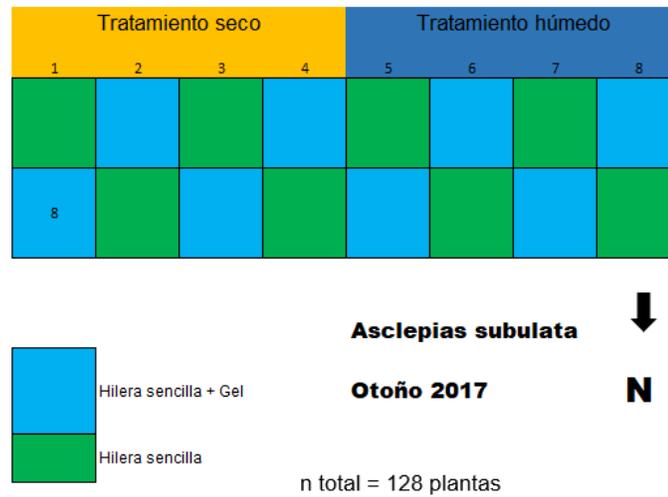


Figura 4. Diseño experimental de un cultivo de *Asclepias subulata* cultivado en otoño.

Cálculo de la Biomasa

Para el cálculo de la biomasa aérea se usó la técnica de Reid y col. (1990), mediante una ecuación de regresión lineal, con el diámetro basal de los brazos y la masa foliar de cada planta. Esta ecuación es usada para estimar la biomasa restante basándose en la medida de los diámetros y altura de la planta. Los valores anteriores se midieron más de cuatro veces por cada tratamiento y fue un muestreo al azar. Los brazos de plantas a cinco centímetros de altura fueron cortadas y secadas a una temperatura de 55-60 °C por 48 h, después se pesaron para obtener la materia seca. Se usó una regresión lineal con los datos obtenidos de materia seca, diámetros y altura para hacer una correlación, consecuentemente se escogió aquella que se ajusta mejor a los datos (Reid y col., 1990).

Preparación de las Muestras de *Asclepias subulata*

Por separado cada muestra de los diferentes tratamientos de cultivo, se deshidrato a temperatura ambiente (25 °C ± 2). Después de secado, el material vegetal, se cortó en trozos pequeños y se llevó a molienda para estandarizar a un tamaño de partícula de 2 mm (malla No. 10) en un molino de grano tipo whiley obteniéndose un polvo fino, para después proceder a la extracción etanólica de *A. subulata* (Rascon y col., 2015).

Preparación del Extracto Etanólico Crudo de *Asclepias subulata*

Para realizar la extracción de manera individual, se pesaron 20 g del material pulverizado, Se adicionó etanol al 70% en relación de 1:10 con el pulverizado y se mantuvo en reposo por 10 días a temperatura ambiente en recipiente cerrado, agitando la mezcla diariamente. Transcurrido el tiempo, la mezcla se filtró en papel Whatman No. 2 y posteriormente, el filtrado se evaporó a presión reducida

utilizando un rotavapor, a una temperatura de aproximadamente 45 °C, hasta obtener un extracto crudo sin el disolvente con una consistencia viscosa. El extracto se conservó a 4°C para ser utilizado en los ensayos posteriores (Rascon y col., 2015).

Cromatografía de Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La cuantificación de los cardenólidos se realizó por medio de HPLC-DAD utilizando un equipo Agilent technologies 1260 infinity, a una longitud de onda de 220 nm. La separación se realizó usando una columna Supelcosil™ LC-18, 5 µm (26 cm x 4.6 mm, North Harrison Road, Bellefonte PA, USA) y fue empleado un gradiente de solvente A: agua con 0.1% de ácido fórmico y B: acetonitrilo. Las corridas fueron de 40 minutos. Se comenzó con un gradiente A de 80%, por 10 minutos de elución isocrática, A fue disminuyendo hasta 60% después de 6 minutos, A siguió disminuyendo hasta 10% después de 14 minutos y se mantuvo constante por 10 minutos más. Las muestras para los análisis por HPLC de los extractos etanólicos de *A. subulata* obtenidos de las plantas sometidas a estrés hídrico, fueron disueltas en las mismas proporciones de A y B al principio de la corrida (2 mg/mL). Posteriormente fueron filtradas por una membrana de 0.2 µm y colocadas en un vial para su inyección. Se inyectó 60 µL de muestra a una tasa de flujo de 1 mL/min, después se integraron las áreas de cada señal para cuantificar los metabolitos (Rascon y col., 2016b).

Líneas Celulares

Para la elaboración del presente estudio se emplearon las siguientes líneas celulares: A549 (carcinoma alveolar humano) y ARPE-19 (epitelial pigmentada retinal humana) adquiridas del ATCC (American Type Culture Collection; Rockville, MD, EUA). Las líneas celulares fueron propagadas como cultivos en

monocapa en cajas de cultivo de 25 cm², en el medio Eagle Modificado de Dulbecco, DMEM (Invitrogen, USA), suplementado (D5F) con 5% de suero fetal bovino (Sigma St. Louis, MO), previamente inactivado. Los cultivos fueron incubados a una temperatura de 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO₂ (50,000 ppm) y 95% de humedad en incubadora (Thermo Forma científica, Marietta, USA) (Rascon y col., 2016b).

Evaluación de la Actividad Antiproliferativa

La determinación del efecto antiproliferativo se llevó a cabo mediante la metodología descrita por Rascón y col (2015). Donde se usó una concentración celular de 1x10⁴ por pocillo en platos de 96. Después se incubaron por 24 h a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO₂, para permitir la adhesión de células. Se añadieron alícuotas (50 µL) de medio (DMEM 5% FBS), conteniendo diferentes concentraciones de extractos etanólicos (en el intervalo de 0.10 a 200 µg/mL), después se incubaron los cultivos celulares por 48 h. Como control positivo se usó doxorubicina. En las últimas 4 horas de incubación, las células fueron lavadas con PBS. Posteriormente, se añadió medio fresco junto a una solución MTT (5 mg/mL). Al final se disolvió el formazán en una solución de isopropanol ácido, para ser leída en un lector de ELISA (Multiskan EX, Thermo Scientific, Waltham), leyendo a 570nm y 630nm. El ensayo colorimétrico del MTT es cuantitativo y sensible midiendo la viabilidad y proliferación celular. El método está basado en la capacidad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa de las células viables, para reducir el sustrato amarillo (soluble en agua), Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a un compuesto coloreado azul-violeta (formazán) insoluble en agua. La cantidad de formazán producida es directamente proporcional al número de células en el cultivo (Mosmann, 1983; Rascon y col., 2015).

Análisis Estadístico

Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces, por triplicado, excepto los realizados en HPLC, por duplicado. Los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar (GraphPad Prism 5, GraphPad Software, Inc., CA, EE.UU.). Las diferencias estadísticas entre los grupos de datos se evaluaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de prueba de Tukey o Kruskal Wallis (IBM, SPSS, Statistic 20).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Germinación, Trasplante y Cultivo de *Asclepias subulata*

En el presente trabajo se realizó la germinación de semillas de *Asclepias subulata* mediante el método descrito por López y col. (2017), quienes utilizaron ácido giberélico (GA). Los resultados de germinación son presentados en la tabla I, las semillas de *A. subulata* presentaron germinación en todos los tratamientos con GA₃, siendo mejores para las concentraciones de 125 ppm con un 76.6% de germinación, en ambos tratamientos de remojo (24 y 48 horas), correspondiendo el más bajo al tratamiento de remojo con 43.33%. El contraste de germinación coincide con los reportados por López y col. (2017), donde demostraron una influencia positiva en la germinación cuando se usa GA₃ (López y col., 2017).

Los resultados obtenidos con respecto al número de días (T_x) requeridos para alcanzar el 25, 50 y 75% de semillas germinadas se presentan en la tabla I, para un T₂₅ el menor tiempo de germinación se obtuvo en los tratamientos de GA₃ de 125 ppm con remojo de 24 y 48 horas, sin diferencias significativas entre tratamientos, en contraste la muestra testigo y la muestra de remojo presentaron mayor tiempo de germinación requiriendo de 5.6 y 7.25 días para alcanzar el 25% de semillas germinadas. Para T₅₀ el menor tiempo de germinación también fue el de 125 ppm con 4.75 días con remojo en 48 h y 5.25 días para el de 24 h, contrastando, el testigo que necesitó 14.66 días para alcanzar el 50% de semillas germinadas. En cuanto a T₇₅, el menor tiempo de germinación fue de 125 ppm en remojo de 24 h, promediando 11.5 días, por otro lado, el testigo 20 días. Sin embargo, no en todas las repeticiones se obtuvo el 75% de semillas germinadas, lo cual puede ser debido a factores de deterioro (microorganismos, radiación, daño físico, daño químico, etc.), donde la semilla pierde su integridad y no puede llevar a cabo el proceso de germinación (Lambers, 2008).

El índice de velocidad de germinación (IVG), como puede observarse en la tabla I, el más alto se obtuvo en aquellos tratamientos de 125 ppm de GA₃ con remojo de 24 y 48 h, sin diferencias significativas entre tratamientos a pesar del bajo IVG en el testigo. Estos fenómenos coinciden con el trabajo realizado por López y col. (2017), donde se vio favorecida la velocidad de germinación en *A. subulata* bajo el efecto del GA₃ (López y col., 2017). En otra especie de algodóncillo (*Asclepias syriaca*), Oegema y col. (1972), concluyeron que la dormancia de las semillas de algodóncillo puede ser despertada por muchos factores, haciendo énfasis en el uso de ácido giberélico por su habilidad de despertar a la semilla de esta planta. También encontraron que la germinación de algodóncillo es regulada por interacción entre promotores (etileno) e inhibidores (ácido abscísico) del crecimiento (Oegema y Fletcher, 1972). Otro grupo de investigadores también utilizaron ácido giberélico como elicitador de semillas de *Asclepias syriaca* con resultados exitosos, manejando la temperatura de almacenamiento como variable extra, donde el almacenamiento de la semilla de algodóncillo es vital para una emergencia del 100% (ROŞU y col., 2011). Probablemente existen variantes que se pueden mejorar para la germinación de *A. subulata*, sin embargo, el uso de ácido giberélico parece ser el más importante para el proceso de germinación. El GA es una hormona esencial en el proceso de desarrollo y germinación de la planta. Las plantas que tienen deficiencia en la biosíntesis de GA tienen un desarrollo pobre y defectuoso. El GA influye de dos maneras, primero incrementando el potencial de crecimiento del embrión (semilla) e induciendo enzimas hidrolíticas, en especial la alfa amilasa (Gupta y Chakrabarty, 2013). Existen alrededor de 136 giberelinas, de las cuales una de las más activas y más usada en agricultura es la GA₃, debido a su potente actividad (González y col., 2007).

Después del proceso de germinación, se realizó el trasplante en un campo experimental, como se menciona en metodología. Se trasplantó en dos

temporadas primavera y otoño. Previamente se analizaron los minerales y características del suelo donde se llevó a cabo el experimento, cabe mencionar que también se analizó el agua, todo esto con el fin de conocer los factores involucrados en la nutrición de las plantas de *A. subulata*. Todas las concentraciones de los minerales encontrados en agua y suelo son presentadas en el apéndice 1. Dichos datos nos confirman que los minerales y características tanto de suelo como de agua, se encuentran en los niveles adecuados para un cultivo general (Lambers, 2008). Cabe mencionar que también se monitoreó la humedad de suelo, siendo en promedio de $0.095 \text{ m}^3/\text{m}^3$ para los tratamientos de riego y $0.058 \text{ m}^3/\text{m}^3$ para los de déficit hídrico.

Al caracterizar el suelo y agua para el cultivo se procedió a realizar el trasplante como se muestra en las figuras 3 y 4. Una vez establecidos los cultivos se añadió gel de poliacrilamida como se mencionó en metodología. Finalmente, cuando la mayoría de las plantas alcanzaron su etapa de floración (6 meses después del trasplante), se procedió a muestrear (realización de extractos etanólicos) y provocar el estrés hídrico (cortar suministro de agua en el tratamiento de déficit hídrico), en los cultivos. En la figura 5, se puede observar el cultivo de otoño, donde la planta promedio tiene unos 30 cm de altura y el 80% de todas las plantas está en floración. Los cambios fisiológicos provocados por déficit hídrico se observaron con el tiempo, especialmente en los meses sin lluvia y alta radiación solar o insolación. Estos cambios son mecanismos de supervivencia, tales como la reducción de las hojas, cierre de estomas, pérdida de material vegetal, estado de inactividad entre otros (Lambers, 2008). En la figura 6, se puede apreciar mayormente el contraste a los 18 meses del trasplante.

Tabla I. Medias de emergencia, tiempo de germinación e índice de velocidad de germinación de semillas de *Asclepias subulata* en condiciones de sombra utilizando ácido giberélico.

Tratamiento	E (%)	T ₂₅ (días)	T ₅₀ (días)	T ₇₅ (días)	IVG (semillas/día)
T	73.33	5.5	14.66	20	3.33
GA1000+	53.33	13	12.33	X	1.83
GA500+	53.33	5.25	8	X	3.86
GA250+	50	4.5	9.5	X	4.033
GA125+	76.66	4	4.75	11.5	6.63
R-	43.33	7.25	8.75	X	2.83
GA1000-	50	4.75	11.6	X	3.73
GA500-	45	4.66	11	X	3.1
GA250-	60	5	5.6	20	4.7
GA125-	70	4	5.25	13.5	5.56

E = emergencia, Tx = tiempo necesario para alcanzar el 25, 50 y 75% de semillas germinadas, IVG = índice de velocidad de germinación, (X) = no todas las repeticiones alcanzaron la fase, R = el tratamiento solo incluye el remojo, T = ningún tratamiento, (+) = remojo por 48 h, (-) = remojo por 24 h.



Figura 5. Plantas en etapa de floración de *Asclepias subulata* trasplantada en otoño, a los 6 meses de ser trasplantada.



Figura 6. Plantas de *Asclepias subulata* trasplantada en otoño, a los 18 meses de ser trasplantada, a la izquierda podemos observar los tratamientos de riego y a la izquierda los de déficit hídrico.

En cuanto a los valores meteorológicos, los cuales se midieron con los siguientes sensores ubicados en el campo experimental: (vaisala HMP45 y CM3, piranómetro de la marca kipp and zonen, precipitación con pluviómetro Texas electronics modelo TR-525, y viento anemómetro marca Young modelo 5103), se pueden observar los valores promedio de cada mes en el apéndice 2. Se puede observar que en los meses de mayo a septiembre se encuentran los valores más altos para temperatura, humedad atmosférica, presión de vapor a saturación y radiación solar, por lo cual en este periodo se presenta un mayor estrés para los cultivos, estos datos del microclima son importantes, ya que pueden afectar la producción de metabolitos secundarios (Larcher, 2003).

Determinación Mensual de Biomasa Aérea de *Asclepias subulata* Cultivada Bajo Estrés Hídrico

La baja disponibilidad de agua en Sonora demanda el uso de nuevas herramientas para hacer más eficiente el uso del agua y asegurar la rentabilidad de la agricultura. Por lo cual en este trabajo se diseñaron dos cultivos experimentales variando la hidratación con el uso de gel y sin gel en *A. subulata*, observando cambios en la calidad y producción.

La evaluación de biomasa se realiza como se describió en metodología, a través del peso seco de tallos y número de tallos. También se tomaron medidas de diámetro y altura con el fin de generar una ecuación alométrica para calcular la biomasa de *A. subulata*. Dentro de la composición de la planta se encontró un porcentaje de agua del $86.27 \pm 6.3 \%$ y $13.72 \pm 2.4 \%$ de peso seco. En la figura 7 y 8 podemos observar gráficamente los cambios de biomasa del cultivo de otoño y primavera respectivamente, y en las tablas II y III, se tienen los valores promedio de las gráficas.

En el cultivo de otoño, se observó un incremento en la biomasa aérea en todos los tratamientos, especialmente en aquellos tratados con riego + gel, con

una biomasa de 575.9 g/planta en el cultivo de otoño, obteniendo una diferencia significativa ($P < 0.05$, Kruskal Wallis), comparada con los déficits hídricos, el cual tiene una biomasa menor de 91.3 g/planta. En general, la biomasa aérea aumento más de cuatro veces desde el inicio al final en todos los tratamientos. El incremento más grande fue a partir de agosto, en cada tratamiento, esto tiene sentido, debido a que la planta está pasando por un crecimiento exponencial. Algo muy común en estos experimentos de estrés hídrico, es la perdida de biomasa en los tratamientos de déficit hídrico y se restablece en época de lluvia, por ejemplo, en julio donde se registraron 129.8 mm Cuando las plantas están bajo estrés hídrico tienden a usar su energía para sobrevivencia y no para crecimiento, esta es una estrategia en plantas silvestres perennes. En este proceso la planta reduce su actividad metabólica y algunas presentan estrategias como la defoliación y perdida de otras estructuras. Sin embargo, cuando la fuente de agua es reestablecida (por ejemplo, cuando llueve), la planta despierta y se restablece (Jones, 2013).

En cuanto al cultivo de primavera no se observaron cambios bruscos en biomasa al inicio y al final, esto es debido a que la planta se empezó a muestrear 12 meses después de haberse trasplantado, lo que significa que el cultivo ya había pasado por su fase exponencial de crecimiento. Por otro lado, se observó un comportamiento igual al del cultivo de otoño, donde los tratamientos de riego tienen mayor biomasa que los tratamientos con déficit hídrico, de igual manera con diferencias significativas ($P < 0.05$, Kruskal Wallis). Comparando los cultivos de primavera y otoño, no se mostraron diferencias significativas, por lo que se concluye que la planta puede ser sembrada en cualquiera de esas estaciones y se obtendrán resultados similares en biomasa.

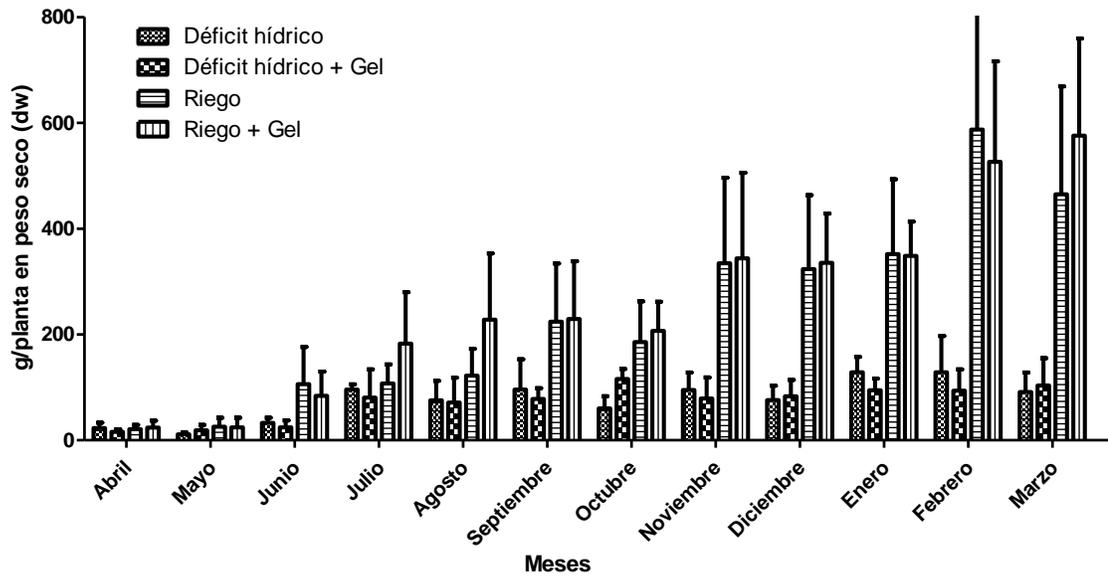


Figura 7. Evaluación mensual de biomasa aérea en *Asclepias subulata* cultivada en otoño. En el eje de la Y se muestra los gramos por planta seca y en el eje X los meses.

Tabla II. Determinación de biomasa de *Asclepias subulata* trasplantada en otoño bajo estrés hídrico.

Tratamiento	Biomasa (g/planta)			
	Déficit hídrico	Déficit hídrico + Gel	Riego	Riego + Gel
Abril	23.1 ± 10	15.9 ± 4	21.0 ± 8	24.1 ± 3
Mayo	11.4 ± 3	18.9 ± 10	25.4 ± 17	24.3 ± 8
Junio	32.8 ± 9	24.4 ± 12	106.2 ± 30	83.9 ± 15
Julio	95.87 ± 9	80.72 ± 53	107.17 ± 36	182.7 ± 57
Agosto	75.58 ± 37	71.2 ± 27	122.3 ± 50	227.9 ± 125
Septiembre	95.7 ± 57	78.0 ± 20	224.0 ± 110	229.3 ± 109
Octubre	60.4 ± 22	115.8 ± 19	185.5 ± 77	206.7 ± 55
Noviembre	95.1 ± 33	78.9 ± 29	334.5 ± 101*	344.0 ± 101*
Diciembre	75.9 ± 27	83.1 ± 31	323.8 ± 109*	335.4 ± 93*
Enero	128.6 ± 29	94.8 ± 22	352.1 ± 141*	348.6 ± 64*
Febrero	128.5 ± 68	93.8 ± 40	587.2 ± 213*	526.2 ± 190*
Marzo	91.3 ± 36	103.3 ± 15	464.9 ± 90*	575.9 ± 118*

Biomasa aérea (g planta⁻¹; promedio ± SD n>4) * Diferencias estadísticamente significativas de tratamientos húmedos con respecto a déficit hídrico con una P < 0.05, Kruskal Wallis.

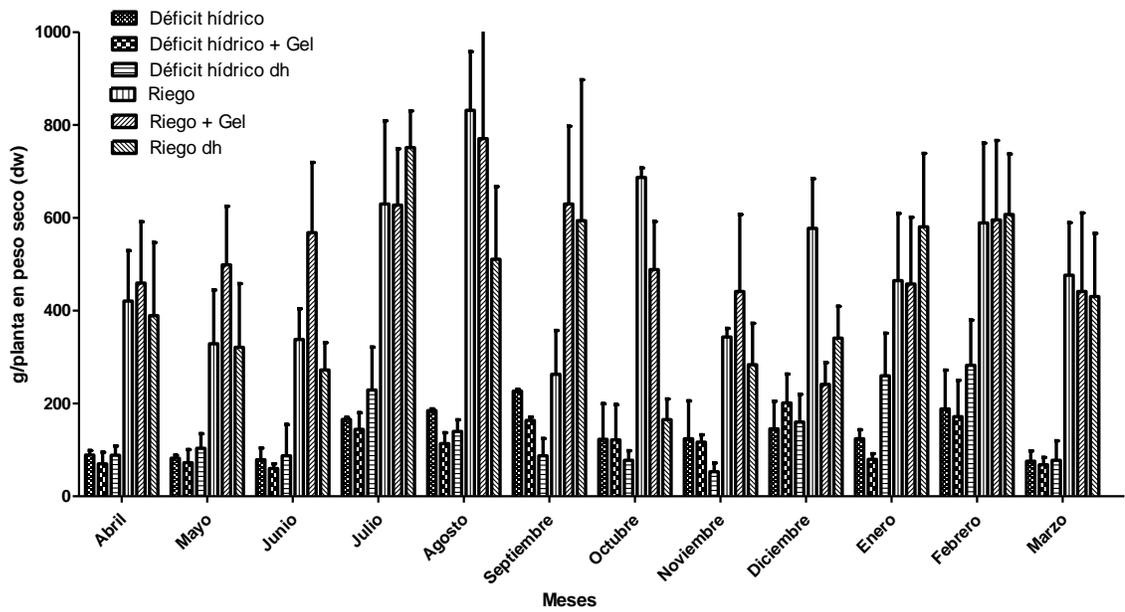


Figura 8. Evaluación mensual de biomasa aérea en *Asclepias subulata* trasplantada en primavera. En el eje de la Y se muestra los gramos por planta seca y en el eje X los meses.

Tabla III. Determinación de biomasa de *Asclepias subulata* trasplantada en primavera bajo estrés hídrico.

Tratamiento	Biomasa (g/planta)					
	Déficit hídrico	Déficit hídrico + Gel	Déficit hídrico dh	Riego	Riego + Gel	Riego dh
Abril	89.1 ± 9	70.1 ± 24	88.7 ± 19	420.7 ± 108	459.4 ± 132	389.4 ± 157
Mayo	82.2 ± 6	72.5 ± 28	103.6 ± 31	328.5 ± 116	498.5 ± 126	321.1 ± 137
Junio	78.7 ± 25	59.8 ± 10	87.5 ± 67	337.9 ± 66	567.8 ± 151	272.1 ± 59
Julio	165.7 ± 4	144.4 ± 35	229.02 ± 92	629.7 ± 179	627.5 ± 121	751.05 ± 79
Agosto	184.45 ± 3	113.5 ± 23	139.8 ± 25	831.6 ± 126	770.4 ± 298	510.8 ± 156
Septiembre	226.4 ± 3	163.8 ± 7	87.9 ± 37	263.1 ± 94	629.6 ± 167	593.7 ± 303
Octubre	122.7 ± 76	121.5 ± 76	77.7 ± 20	687 ± 20	488.7 ± 103	165.1 ± 44
Noviembre	124.01 ± 81	116.92 ± 15	52 ± 19	343.2 ± 18	441.3 ± 165	283.35 ± 89
Diciembre	145.41 ± 59	201.295 ± 62	159.9 ± 59	577.2 ± 107	241.3 ± 46	340.6 ± 68
Enero	124.2 ± 19	79.9 ± 12	259.7 ± 91	464.8 ± 144*	457.5 ± 143*	580.6 ± 158*
Febrero	188.2 ± 83	171.8 ± 78	282.2 ± 97	588.8 ± 171*	595.6 ± 170*	607.2 ± 130*
Marzo	75.5 ± 22	68.2 ± 15	77.6 ± 42	476.4 ± 112*	441.2 ± 169*	430.2 ± 136*

Biomasa aérea (g planta⁻¹; promedio ± SD n>4) * Diferencias estadísticamente significativas de tratamientos húmedos con respecto a déficit hídrico con una P < 0.05, Kruskal Wallis.

En los tratamientos de riego, en ambos trasplantes, se obtuvo un efecto positivo en la biomasa de las plantas, aumentando el grosor del tallo y el número de tallos por planta. En cuanto al tratamiento con gel, no se encontró diferencias significativas con respecto al riego sin gel; sin embargo, el aumento de la biomasa se mantuvo en riego con gel en los meses de mayor estrés (mayo a septiembre). López y col. (2013a), mencionan un incremento en la humedad del suelo cuando se usa el gel, lo cual es importante para reducir el tiempo de riego y la frecuencia (ahorro considerable de agua), sin embargo, no encontraron diferencia significativa en la calidad y producción del fruto de *Capsicum annuum* L. (López y col., 2013a).

En el tratamiento de doble hilera, el propósito es generar estrés por competencia, donde las plantas vecinas compiten por la cantidad de energía, nutrientes, agua y espacio. No se encontró diferencia significativa entre tratamientos con doble hilera y el resto, lo cual demuestra que *A. subulata* puede soportar y adaptarse al menos a otra planta vecina sin ocasionar cambios significativos en su biomasa (Sepúlveda y col., 2003).

En el apéndice 3 se muestra una gráfica donde se correlaciona la biomasa aérea con el diámetro del tallo con el fin de desarrollar una ecuación lineal que se pueda usar para calcular biomasa aérea, sin tener que cortar tallos de la planta. También se correlacionó biomasa aérea con altura, sin embargo, se obtuvo una mejor correlación con el diámetro $R^2 = 0.7$. Estos resultados son relevantes en el campo de agricultura, donde es importante tener una cosecha altamente productiva en biomasa (Lambers, 2008; Picard y col., 2012).

En el apéndice 2 se muestran los valores meteorológicos promedio del año de muestreo, destacando periodos de sequedad de marzo a mayo y de agosto a octubre, lluvias en junio y julio, una demanda atmosférica de vapor mayor de mayo a agosto y bajas temperaturas de diciembre a febrero. De todas las variables mencionadas, las que parecen afectar mayormente a la producción de

biomasa fueron los meses sin lluvia, donde se presentó una pérdida de biomasa. También se observó un crecimiento muy lento de la planta durante el tiempo de frío. En conjunto, las variables meteorológicas, tienen un impacto en la producción de biomasa.

Actividad Antiproliferativa de Extractos Etanólicos de *Asclepias subulata*

Siguiendo la metodología descrita previamente se realizaron los extractos etanólicos de *A. subulata*, de cada temporada, mes y tratamiento. Una vez listos, se procedió a realizar la evaluación antiproliferativa por el método de MTT, los extractos fueron evaluados en la línea celular cancerosa A549 y en la línea celular no cancerosa ARPE-19, el rango de concentraciones fue de 0.15 a 400.0 µg/mL. Se utilizó como control negativo DMSO (0.003-0.4%) el cual no mostró evidencia de daño celular a la máxima concentración evaluada y el control positivo fue doxorubicina (0.3-10 µM), un fármaco utilizado en quimioterapias. En la tabla IV se muestran los valores de concentración que reduce a la población celular al 50 % (IC₅₀) para los extractos del cultivo de otoño, mientras que, en la tabla V se muestran los IC₅₀ del cultivo de primavera.

En el cultivo de otoño se observa que los IC₅₀ más bajos están en los tratamientos de déficit hídrico, en los meses de abril a junio, los IC₅₀ ≤ 1.35 µg/mL en todos los tratamientos; después en julio empezó a aumentar la actividad de los extractos provenientes de déficit hídrico, siendo más bajas en los meses de diciembre a marzo con IC₅₀ ≤ 0.74 µg/mL. En ambos periodos, la precipitación fue escasa y en el primer caso, también está relacionado con la máxima demanda atmosférica para la vegetación (anexo 3). Por otro lado, los extractos de los tratamientos de riego, los más bajos ocurrieron en diciembre con IC₅₀ ≤ 0.89 µg/mL, también cuando la precipitación fue baja. Los resultados no muestran diferencias significativas entre tratamientos ni entre meses.

Tabla IV. Evaluación de actividad antiproliferativa en A549 de extractos etanólicos de *Asclepias subulata* trasplantada en otoño bajo estrés hídrico.

Tratamiento	IC ₅₀ µg /mL			
	Déficit hídrico	Déficit hídrico + Gel	Riego	Riego + Gel
Abril	1.20 ± 0.02	1.15 ± 0.05	0.92 ± 0.04	1.35 ± 0.02
Mayo	1.08 ± 0.03	0.99 ± 0.04	0.95 ± 0.01	0.95 ± 0.02
Junio	1.00 ± 0.04	0.72 ± 0.03	1.16 ± 0.03	1.05 ± 0.09
Julio	0.89 ± 0.01	0.82 ± 0.02	0.87 ± 0.04	0.85 ± 0.02
Agosto	0.77 ± 0.02	0.86 ± 0.04	0.77 ± 0.02	0.96 ± 0.04
Septiembre	0.98 ± 0.07	0.92 ± 0.07	1.06 ± 0.07	0.91 ± 0.02
Octubre	0.88 ± 0.02	0.88 ± 0.02	1.27 ± 0.04	0.86 ± 0.01
Noviembre	0.94 ± 0.05	0.78 ± 0.04	0.96 ± 0.03	0.89 ± 0.05
Diciembre	0.74 ± 0.07	0.71 ± 0.03	0.95 ± 0.01	0.93 ± 0.02
Enero	0.70 ± 0.02	0.76 ± 0.03	0.95 ± 0.05	0.89 ± 0.02
Febrero	0.66 ± 0.03	0.72 ± 0.04	1.09 ± 0.05	1.16 ± 0.02
Marzo	0.68 ± 0.01	0.70 ± 0.01	0.65 ± 0.01	0.89 ± 0.02
Promedio	0.87	0.83	0.96	0.97

Los resultados son expresados en promedio ± desviación estándar. No diferencias significativas, $p > 0.05$ (Kruskal Wallis), comparado con déficit hídrico, sin embargo, es significativo si comparamos con ARPE-19 IC₅₀ > 200 (µg/mL).

Tabla V. Evaluación de actividad antiproliferativa en A549 de extractos etanólicos de *Asclepias subulata* trasplantada en primavera bajo estrés hídrico.

Tratamiento	IC ₅₀ µg /mL					
	Déficit hídrico	Déficit hídrico + Gel	Déficit hídrico dh	Riego	Riego + Gel	Riego dh
Abril	1.00 ± 0.02	0.92 ± 0.01	1.24 ± 0.03	1.69 ± 0.06	1.50 ± 0.02	0.96 ± 0.02
Mayo	0.82 ± 0.24	0.65 ± 0.15	0.60 ± 0.09	0.70 ± 0.11	0.55 ± 0.10	0.52 ± 0.18
Junio	0.44 ± 0.03	0.57 ± 0.07	0.53 ± 0.04	0.66 ± 0.19	0.64 ± 0.08	0.45 ± 0.03
Julio	0.58 ± 0.07	0.50 ± 0.01	0.99 ± 0.03	0.54 ± 0.03	0.57 ± 0.02	0.88 ± 0.03
Agosto	0.88 ± 0.03	0.69 ± 0.04	0.88 ± 0.05	1.04 ± 0.03	1.10 ± 0.04	0.96 ± 0.02
Septiembre	0.99 ± 0.09	0.66 ± 0.06	0.56 ± 0.03	1.15 ± 0.09	0.79 ± 0.08	1.13 ± 0.12
Octubre	0.62 ± 0.13	0.51 ± 0.15	0.50 ± 0.14	0.55 ± 0.19	0.73 ± 0.36	0.71 ± 0.21
Noviembre	0.88 ± 0.02	0.88 ± 0.01	0.85 ± 0.04	0.83 ± 0.03	0.93 ± 0.02	0.89 ± 0.04
Diciembre	0.77 ± 0.06	0.54 ± 0.05	0.94 ± 0.06	1.00 ± 0.05	0.97 ± 0.03	0.99 ± 0.16
Enero	0.50 ± 0.03	0.45 ± 0.01	0.74 ± 0.08	0.61 ± 0.06	0.54 ± 0.07	0.60 ± 0.03
Febrero	0.51 ± 0.09	1.61 ± 0.09	0.91 ± 0.05	0.70 ± 0.13	0.88 ± 0.11	0.61 ± 0.13
Marzo	0.82 ± 0.02	0.65 ± 0.01	0.65 ± 0.09	0.62 ± 0.06	0.89 ± 0.05	0.72 ± 0.07
Promedio	0.73	0.71	0.78	0.84	.84	0.78

Los resultados son expresados en promedio ± desviación estándar. No diferencias significativas, $p > 0.05$ (Kruskal Wallis), comparado con déficit hídrico, sin embargo, es significativo si comparamos con ARPE-19 IC₅₀ > 200 (µg/mL) del cáncer para que un extracto sea considerado activo debe tener un IC₅₀ menor a 30 µg/mL (Suffness, 1990).

En el cultivo de primavera se observó un comportamiento similar al de otoño, donde tampoco se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ni entre meses. En los meses de junio a julio, se obtuvieron los IC₅₀ más bajos para todos los tratamientos, en los meses restantes los tratamientos con déficit hídrico fueron los más bajos con IC₅₀ ≤ 0.91 µg/mL.

Los extractos etanólicos de ambos cultivos mostraron alta actividad antiproliferativa con IC₅₀ ≤ 1.69 µg/mL en la línea celular A549. Estos valores son más altos que los reportados por Rascón y colaboradores (2015) con una IC₅₀ < 0.40 µg/mL para la misma línea celular; sin embargo, los valores reportados en este trabajo están en un buen rango de concentración, según el instituto nacional

A pesar de no tener diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, si se obtuvieron diferencias significativas (P < 0.05, Kruskal Wallis), con respecto a la línea celular no cancerosa ARPE-19 con IC₅₀ ≥ 200 µg/mL, cuando se evaluó con todos los extractos etanólicos. Este resultado es consistente con el reportado por Rascón y colaboradores (2015), donde se probó la actividad antiproliferativa de extractos metanólicos de *A. subulata* silvestre en la línea celular ARPE-19 (Rascon et al., 2015).

En la tabla VI, se muestran las actividades antiproliferativas de los extractos etanólicos de *A. subulata* trasplantada en otoño, donde se presentan los promedios de IC₅₀ en las líneas celulares A549 y ARPE-19, donde se puede observar que los promedios del cultivo de primavera tienen promedios más bajos que los de otoño, más no existen diferencias significativas. Este fenómeno puede deberse a que el cultivo de primavera se empezó a muestrear una vez pasada la fase de crecimiento exponencial, por lo cual el cultivo de primavera se encontraba más maduro y quizás con mayor contenido de cardenólidos que el cultivo de otoño.

Tabla VI. Promedios de IC₅₀ μM de los tratamientos en diferentes líneas celulares.

Línea celular	A549 (otoño)	A549 (primavera)	ARPE-19
Déficit hídrico	0.87	0.73	>200
Déficit hídrico + Gel	0.83	0.71	>200
Riego	0.96	0.78	>200
Riego + Gel	0.97	0.84	>200
Doxorrubicina	2.5 ± 1.4	-	1.8 ± 0.16

Cuantificación de Cardenólidos de Extractos Etanólicos de *Asclepias subulata*

Después de evaluar la actividad antiproliferativa de los extractos se procedió a realizar la cuantificación usando la técnica de HPLC, como se menciona en la metodología. En la figura 9 se puede observar un ejemplo representativo de una corrida por HPLC de uno de los extractos de déficit hídrico. En la corrida se pueden observar los picos de integración y los tiempos de retención (RT) de los cardenólidos, calotropina y corotoxigenina 3-O-glucopiranosido. Los picos de integración de cada extracto se procesaron para obtener su concentración por medio de curvas de calibración de los dos cardenólidos. Cabe mencionar que en los resultados por HPLC se muestran picos que posiblemente pertenecen a otros cardenólidos, por lo que es necesario estudiar los otros compuestos que posiblemente pueden tener una influencia en la actividad biológica de los extractos.

En las tablas VII y VIII se pueden observar las concentraciones de corotoxigenina 3-O-glucopiranosido y calotropina de los extractos etanólicos del cultivo de otoño. La concentración más alta de corotoxigenina 3-O-glucopiranosido fue de 530.1 µg/g en marzo, mientras que la más baja fue de 37.2 µg/g de materia seca en abril con déficit hídrico y con riego y gel respectivamente. Promediando todos los meses, los tratamientos de déficit hídrico, duplican la concentración de los tratamientos con riego. En cuanto a calotropina, sucede lo mismo, los tratamientos de déficit hídrico presentan ligeramente mayor concentración que los tratamientos de riego. La concentración más alta de calotropina fue de 176.7 µg/g en marzo más gel, en contraste la más baja fue de 45.2 µg/g de peso seco en abril, con déficit hídrico y riego y gel, respectivamente.

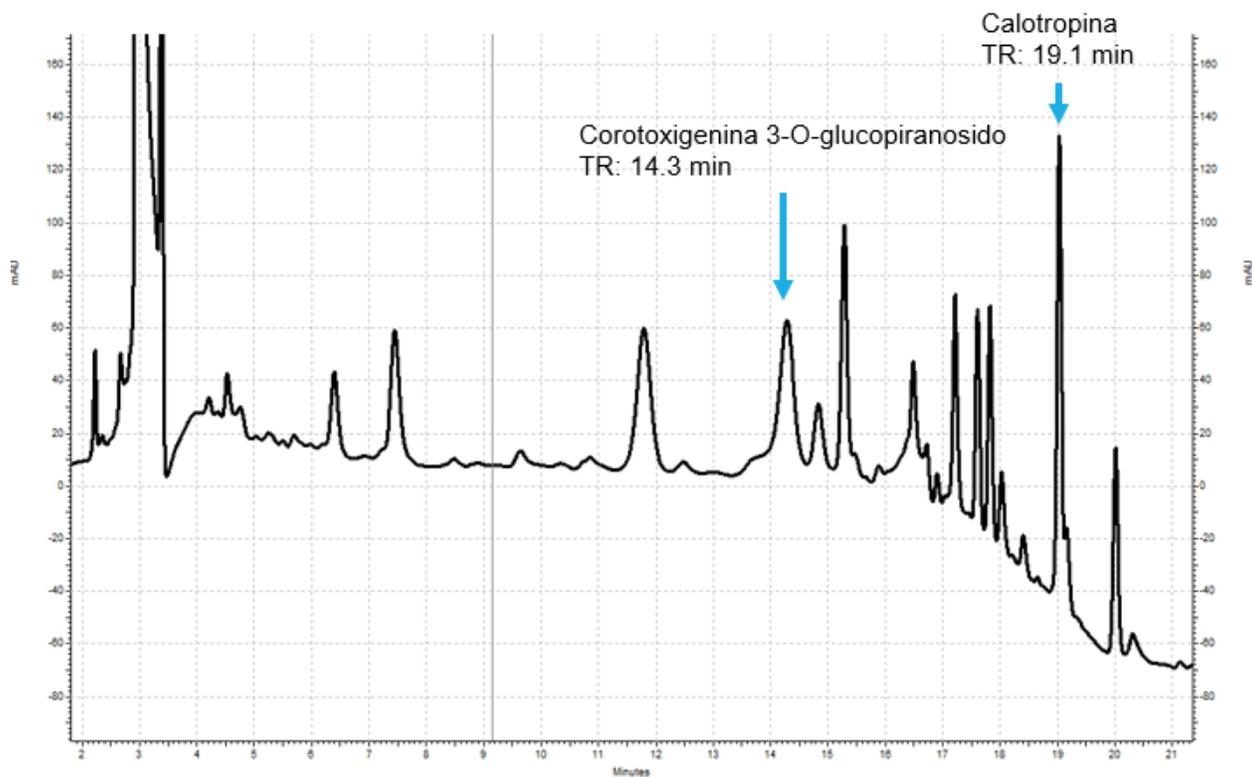


Figura 9. Espectro de HPLC de tratamiento de un extracto etanólico proveniente de déficit hídrico de *Asclepias subulata* trasplantada en otoño, señalando los tiempos de retención (RT) de corotoxigenina y calotropina a $\lambda = 220$ nm.

Tabla VII. Cuantificación Corotoxigenina 3-O-glucopiranososa de extractos etanólicos de *Asclepias subulata* trasplantada en otoño bajo estrés hídrico.

Tratamiento	µg / g			
	Déficit hídrico	Déficit hídrico + Gel	Riego	Riego + Gel
Abril	123.0 ± 6	68.7 ± 2.4	204.1 ± 1.1	37.2 ± 0.4
Mayo	93.5 ± 4	124.7 ± 7.1	204.9 ± 9.4	141.7 ± 6.1
Junio	169.1 ± 15	349.6 ± 4.7	67.1 ± 1.7	309.9 ± 0.1
Julio	94.9 ± 0.8	88.7 ± 4.1	63.0 ± 1.3	43.3 ± 0.2
Agosto	15.9 ± 0.5	134.2 ± 0.1	183.9 ± 0.3	32.7 ± 1.4
Septiembre	415.5 ± 44	83.6 ± 1.1	27.5 ± 0.7	82.2 ± 2.8
Octubre	218.8 ± 11	497.2 ± 13	88.4 ± 6.8	49.6 ± 0.4
Noviembre	187.6 ± 5	416.0 ± 0.6	195.9 ± 9.2	177.1 ± 3.8
Diciembre	230.59 ± 54	214.2 ± 6	227.6 ± 2.3	76.0 ± 5.8
Enero	491.86 ± 1.8	275.9 ± 3	69.4 ± 0.2	212.7 ± 3.8
Febrero	183.3 ± 19	381 ± 67	217.6 ± 23	124.9 ± 8.3
Marzo	530.1 ± 69	485.5 ± 70	138.9 ± 5.4	166.6 ± 0.7
promedio	229.51	259.94	140.69	121.15

Los resultados son expresados en promedio ± desviación estándar. No diferencias significativas, $p > 0.05$ (Kruskal Wallis), comparado déficit con riego.

Tabla VIII. Cuantificación Calotropina de extractos etanólicos de *Asclepias subulata* trasplantada en otoño bajo estrés hídrico.

µg / g				
Tratamiento	Déficit hídrico	Déficit hídrico + Gel	Riego	Riego + Gel
Abril	58.8 ± 0.4	61.9 ± 1.4	82.5 ± 2.5	45.2 ± 2.8
Mayo	104.3 ± 8.6	61.9 ± 1.4	82.5 ± 2.5	45.2 ± 2.8
Junio	79.6 ± 3.1	118.6 ± 4.9	58.1 ± 2.0	87.8 ± 1.0
Julio	129.3 ± 2.1	70.2 ± 1.8	85.9 ± 2.8	59.7 ± 2.3
Agosto	91.6 ± 1.0	75.8 ± 4.6	102.3 ± 8.3	86.4 ± 5.7
Septiembre	75.0 ± 18.3	80.7 ± 1.9	70.9 ± 5.2	92.4 ± 3.6
Octubre	92.8 ± 1.2	150.0 ± 7.3	102.0 ± 3.2	63.3 ± 1.4
Noviembre	66.3 ± 0.72	90.8 ± 1.7	58.9 ± 0.1	50.7 ± 1.9
Diciembre	142.8 ± 1.9	74.1 ± 8.2	156.3 ± 0.2	110.2 ± 6.0
Enero	103.1 ± 3.5	101.4 ± 5.2	59.6 ± 0.5	84.3 ± 1.9
Febrero	126.0 ± 11	153.7 ± 22	100.4 ± 1.4	76.5 ± 2.8
Marzo	67.4 ± 5.8	176.7 ± 16	85.1 ± 7.6	118.6 ± 2.9
promedio	94.75	101.31	87.04	76.69

Los resultados son expresados en promedio ± desviación estándar. No diferencias significativas, $p > 0.05$ (Kruskal Wallis), comparado déficit con riego.

Comparando las concentraciones, en general la corotoxigenina 3-O-glucopiranosido se encuentra en mayor concentración de la calotropina. En la figura 10 se muestra la relación de ambos cardenólidos, se puede apreciar una $R^2 = 0.19$, lo cual indica que la correlación entre estos cardenólidos es muy baja. Los resultados indican que posiblemente exista una relación entre los cardenólidos, en varios casos, cuando aumenta la corotoxigenina también lo hace la calotropina. Lo anterior tiene sentido debido a que son compuestos de naturaleza similar y deben estar conectados en el metabolismo.

Siguiendo con el cultivo de primavera, las concentraciones de los dos cardenólidos se encuentran en la tabla IX para corotoxigenina 3-O-glucopiranosido y en la tabla X para calotropina. La concentración más alta de corotoxigenina 3-O-glucopiranosido fue de 454.25 $\mu\text{g/g}$ (dw) en enero con riego y gel, en contraste la más baja fue de 5.07 $\mu\text{g/g}$ (dw) en agosto con riego y doble hilera. La concentración más alta de calotropina fue de 236.97 $\mu\text{g/g}$ (dw) en enero con riego, en contraste la más baja fue de 36.02 $\mu\text{g/g}$ (dw) en julio en el mismo tratamiento de riego. Al igual que el cultivo de otoño, la corotoxigenina se encuentra en mayor concentración de la calotropina. En la figura 11 se muestra la correlación de ambos cardenólidos, se puede apreciar una $R^2 = 0.28$, donde la correlación entre estos cardenólidos es mayor a la de otoño, quizás es debido a una mayor estabilidad en el metabolismo por mayor tiempo de cultivo.

En general, ambos cardenólidos mostraron mayor concentración en los tratamientos de déficit hídrico que en los de riego. Sin embargo, estos resultados pueden estar influenciados por otros factores que tienen un efecto en la producción de cardenólidos, como estrés biótico, producido por insectos que, al interactuar con la planta, estimulan la producción de cardenólidos como defensa química. Agrawal y col. (2014a), encontraron incrementos en la producción de cardenólidos en *A. sicaria* y *A. hali*, cuando eran estimulados por daño provocado por gusanos de la mariposa monarca (Agrawal y col., 2014a).

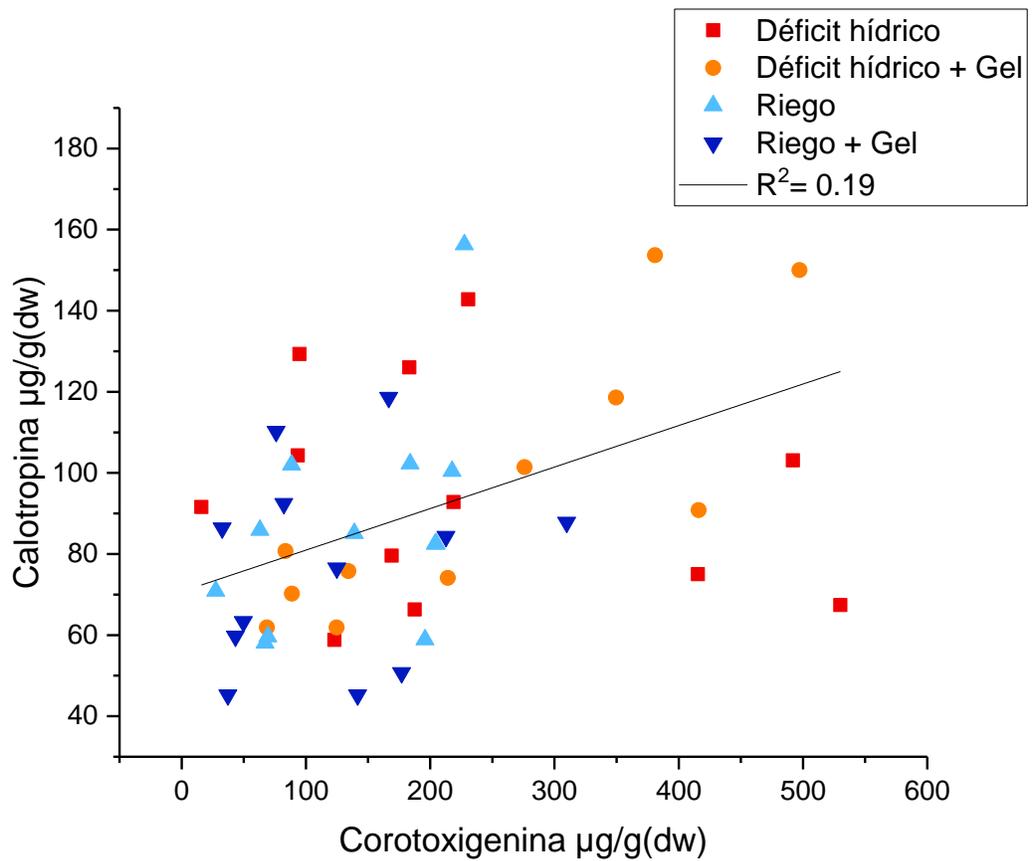


Figura 10. Correlación de calotropina y corotoxigenina de extractos etanólicos de *Asclepias subulata* trasplantada en primavera.

Tabla IX. Cuantificación Corotoxigenina 3-O-glucopiranososa de extractos etanólicos de *Asclepias subulata* trasplantada en primavera bajo estrés hídrico.

Tratamiento	µg/g					
	Déficit hídrico	Déficit hídrico + Gel	Déficit hídrico dh	Riego	Riego + Gel	Riego dh
Abril	192.56 ± 5	175.94 ± 53	248.04 ± 12	80.0 ± 6.3	38.68 ± 1.9	35.39 ± 3.3
Mayo	381.72 ± 2	135.48 ± 11	113.18 ± 1.4	92.12 ± 13	21.85 ± 3.3	106.24 ± 1.7
Junio	212.86 ± 6	224.24 ± 28	117.27 ± 17	174.29 ± 41	124.92 ± 40	379.09 ± 14
Julio	61.03 ± 8	82.42 ± 8.3	121.91 ± 34	71.52 ± 21.	51.83 ± 0.7	9.04 ± 0.5
Agosto	15.95 ± 0.5	29.31 ± 0.2	87.99 ± 10	24.71 ± 2.6	11.89 ± 2.5	5.07 ± 0.2
Septiembre	63.59 ± 7	231.25 ± 42	325.64 ± 17	76.5 ± 10.5	71.86 ± 1.1	65.34 ± 26
Octubre	147.28 ± 1	109.21 ± 3.6	111.3 ± 5.7	62.45 ± 4	39.99 ± 2.2	52.01 ± 5.1
Noviembre	57.93 ± 4	51.93 ± 0.7	18.0 ± 0.3	39.55 ± 2.8	160.87 ± 7.1	133.35 ± 9.4
Diciembre	296.71 ± 2	35.72 ± 1.4	166.23 ± 3.5	254.09 ± 14	71.59 ± 13	49.47 ± 11
Enero	398.46 ± 22	394.11 ± 23	323.05 ± 4.5	270.53 ± 2	454.23 ± 35	18.11 ± 0.1
Febrero	99.02 ± 32	84.02 ± 5.5	168.38 ± 11	62.83 ± 3.1	74.17 ± 9.5	74.54 ± 0.6
Marzo	135.13 ± 69	163.39 ± 1.3	237.08 ± 39	208.44 ± 8	249.9 ± 1.1	81.02 ± 13
promedio	171.85	143.08	169.83	115.58	114.315	84.055

Los resultados son expresados en promedio ± desviación estándar. No diferencias significativas, $p > 0.05$ (Kruskal Wallis), comparado déficit con riego.

Tabla X. Cuantificación Calotropina de extractos etanólicos de *Asclepias subulata* trasplantada en primavera bajo estrés hídrico.

Tratamiento	µg / g					
	Déficit hídrico	Déficit hídrico + Gel	Déficit hídrico dh	Riego	Riego + Gel	Riego dh
Abril	113.88 ± 10	164.35 ± 14	171.02 ± 5.9	55.85 ± 1.0	62.92 ± 4.8	61.71 ± 2.6
Mayo	199.11 ± 35	120.40 ± 6.9	145.53 ± 7.8	60.38 ± 3.8	64.20 ± 7.9	115.31 ± 17
Junio	203.94 ± 34	107.65 ± 8.2	112.71 ± 15	127.21 ± 25	131.6 ± 1.3	81.21 ± 6.6
Julio	80.82 ± 6	117.72 ± 6.6	83.98 ± 2.0	36.02 ± 3.6	112.9 ± 8.9	47.56 ± 0.7
Agosto	137.54 ± 1.5	117.94 ± 1.7	210.11 ± 22	38.9 ± 2	83.57 ± 10	72.61 ± 4.5
Septiembre	140.92 ± 2.8	110.06 ± 6.6	134.90 ± 14	85.02 ± 17	125.93 ± 8.0	92.97 ± 2.8
Octubre	191.33 ± 23	103.56 ± 18	97.81 ± 16	114.22 ± 18	69.20 ± 6.7	64.4 ± 2.5
Noviembre	132.76 ± 8.5	91.9 ± 6.5	125.08 ± 14	51.56 ± 7.3	88.47 ± 6.7	97.80 ± 5.1
Diciembre	143.88 ± 1.6	139.79 ± 12	150.74 ± 1.0	82.43 ± 13	120.11 ± 13	107.6 ± 14
Enero	169.28 ± 1.0	170.42 ± 14	119.44 ± 4.3	236.97 ± 31	215.48 ± 23	121.81 ± 19
Febrero	49.94 ± 4.9	47 ± 1.1	73.54 ± 2.6	36.12 ± 2.6	60.9 ± 7.1	41.17 ± 1.6
Marzo	86.03 ± 8.3	87.63 ± 0.7	130.54 ± 14	127.66 ± 11	172.96 ± 11	69.08 ± 2
promedio	137.45	114.86	129.61	87.69	109.02	81.10

Los resultados son expresados en promedio ± desviación estándar. No diferencias significativas, $p > 0.05$ (Kruskal Wallis), comparado déficit con riego.

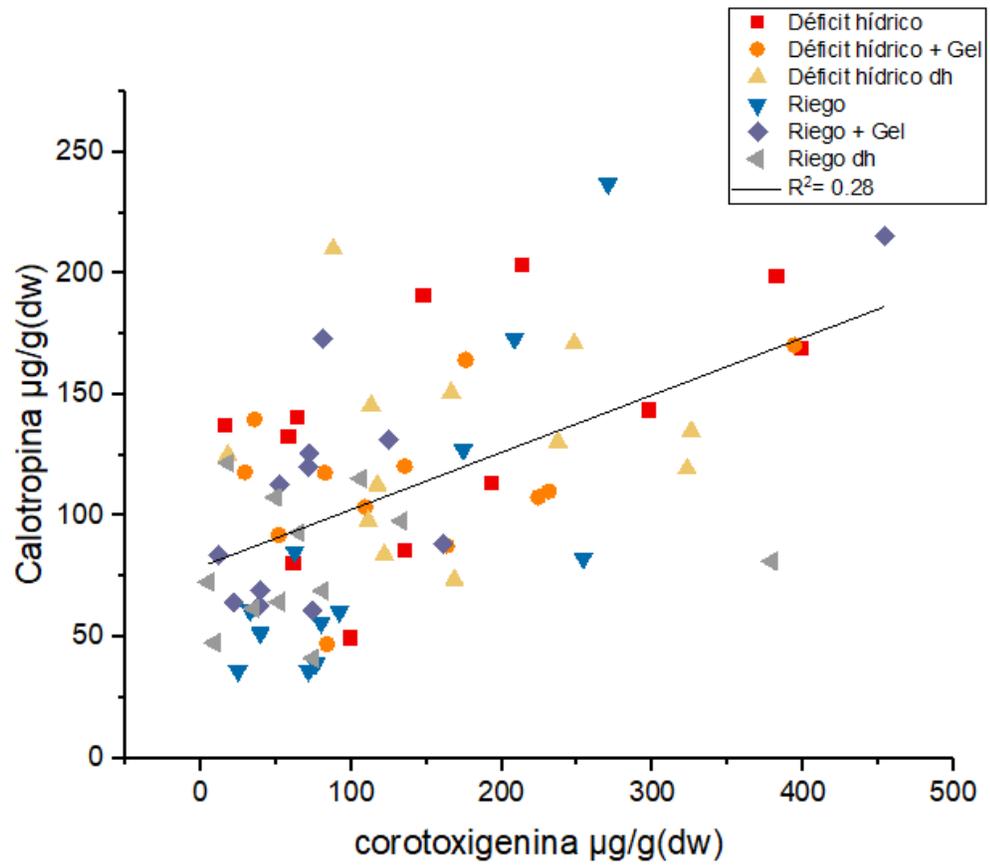


Figura 11. Correlación de calotropina y corotoxigenina de extractos etanólicos de *Asclepias subulata* trasplantada en otoño.

Además, existen otros factores que pudieran influir en la producción de cardenólidos, tales como, la edad, los nutrientes del suelo, luz, temperatura y microclima.

Correlación entre Biomasa, Cardenólidos y Actividad Antiproliferativa

Usando los resultados del cultivo de otoño se muestra en la figura 12, una gráfica de correlación entre corotoxigenina 3-O-glucopiranosido y biomasa aérea y en la figura 13 con calotropina y biomasa aérea. En ninguna de las dos graficas existe una correlación, es decir, las dos variables son independientes una de la otra. Sin embargo, se puede observar que las plantas con mayor concentración de corotoxigenina 3-O-glucopiranosido son aquellas con menor biomasa (Déficit hídrico), contrariamente las que tienen mayor biomasa (Riego) son las que contienen menor concentración de corotoxigenina. Este comportamiento se repite en calotropina contra biomasa aérea. En la figura 14 y 15 se muestran graficas de actividad antiproliferativa contra corotoxigenina y antiproliferativa vs calotropina, se puede observar una correlación lineal con $R^2 = 0.17$ para corotoxigenina y para calotropina una $R^2 = 0.19$, ambas correlaciones son bajas, sin embargo, existe una dependencia de la concentración de cardenólidos y su actividad antiproliferativa. En cuanto al cultivo de primavera, en las figuras 16 y 17, se muestra el mismo comportamiento que el cultivo de otoño. En las figuras 18 y 19, la correlación entre biomasa contra cardenólidos es más alta y la correlación de cardenólidos contra actividad antiproliferativa es más baja. Estos resultados refuerzan que las variables que manejamos son muy importantes y dependientes de la actividad antiproliferativa.

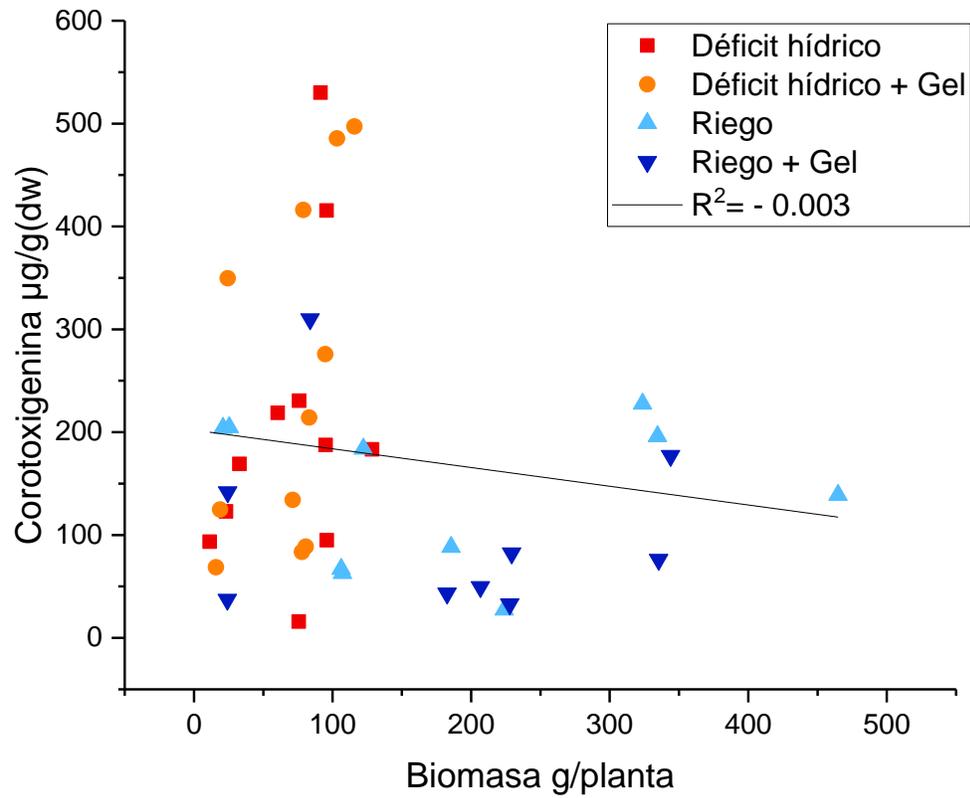


Figura 12. Correlación de corotoxigenina y biomasa de extractos etanólicos de *Asclepias subulata* trasplantada en otoño.

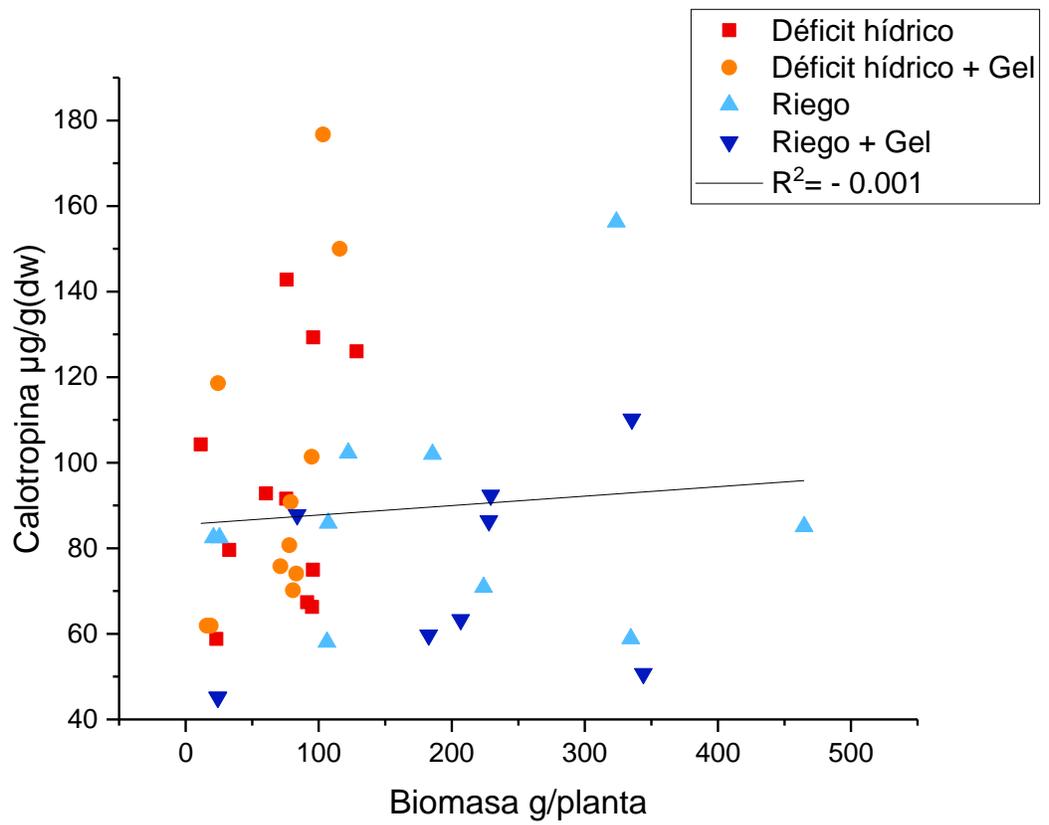


Figura 13. Correlación de calotropina y biomasa de extractos etanólicos de *Asclepias subulata* trasplantada en otoño.

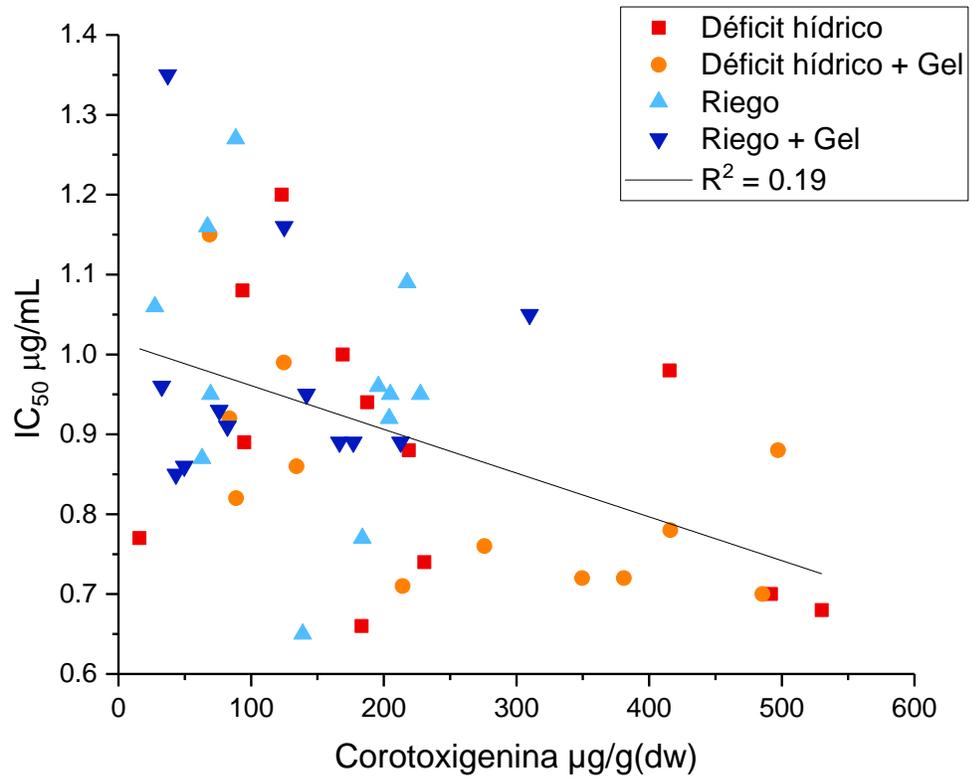


Figura 14. Correlación de actividad antiproliferativa y corotoxigenina de extractos etanólicos de *Asclepias subulata* trasplantada en otoño.

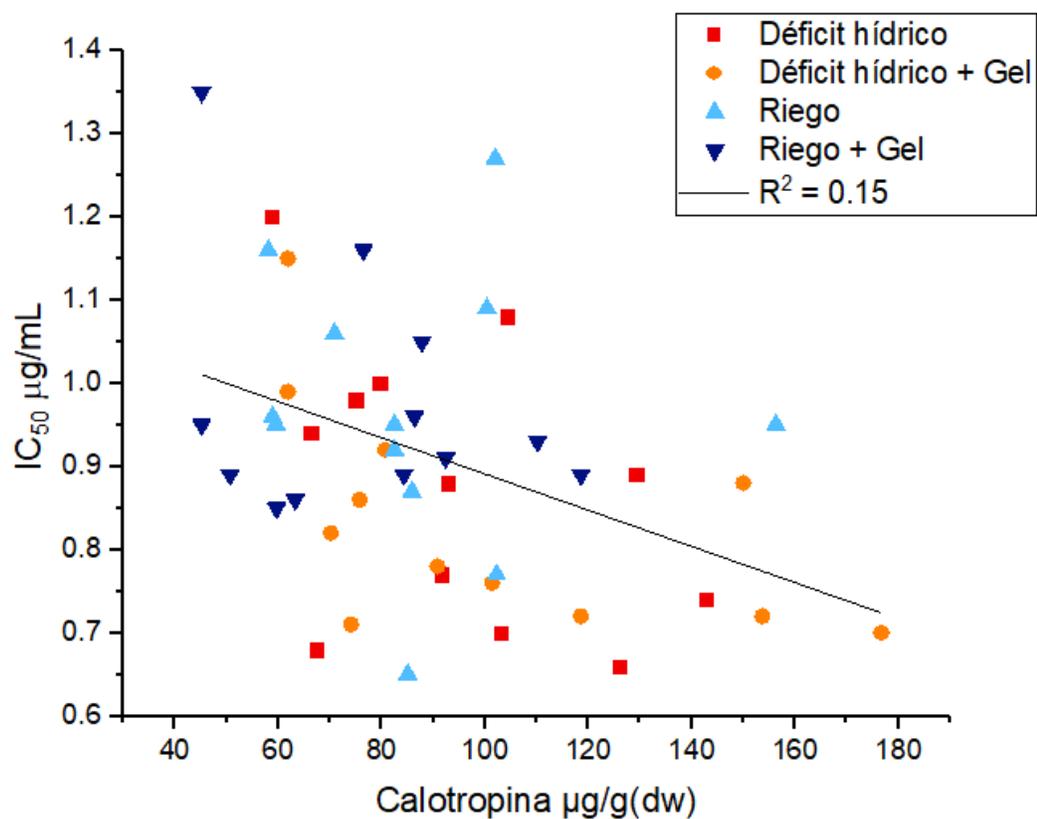


Figura 15. Correlación de actividad antiproliferativa y calotropina de extractos etanólicos de *Asclepias subulata* trasplantada en otoño.

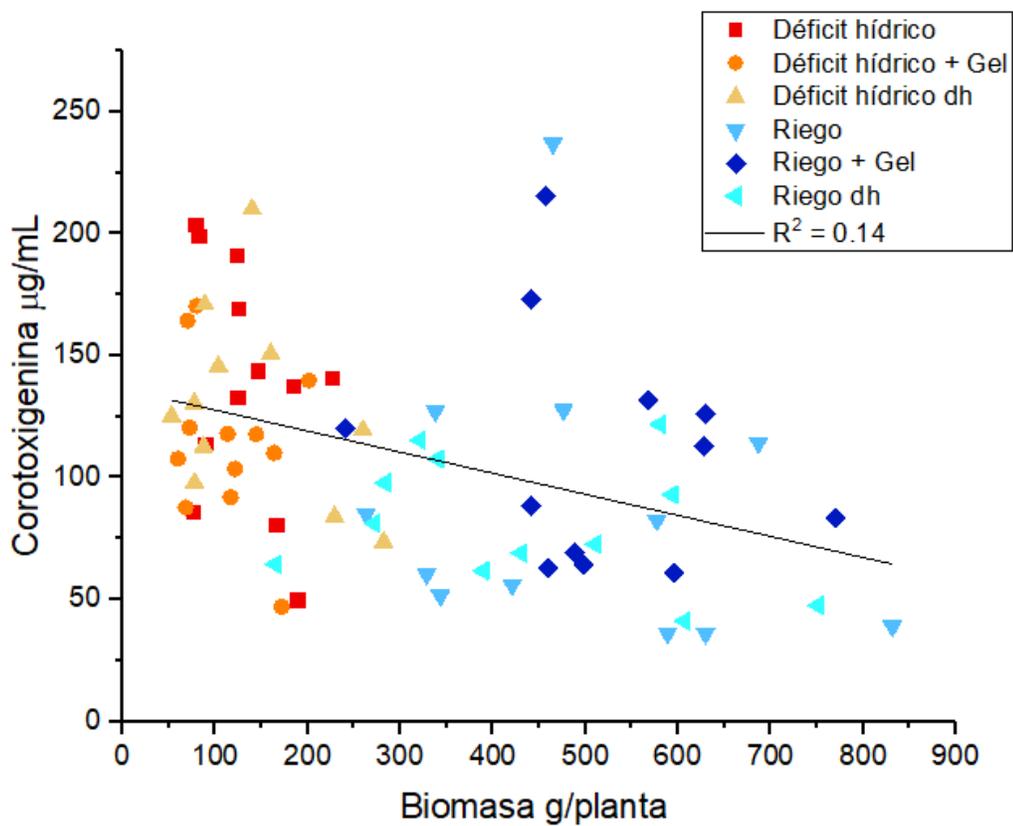


Figura 16. Correlación de corotoxigenina y biomasa de extractos etanólicos de *Asclepias subulata* trasplantada en primavera.

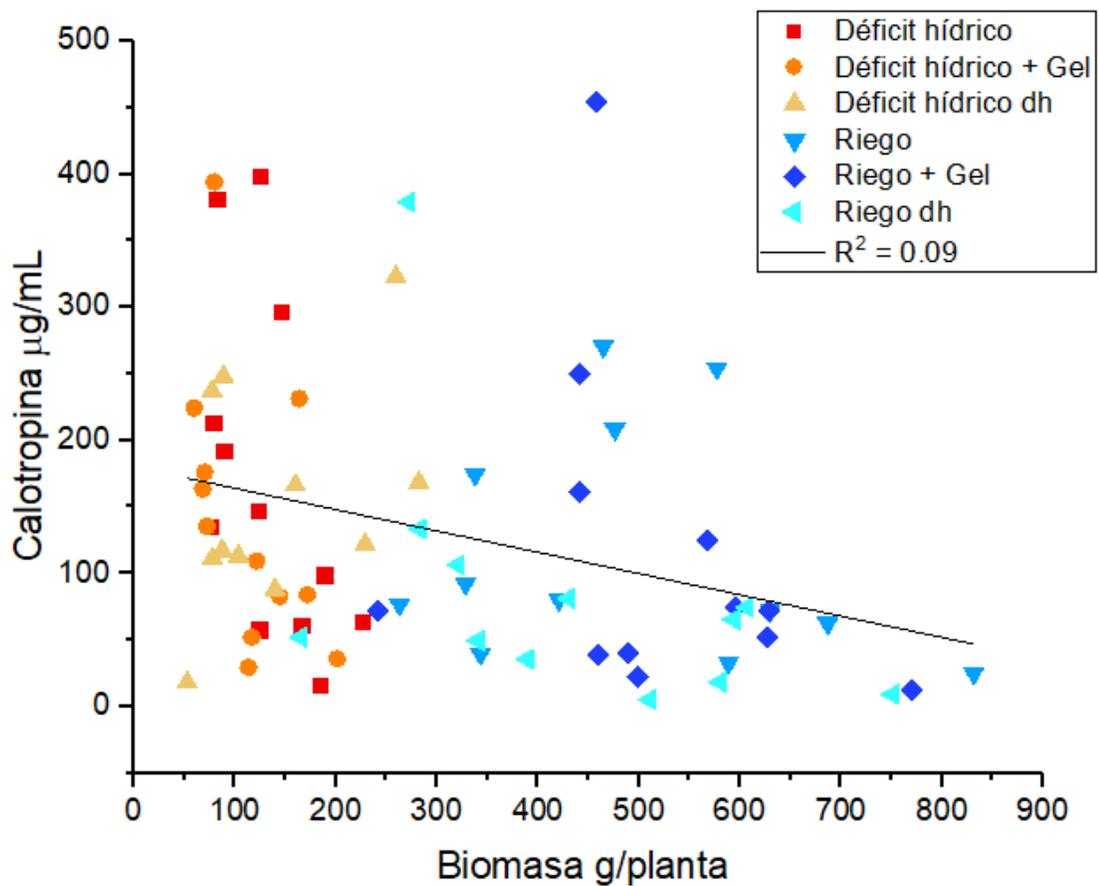


Figura 17. Correlación de calotropina y biomasa de extractos etanólicos de *Asclepias subulata* trasplantada en primavera.

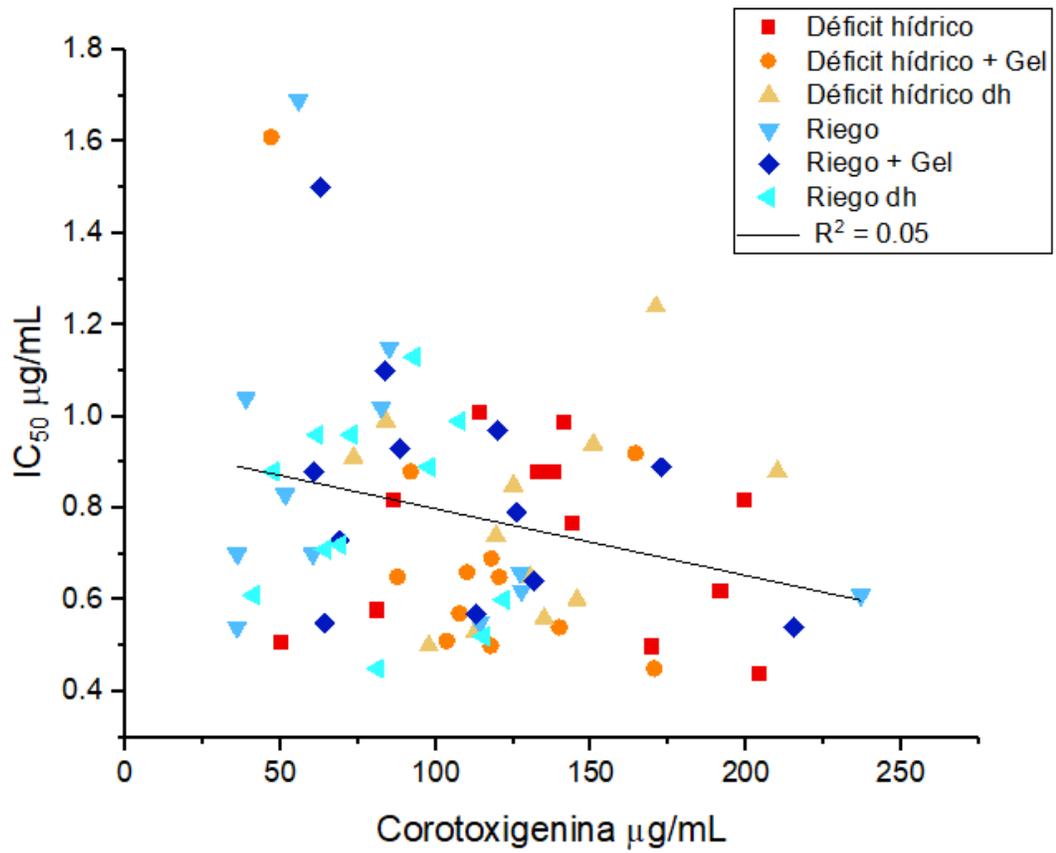


Figura 18. Correlación de actividad antiproliferativa y corotoxigenina de extractos etanólicos de *Asclepias subulata* trasplantada en primavera.

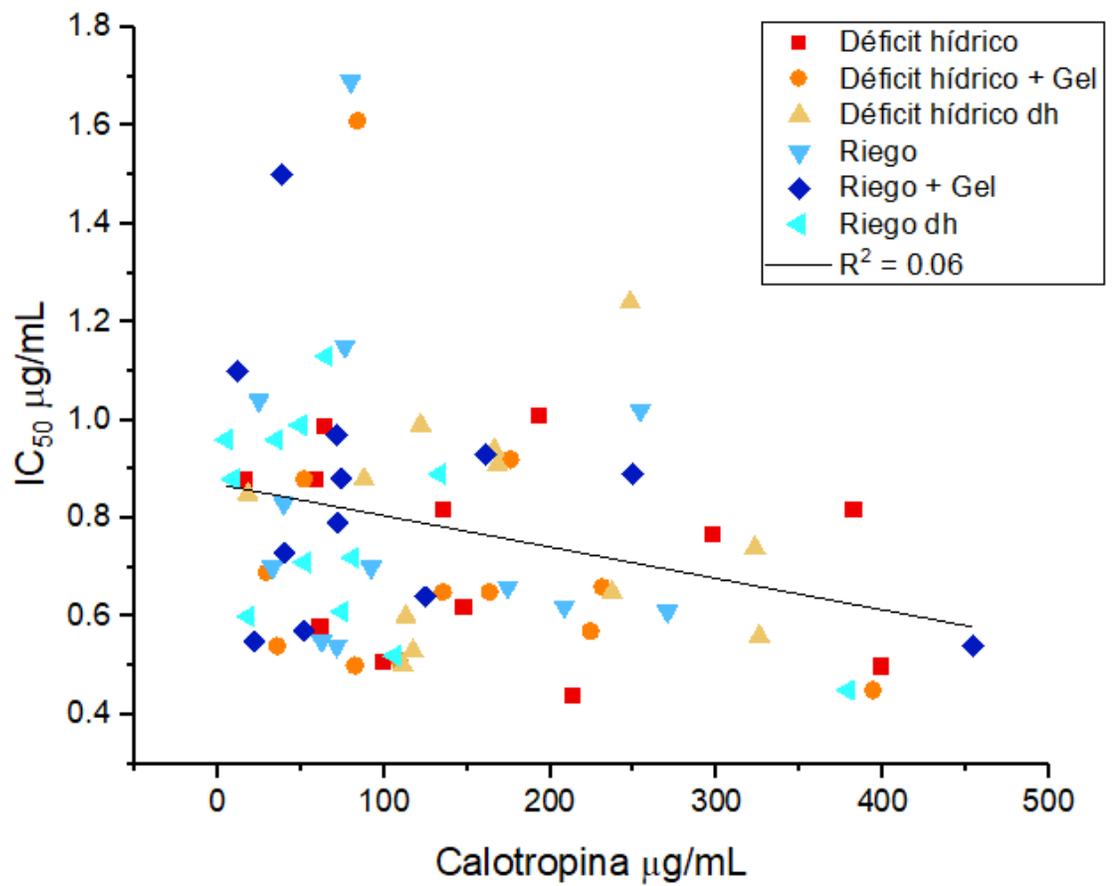


Figura 19. Correlación de actividad antiproliferativa y calotropina de extractos etanólicos de *Asclepias subulata* trasplantada en primavera.

Rascón y colaboradores (2016), demostraron que los responsables de la actividad antiproliferativa de los extractos etanólicos de *A. subulata* son los cardenólidos, en especial calotropina y corotoxigenina. Siendo más activa calotropina con una $IC_{50} = 0.0013 \mu\text{M/mL}$ y para corotoxigenina una $IC_{50} = 2.64 \mu\text{M/mL}$ en la línea celular A549, por lo cual tiene sentido que exista una mayor correlación entre calotropina y actividad antiproliferativa. Al manejar extractos se tiene una matriz compleja, no solo de cardenólidos, sino también otras moléculas que pudieran ejercer una función aditiva para potenciar una mayor actividad antiproliferativa o antagonista contra la misma actividad. Por lo anterior dicho, es necesario hacer más estudios sobre las otras moléculas que pudieran ejercer un efecto en la actividad biológica (Rascon et al., 2016b).

Estos fenómenos tienen una explicación bioquímica, el efecto de estrés por sequía, (déficit hídrico), frecuentemente aumenta la concentración de metabolitos secundarios en plantas medicinales; sin embargo, se tiene que considerar que el déficit hídrico también reduce la biomasa y el crecimiento de la planta. Lo anterior, tiene una explicación, podría ser que las plantas cultivadas con riego producen la misma cantidad de metabolitos secundarios, sin embargo, cuando su biomasa se reduce, aumenta la concentración de metabolitos secundarios. Bajo condiciones estándar, la concentración atmosférica de CO_2 es la limitante de la fotosíntesis, los niveles de NADPH+H y ATP están más disponibles para ser consumidas en el ciclo de Calvin para la fijación y reducción de CO_2 . En esta situación de exceso de equivalentes de reducción, los NADP^+ se transformarán a NADPH+H ; como resultado, los electrones de la cadena transportadora de electrones no podrán ser transferidos a equivalentes reductivos. En consecuencia, los electrones serán transferidos al oxígeno, generando radicales superóxidos, de los cuales la planta se protege a través de una maquinaria de detoxificación, con la expresión genética de enzimas protectoras como el superóxido mutasa y la ascorbato peroxidasa (enzimas que transforman

los peróxidos en agua). Durante condiciones de estrés se puede deducir que la razón de NADPH+H a NADP+ es elevada, consecuentemente, la tasa de síntesis de metabolitos secundarios altamente reducidos debe incrementarse (Al-Gabbiesh et al., 2015). El efecto anterior se puede mitigar con la aplicación de CO₂, Sruhlfauth y colaboradores (1987) utilizaron un enriquecimiento de CO₂, seguido de déficit hídrico, en *Digitalis lanata*, observaron un incremento y diversidad en cardenólidos (Stuhlfauth et al., 1987). Se necesitan más estudios para concluir el mecanismo de acción en la producción de cardenólidos. Sin embargo, todos los resultados apuntan que el tratamiento por déficit hídrico fue el que potenció mayormente la producción de cardenólidos y por ende la actividad antiproliferativa.

CONCLUSIONES

- A. Se establecieron las condiciones de cultivo de *A. subulata*.
- B. El tratamiento de riego produce una mayor biomasa en *A. subulata* que el déficit hídrico.
- C. Los tratamientos de déficit hídrico incrementaron los cardenólidos (corotoxigenina y calotropina) en *A. subulata*, comparando con los tratados con riego. De igual manera, se necesita investigar otros factores que aumentan la concentración y variedad de cardenólidos, como el estrés biótico.
- D. La actividad antiproliferativa es más alta cuanto existen mayores concentraciones de cardenólidos en el extracto etanólico, lo cual sucedió notoriamente en los tratamientos de déficit hídrico. Sin embargo, se necesita estudiar otras posibles moléculas que pudieran tener un efecto antagonista o sinergista en la actividad biológica, además de estudiar los efectos en otras líneas celulares, como una línea celular no cancerosa de pulmón.
- E. Los cardenólidos de ambos cultivos se producen durante todo el año, con concentraciones suficientes para una alta actividad antiproliferativa, por lo tanto, puede ser cultivada por lo menos en dos temporadas y colectada en cualquier mes, sin cambiar drásticamente la actividad biológica de los extractos.

BIBLIOGRÁFIA

- Agrawal, A.A., Hastings, A.P., Patrick, E.T., Knight, A.C., 2014a. Specificity of herbivore-induced hormonal signaling and defensive traits in five closely related milkweeds (*Asclepias* spp.). *Journal of chemical ecology* 40, 717-729.
- Agrawal, A.A., Patrick, E.T., Hastings, A.P., 2014b. Tests of the coupled expression of latex and cardenolide plant defense in common milkweed (*Asclepias syriaca*). *Ecosphere* 5, 1-11.
- Akula, R., Ravishankar, G.A., 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior* 6, 1720-1731.
- Al-Gabbiesh, A., Kleinwächter, M., Selmar, D., 2015. Influencing the contents of secondary metabolites in spice and medicinal plants by deliberately applying drought stress during their cultivation. *Jordan J Biol Sci* 8, 1-10.
- Araiza, L., Nidia, Araiza Lizarde, E., Martínez Martínez, J.G., 2011. Evaluation of germination and seedling Growth of Chiltepín (*Capsicum annum* L variedad *glabriusculum*) greenhouse. *Revista Colombiana de Biotecnología* 13, 170-175.
- Bauer, R., 1998. Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: Can acceptable drug standards be achieved? *Drug Information Journal* 32, 101-110.
- Bayala, B., Bassole, I.H.N., Gnoula, C., Nebie, R., Yonli, A., Morel, L., Figueredo, G., Nikiema, J.-B., Lobaccaro, J.-M.A., Simpore, J., 2014. Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of essential oils of plants from Burkina Faso. *PloS one* 9, e92122.
- Estudillo, R.L., García, A.H., 1988. Catálogo de plantas medicinales sonorenses. Universidad de Sonora.
- Fernández, B., Ana Mercedes, Juárez Jaimes, V., Cortés Zárraga, L., 2008. Usos de las especies del género *Asclepias* L.(Apocynaceae, Asclepiadoideae),

- información del Herbario Nacional de México, MEXU, Polibotánica, pp. 155-171.
- Garza-Juárez, A.d.J., Pérez Meseguer, J., Salazar Aranda, R., Salazar Cavazos, M.d.I.L., Waksman de Torres, N., 2010. Desarrollo y validación de métodos analíticos para estandarización de fitofármacos con *Turnera diffusa* (damiana). *Ciencia UANL* 18.
- González, M.L., Caycedo, C., Velásquez, M.F., Flórez, V., 2007. Efecto de la aplicación del ácido giberélico sobre el crecimiento del coliflor (*Brassica oleraceae* L.) var. *Botrytis* DC. *Agronomía Colombiana* 25, 54-61.
- Gupta, R., Chakrabarty, S., 2013. Gibberellic acid in plant: still a mystery unresolved. *Plant signaling & behavior* 8, e25504.
- Jones, H.G., 2013. *Plants and microclimate: a quantitative approach to environmental plant physiology*. Cambridge university press.
- Lambers, H., 2008. *Plant physiological ecology / Hans Lambers, F. Stuart Chapin III, Thijs L. Pons*. Springer, New York.
- Larcher, W., 2003. *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer Science & Business Media.
- López, E., Jesús, Huez-López, M.A., Rueda-Puente, E.O., Jiménez-León, J., Rodríguez, J.C., Romero-Espinoza, L.K., Dávila-Carrera, F.X., 2013a. Evaluación de un polímero hidrófilo en chile anaheim (*Capsicum annum* L.) cultivado en invernadero. *Terra Latinoamericana* 31, 115-118.
- López, E., Jesús, Huez, L., Antonio, M., Rueda, P., Omar, E., Jiménez, L., Cruz, B., Garrido, L., 2013b. Uso de un polímero hidrófilo en chile Anaheim (*Capsicum annum* L.) bajo condiciones de invernadero, *Idesia (Arica)*, pp. 77-81.
- López, E., Jesús, Jiménez-León, J., Huez-López, M.A., Dávila-Loreto, J.A., Ávila-Machado, E., Robles-Zepeda, R.E., 2017. Germinación De Semillas De *Asclepias Subulata* En Condiciones De Casa Sombra Utilizando Ácido Giberélico, *European Scientific Journal, ESJ*.

- Manukyan, A., 2011. Effect of growing factors on productivity and quality of lemon catmint, lemon balm and sage under soilless greenhouse production: I. drought stress. *Med Aromatic Plant Sci Biotechnol* 5, 119-125.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65, 55-63.
- Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., Capaccioli, S., 2009. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological research* 59, 365-378.
- Oegema, T., Fletcher, R., 1972. Factors that influence dormancy in milkweed seeds. *Canadian Journal of Botany* 50, 713-718.
- Peinado, M., Alcaraz, F., Aguirre, J., Delgadillo, J., 1995. Major plant communities of warm North American deserts. *Journal of Vegetation Science* 6, 79-94.
- Picard, N., Saint-André, L., Henry, M., 2012. Manual de construcción de ecuaciones alométricas para estimar el volumen y la biomasa de los árboles: del trabajo de campo a la predicción.
- Preuss, H.G., Bagchi, D., 2004. *Phytopharmaceuticals in cancer chemoprevention*. CRC press.
- Rascon, V., L. A., Jimenez Estrada, M., Velazquez Contreras, C.A., Garibay Escobar, A., Medina Juarez, L.A., Gamez Meza, N., Robles Zepeda, R.E., 2015. Antiproliferative and apoptotic activities of extracts of *Asclepias subulata*. *Pharm Biol* 53, 1741-1751.
- Rascon, V., LA, Velazquez, C., Garibay-Escobar, A., Vilegas, W., Medina-Juárez, L., Gamez-Meza, N., Robles-Zepeda, R., 2016a. Apoptotic activities of cardenolide glycosides from *Asclepias subulata*. *Journal of ethnopharmacology* 193, 303-311.
- Rascon, V., LA, Velazquez, C., Garibay-Escobar, A., Vilegas, W., Medina-Juárez, L., Gamez-Meza, N., Robles-Zepeda, R., 2016b. Apoptotic activities of

- cardenolide glycosides from *Asclepias subulata*, *Journal of ethnopharmacology*, pp. 303-311.
- Reid, N., Stafford, S.D., Beyer-Miinzel, P., Marroquín, J., 1990. Floristic and structural variation in the Tamaulipan thornscrub, northeastern Mexico. *Journal of Vegetation Science* 1, 529-538.
- Rejeb, I.B., Pastor, V., Mauch-Mani, B., 2014. Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. *Plants* 3, 458-475.
- ROȘU, A., Danaila-Guidea, S., DOBRINOIU, R., Toma, F., ROȘU, D.T., Sava, N., Manolache, C., 2011. *Asclepias syriaca* L.—an underexploited industrial crop for energy and chemical feedstock. *Romanian Biotechnological Letters* 16.
- Selmar, D., Kleinwächter, M., 2013. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Industrial Crops and Products* 42, 558-566.
- Sepúlveda, J., Gabriela, Porta Ducoing, H., Rocha Sosa, M., 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología* 21.
- Stuhlfauth, T., Klug, K., Fock, H.P., 1987. The production of secondary metabolites by *Digitalis lanata* during CO₂ enrichment and water stress. *Phytochemistry* 26, 2735-2739.
- Suffness, M., 1990. Assays related to cancer drug discovery. *Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity* 6, 71-133.
- Tagne, R.S., Telefo, B.P., Nyemb, J.N., Yemele, D.M., Njina, S.N., Goka, S.M.C., Lienou, L.L., Kamdje, A.H.N., Moundipa, P.F., Farooq, A.D., 2014. Anticancer and antioxidant activities of methanol extracts and fractions of some Cameroonian medicinal plants. *Asian Pacific journal of tropical medicine* 7, S442-S447.

- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A., 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* 65, 87-108.
- Villa, R., N, Pacheco-Hernández, Y., Lara-Zaragoza, E., Franco-Monsreal, E., Montserrat, I., Galván-Valencia, O., Ruiz-Gómez, L., 2011. Biotecnología de plantas medicinales: generando fármacos de un futuro tornado presente, *Temas deficiencia y tecnología*, pp. 13-20.
- Wetzler, M., Segal, D., 2011. Omacetaxine as an anticancer therapeutic: what is old is new again. *Current pharmaceutical design* 17, 59-64.
- WHO, 2003. WHO guidelines on good agricultural and collection practices [GACP] for medicinal plants. World Health Organization.
- WHO, 2015. world Health Organization.

APENDICES

Apéndice 1

Caracterización de concentración mineral en agua y suelo utilizados en el cultivo de *Asclepias subulata*.

Análisis de agua			
pH	6.94	(RAS)	1.74
Cationes	ppm	Aniones	pmm
Ca	62.4	CO ₃ ⁻²	62
Mg	9.5	HCO ₃ ⁻¹	231.8
Na	56	Cl ⁻¹	70
K	2.1	SO ₄ ⁻²	28.32
Análisis de suelo			
Minerales ppm (mg/Kg Suelo)	Cultivo primavera	Cultivo otoño	Niveles adecuados
N-NO ₃	9.35	15.95	-
P	15.37	24.4	-
Ca	4129	3298	2000
Mg	677	676	250
CIC mEq/100gm	29.80	26.30	20-40
Mg %	18.93	21.42	10-20
Na %	7.15	9.705	< 5
K %	4.65	6.172	5-10
% SAT	24	25.333	20-40
pH	7.21	7.26	7
C.E.	1.21	1.26	<1.5

Actividad del ion hidrógeno (pH), relación de adsorción de sodio (RAS), capacidad de intercambio catiónico del suelo (CIC), saturación de bases en el suelo (SAT), conductividad eléctrica (CE), por el M.C. Francisco Pacheco Ayala.

Apéndice 2

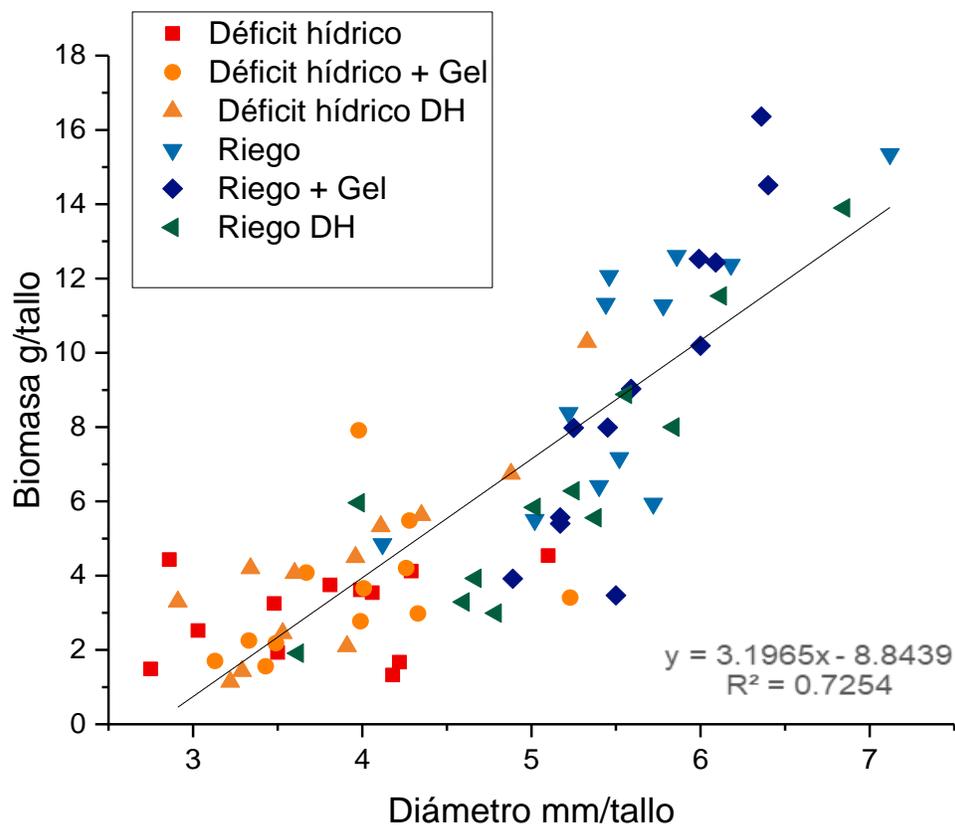
Medias meteorológicas mensuales en los cultivos de *Asclepias subulata*.

Mes	T mx (°C)	T mn (°C)	HR (%)	SatVP (kPa)	RS (MJ/m ² día)	Lluvia (mm)	Eto (mm)
ene-17	23.7	7.1	72.0	1.7	13.6	16.8	70.4
feb-17	27.2	10.0	67.2	2.1	16.3	31.5	86.4
mar-17	32.6	11.4	46.4	2.8	22.5	0.0	141.5
abr-17	35.3	13.2	28.0	3.3	27.4	0.0	178.0
may-17	31.4	3.6	31.4	3.6	29.0	0.3	196.3
jun-17	43.0	20.8	33.7	4.8	28.4	0.0	200.3
jul-17	38.4	22.6	57.3	4.8	23.6	129.8	146.1
ago-17	41.3	25.3	55.8	4.8	24.2	30.2	150.8
sep-17	52.3	16.4	52.3	4.2	22.1	28.5	137.6
oct-17	37.0	14.6	37.0	3.9	19.8	0.0	129.5
nov-17	37.4	7.4	41.4	2.9	15.7	0.3	90.4
dic-17	26.9	8.3	45.6	2.1	12.5	16.0	65.6
ene-18	29.5	7.6	36.3	2.2	15.7	0.0	81.0
feb-18	26.9	9.1	43.7	2.2	16.8	1.5	78.0
mar-18	31.01	9.65	28.83	2.63	22.22	0.0	142.9

Tmx= temperatura máxima, Tmn = temperatura mínima, HRH= humedad relativa del aire, SatvPavg= presión de vapor de saturación, RS= radiación solar, Lluvia, ETo=evapotranspiración de referencia.

Apéndice 3

Correlación de biomasa y diámetro mensual de *A. subulata*, trasplantada en primavera, para formular una ecuación de biomasa. En el eje X el diámetro de tallo (mm) y en el eje Y la biomasa (g/tallo).



Apéndice 4

ACTIVIDADES ACADÉMICAS DERIVADAS DEL ESTE TRABAJO

Artículo por enviar: Determination of cardenolides and antiproliferative activity from a crop of *Asclepias subulata*,

Autores: Héctor Guillermo Bustamante Armenta, Jesús López Elías, Julio Cesar Rodríguez, Luis Ángel Medina Juárez, Luisa Alondra Rascón Valenzuela y Ramón Enrique Robles Zepeda.

Título de la ponencia: Cultivation Establishment and Antiproliferative Activity from *Asclepias subulata*, for the Development of a Phytopharmaceutical.

Autores: Héctor Guillermo Bustamante Armenta, Jesús López Elías, Julio Cesar Rodríguez, Luisa Alondra Rascón Valenzuela y Ramón Enrique Robles Zepeda

Nombre del evento: Experimental Biology 2018, San Diego, California, Estados Unidos de America

Fecha de presentación: 23 de Abril de 2018