

Evaluación *in vitro* del potencial quimiopreventivo del azafrán

Filkrat Abdullaev Jafarova,* Heriberto Caballero-Ortega,* Leticia Riverón-Negrete,* Rogelio Pereda-Miranda,** Roberto Rivera-Luna,*** Juan Manuel Hernández,* Israel Pérez-López,**** Javier J. Espinosa-Aguirre****,*****

*Laboratorio de Oncología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, SS. **Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.

***Subdirección de Hemato/Oncología, Instituto Nacional de Pediatría, SS.

****Laboratorio de Toxicología Genética, Instituto Nacional de Pediatría, SS.

*****Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Evaluation in vitro of chemopreventive potential of saffron

RESUMEN

ABSTRACT

Cancer is a very important national health problem in Mexico, while a significant increase in the total and childhood cancer mortality has been recorded during the last decades. Chemoprevention, defined as the use of natural or synthetic agents to prevent or to block the development of cancer in human beings, is a new and promising strategy in the battle against cancer. Saffron, obtained from the dried red-dark stigmas of *Crocus sativus* L., an important spice rich in carotenoids, is commonly consumed in different parts of the world and used as a medical drug to treat numerous diseases. **Objective.** To test the toxicity of saffron extract *in vivo*; to separate different ingredients in saffron extracts; to examine the cytotoxic effect of saffron and its main components on the growth of different human malignant cells *in vitro*; to evaluate the mutagenic and antimutagenic activities of saffron extract. **Methods.** HPLC with photodiode-array detection was used for semi-preparative separation of different ingredients of saffron crude extract. Colony formation assay was used to determinate the cytotoxic activity of saffron extract and its components on human tumor cells *in vitro*. Mutagenicity and antimutagenicity assays were performed by the Ames method. **Results.** Saffron is not toxic, non-mutagenic, non-antimutagenic and non-comutagenic. Twelve components were isolated: crocin-1, crocin-2, crocin-3, picrocrocin, acid form of picrocrocin, HTCC-diglycosil-kaempferol, trans-crocin-4, trans-crocin-2, trans-crocin-3, safranal, crocetin and cis-crocin-3. Saffron extract itself and some of its ingredients displayed a dose-dependent inhibitory activity against different types of human malignant cells *in vitro*. HeLa cells were more susceptible to saffron than other tested cells. **Conclusions.** Taken together, our results and literature data indicate that saffron could be used as a potential cancer chemopreventive agent in clinical trials.

Key words. Saffron. Chemopreventive agent. Acute toxicity. Cytotoxicity. Mutagenicity.

El cáncer es una de las causas más frecuentes de mortalidad en México. Una alternativa para enfrentar esta enfermedad es el uso de agentes quimiopreventivos de extractos de plantas medicinales, como el azafrán (*Crocus sativus* L.). **Objetivo.** Evaluar el efecto tóxico del extracto de azafrán *in vivo*; separar los componentes del extracto y determinar el efecto citotóxico de cada uno de ellos, así como del extracto total en células malignas humanas *in vitro*; determinar su efecto mutagénico, antimutagénico y comutagénico en un sistema bacteriano. **Metodología.** Para determinar su toxicidad se utilizaron ratones y se administraron diferentes dosis del extracto acuoso, vía oral; la mutagenicidad se determinó por la técnica de Ames; el efecto citotóxico por el método de formación de colonias y para la separación de sus componentes, el método de HPLC. **Resultados.** La LD₅₀ del extracto en ratones fue mayor a 5,000 mg/kg de peso corporal. El extracto no fue mutagénico, antimutagénico ni comutagénico en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*. El efecto citotóxico fue dosis-dependiente y la inhibición del crecimiento celular en 50% (IC₅₀) se obtuvo a concentraciones de 180, 195, 195 y 220 µg/mL para células HeLa, A-204, SW480 y HepG2, respectivamente. Por HPLC se obtuvieron doce componentes, los que inhibieron en diverso grado el crecimiento celular. **Conclusiones.** El extracto de azafrán no es tóxico, mutagénico, antimutagénico ni comutagénico; inhibe el crecimiento de células tumorales humanas *in vitro*; sus componentes biológicamente activos son principalmente carotenoides; el azafrán posee un amplio espectro citotóxico, por lo que se le puede considerar como un agente quimiopreventivo potencial contra el cáncer.

Palabras clave. Azafrán. Agente quimiopreventivo. Toxicidad aguda. Citotoxicidad. Mutagenicidad.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con los últimos datos reportados por el INEGI, el cáncer es la segunda causa de mortalidad en la población de México (12.42%), después de las enfermedades cardiovasculares (22.43%).¹ Asimismo, la mortalidad infantil por cáncer en México durante las últimas décadas se ha incrementado drásticamente (20.3%).² Para enfrentar esta desfavorable situación en México y en todo el mundo ha sido necesario buscar alternativas contra esta enfermedad. Actualmente, la quimioprevención es una nueva estrategia que ofrece buenas perspectivas contra el cáncer, la cual emplea agentes sintéticos o naturales (solos o en combinación) para prevenir o bloquear el desarrollo de cáncer en el humano.³ El problema principal de los agentes quimiopreventivos, especialmente los sintéticos, es la toxicidad que tienen en células normales. Una alternativa para resolver este problema es el empleo de agentes naturales selectivos y con baja toxicidad, como son los extractos de plantas medicinales que en algunos casos poseen actividades antitumorales y anticarcinogénicas significativas y están desprovistos de efectos tóxicos colaterales.

Hoy en día, existe un gran interés por el estudio de extractos de plantas medicinales que cumplan con estas características. Se han usado diversas hortalizas y especias en la medicina tradicional como fuentes potenciales de sustancias quimiopreventivas.³ Por ejemplo, el azafrán es un condimento que se obtiene a partir de los estigmas de la flor del *Crocus sativus* L., miembro de la familia de las Iridáceas y forma parte de la cultura culinaria de distintas regiones del mundo, donde es usado como colorante y saborizante debido a sus constituyentes glicosídicos.⁴⁻⁶ Sin embargo, estudios recientes han demostrado que el extracto de azafrán y sus componentes tienen actividad anticarcinogénica (efecto inhibitorio sobre la inducción de cáncer por agentes químicos), antitumoral (efecto inhibitorio sobre el crecimiento de células malignas) y genotóxica (efecto inhibitorio de sustancias tóxicas como la cisplatina, la ciclofosfamida, la mitomicina y el uretano) en sistemas biológicos *in vitro* e *in vivo*.⁷⁻¹⁹

Recientemente se han logrado separar diversos componentes del azafrán y evaluar su efecto citotóxico sobre diferentes tipos de células tumorales.^{8,9,11,14,15} También se ha demostrado que tanto la crocina como la dimetilcrocetina aisladas del extracto de azafrán, no son mutagénicas, antimutagénicas ni comutagénicas mediante la prueba de Ames²⁰ usando azida de sodio como mutágeno.

No se tienen datos precisos acerca de su posible toxicidad aguda, subaguda o crónica *in vivo* y sólo se sabe que su LD₅₀ es mayor a 600 mg/kg de peso corporal.¹⁸

El objetivo de este trabajo fue analizar la toxicidad *in vivo* del azafrán, su mutagenicidad y antimutagenicidad, así como su efecto citotóxico *in vitro* en diferentes células malignas humanas, con el propósito de proponerlo junto con sus diferentes componentes purificados, como agentes potenciales quimiopreventivos naturales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos

Medio de cultivo celular modificado Dulbecco (D-MEM) fue adquirido de Gibco/BRL (Grand Island, NY). El suero fetal bovino (SFB) de HyClone (Road Logan, UT). Las cajas de cultivo y los frascos de la compañía Costar (Corning, NY). El resto de los reactivos utilizados fueron obtenidos de la compañía Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Extracto de azafrán

Los estigmas de azafrán puro de origen español (La Mancha) fueron adquiridos en un mercado local y almacenados en la oscuridad a 4 °C hasta su uso. El extracto de azafrán utilizado para las pruebas de toxicidad aguda fue preparado de acuerdo con la metodología descrita previamente.^{16,17}

Toxicidad aguda del azafrán

Se utilizaron 96 ratones de la cepa BALB C (48 machos y 48 hembras) de 21 días de edad. Se formaron ocho grupos con seis ratones cada uno; se les retiró el alimento 12 horas antes de la administración por vía oral de las siguientes concentraciones del extracto de azafrán: 0 mg/kg (grupo 1, testigo); 250 mg/kg (grupo 2); 400 mg/kg (grupo 3); 600 mg/kg (grupo 4); 900 mg/kg (grupo 5); 1,350 mg/kg (grupo 6); 2,000 mg/kg (grupo 7) y 5,000 mg/kg (grupo 8). Se realizaron observaciones cada tres horas por cinco días para determinar la dosis letal 50% (LD₅₀).²¹

Separación de los componentes del azafrán por HPLC

Para la separación de los componentes del azafrán se utilizaron 20 mg de estigmas de azafrán macerados en 5 mL de metanol y 5 mL de agua desioni-

zada (2 mg/mL) por dos horas a temperatura ambiente y en la oscuridad con movimientos constantes. El extracto se sometió a centrifugación a 30,000 x g por 20 minutos y fue filtrado a través de membranas Nylon Acrodisc Waters 13 (0.45 mm).¹⁴

El sistema cromatográfico consistió de un equipo Waters (Millipore Corp., Milford, MA, EU) equipado con un sistema de distribución de disolventes (modelo 600E) y un detector de fotoarreglo de diodos UV longitud de onda múltiple (modelo 996), acoplados a una computadora (Optiflex 466/LE, DELL). El control del sistema, la adquisición de datos y el procesamiento de la información cromatográfica se realizaron con el programa Millennium 2000 (Waters). Para la resolución del extracto total a nivel analítico se utilizó una columna de fase reversa Waters Spherisorb ODS2 (4.6 x 250 mm diámetro interno). La fase móvil consistió en un gradiente lineal de metanol:agua (10 a 100%) en 15% de acetonitrilo, en contraste con los métodos previamente descritos para la cuantificación de los carotenoides del azafrán que incluyen una solución acuosa de ácido acético (1%).¹² Se utilizó un tiempo máximo de 60 minutos para cada elusión con un flujo de 0.5 mL/min de la fase móvil y un volumen de inyección de la muestra de 50 µL, realizando la detección en el UV a 250, 420 y 440 nm de longitud de onda. Una vez estandarizado este método analítico, se realizó el escalamiento de las condiciones analíticas a nivel semipreparativo. Se utilizó una columna de fase reversa Waters Spherisorb ODS2 (20 x 250 mm diámetro interno) y se ajustó el flujo a 9.45 mL/min con un volumen de inyección de 500 µL del extracto.

Cultivo celular

Se obtuvieron cuatro líneas celulares malignas humanas de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD): carcinoma epidermoide de cérvix (HeLa), rhabdomyosarcoma (A-204), carcinoma de colon (SW480) y carcinoma hepatocelular (HepG2). Las líneas celulares se incubaron en medio de cultivo D-MEM con 10% de SFB a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. La incubación con el extracto de azafrán y sus componentes se llevó a cabo de acuerdo con la metodología previamente descrita.^{16,17}

Ensayos de formación de colonias

Las líneas celulares malignas se incubaron a una concentración determinada (2 x 10⁵) en cajas Petri con 10 mL de medio de cultivo D-MEM. Cuarenta y

ocho horas después se añadieron diferentes concentraciones (50-400 µg/mL) del extracto de azafrán, así como de sus componentes y se continuó la incubación por tres horas más. Las células fueron tripsinizadas (0.05M) y se sembraron 200 células en cajas Petri por triplicado para determinar la formación de colonias. Diez días después de la incubación, las colonias se lavaron con amortiguador de fosfato sódico (PBS) pH 7.6, fijadas con metanol y teñidas con Giemsa. Para determinar el número de colonias formadas se tomó como criterio que tuvieran un diámetro > 0.05 mm.¹⁷

Pruebas de mutagenicidad y antimutagenicidad

La cepa TA98 de *Salmonella typhimurium* fue proporcionada por el doctor B.N. Ames, de la Universidad de California, en Berkeley. Los efectos mutagénico, antimutagénico y comutagénico del extracto de azafrán se determinaron con la prueba de Ames y con el mutágeno conocido benzo[a]pireno (BP)^{20,22} a una concentración de 10 µg/placa, dosis que no es letal para la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*. Se añadieron 0.5 mL de la fracción S9 al agar de superficie antes de su colocación en la placa. La fracción S9 (10% de homogenado hepático de rata, 8 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 4 mM NADP, 5mM glucosa-6-fosfato y 100 mM de PBS pH 7.4) fue obtenida de ratas tratadas con aroclor 1254 como lo describen Maron y Ames.²⁰ Después de 72 horas de incubación a 37 °C, se contó el número de colonias revertantes con un contador *MiniCount* (Biotran II, New Brunswick Scientific, Edison NJ). El índice de mutación fue obtenido como $IM = x_1/x_0$, donde x_1 es el número de colonias revertantes con cada concentración del extracto y x_0 es el número de revertantes en el testigo. Un compuesto se considera mutagénico si el número de colonias revertantes se incrementa al doble del valor del testigo negativo correspondiente ($IM > 2$). Este resultado debe ser observado al menos en tres concentraciones probadas y si se demuestra que la curva dosis-respuesta es reproducible. Un compuesto se considera antimutagénico y/o comutagénico si éste es incapaz de inhibir o potenciar el efecto mutagénico del BP.

Análisis estadístico

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

RESULTADOS

Toxicidad aguda del extracto de azafrán

Los resultados obtenidos muestran que durante el periodo de administración oral de las diferentes concentraciones del extracto en los ratones no se observó ningún efecto letal. De acuerdo con los resultados podemos decir que la dosis requerida para provocar la muerte al 50% de los ratones (LD_{50}) que recibieron el extracto acuoso del azafrán es mayor de 5,000 mg/kg de peso corporal.

Separación de los componentes del azafrán

La figura 1 muestra la separación de los componentes del extracto de azafrán español mediante HPLC de fase reversa, a tres longitudes de onda

(250, 420 y 440 nm). Dichos componentes se identificaron por comparación en su tiempo de retención (TR) con los obtenidos en diversos trabajos previos de la siguiente forma: los picos 1-3 corresponden a crocina-1 (TR = 6 min), crocina-2 (TR = 8 min) y crocina-3 (TR = 11 min), respectivamente; pico 4: picrocrocina (TR = 15 min); pico 5: picrocrocina en forma ácida (TR = 20 min); pico 6: di-glucosilkaempferol (TR = 25 min); pico 7: *trans*-crocina-4 (TR = 29 min); pico 8: *trans*-crocina 2' (TR = 32 min); pico 9: *trans*-crocina 3 (TR = 33 min); pico 10: safranal (TR = 37 min); pico 11: crocetina (TR = 40 min) y pico 12: *cis*-crocina-3 (TR = 42 min). Con la cromatografía por HPLC semipreparativo se obtuvo una cantidad suficiente en miligramos de cada uno de los componentes mayoritarios del extracto de azafrán para analizar su actividad citotóxica en células malignas humanas.

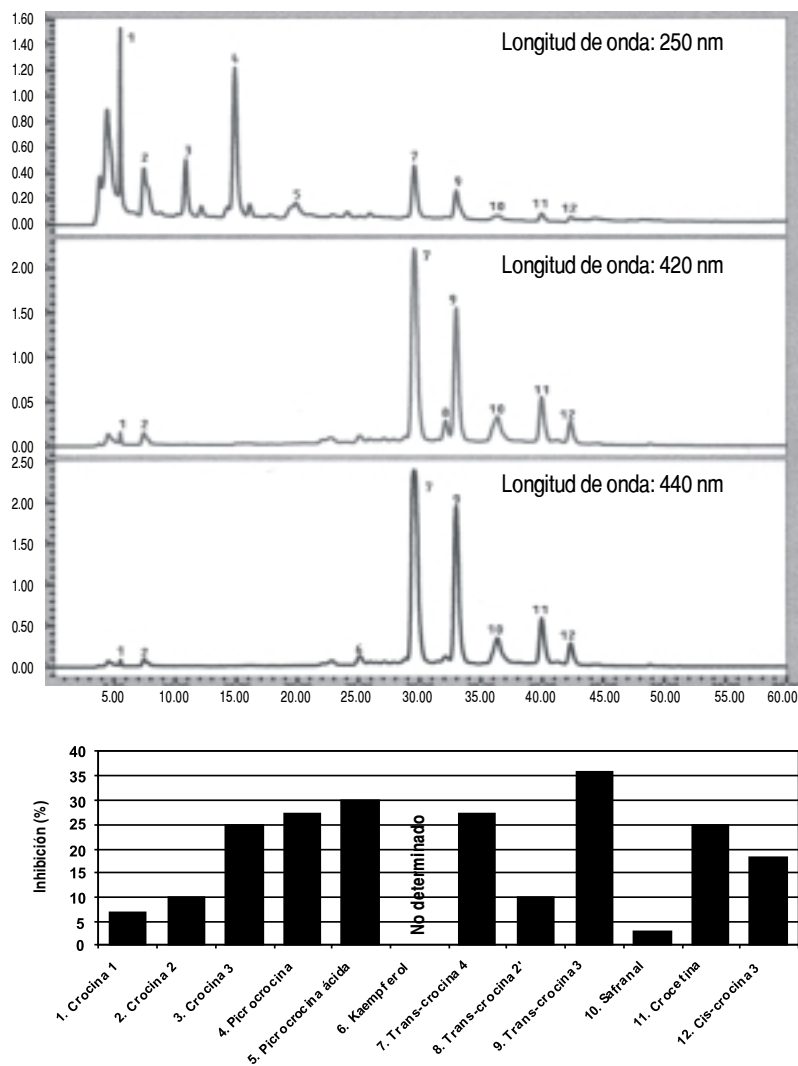


Figura 1. Separación de los componentes del azafrán español por HPLC (2 mg/mL; flujo: 0.5 mL/min; gradiente lineal: 10-100% metanol:agua) y actividad antitumoral de cada uno de ellos en células de carcinoma epidermoide de cérvix.

La línea celular HeLa fue expuesta por tres horas a los 200 μ g/mL con cada uno de los componentes del extracto de azafrán. El número de colonias fue determinado como se describe en Material y métodos. Los resultados están expresados como porcentaje de inhibición de la formación de colonias (las colonias totales formadas por caja sin tratamiento con el extracto de azafrán es igual al 100%: HeLa = 74).

Cuadro 1. Efecto inhibitorio (%) del extracto de azafrán sobre la formación de colonias de las células malignas probadas.

Extracto de azafrán (µg/mL)	Células HeLa $\bar{X} \pm D.E.$ (a)	Células A-204 $\bar{X} \pm D.E.$ (a)	Células HepG-2 $\bar{X} \pm D.E.$ (a)	Células SW480 $\bar{X} \pm D.E.$ (a)
0	0	0	0	0
50	31 ± 2.1*	25 ± 0.4*	31 ± 1.7*	30 ± 2.3*
100	42 ± 2.6*	31 ± 4.1*	37 ± 2.4*	35 ± 2.8*
200	55 ± 3.8*	51 ± 4.2*	44 ± 0.9*	51 ± 3.7*
400	82 ± 8.1*	100*	69 ± 7.3*	63 ± 4.1*

(a)media ± desviación estándar.

*p < 0.05.

Las líneas de células malignas fueron expuestas por tres horas a las diferentes concentraciones del extracto de azafrán. El número de colonias fue determinado como se describe en Material y métodos. Los resultados están expresados como porcentaje de inhibición de la formación de colonias (las colonias totales formadas por caja sin tratamiento con el extracto de azafrán es igual al 100%: HeLa = 68 colonias; A-204 = 60 colonias; HepG2 = 58 colonias y SW480 = 70 colonias).

Efecto inhibitorio del extracto de azafrán en células tumorales

Se examinó el efecto inhibitorio provocado por diferentes concentraciones del extracto (50, 100, 200 y 400 µg/mL) sobre la formación de colonias de las diferentes líneas celulares empleadas. Se observó que las líneas celulares más sensibles al efecto inhibitorio del extracto de azafrán fueron las células de rhabdomyosarcoma y las células de carcinoma epidermoide de cérvix (a dosis de 400 µg/mL, 100% y 82% de inhibición, respectivamente), mientras que las líneas celulares menos sensibles fueron las de carcinoma de colon y carcinoma de hígado (a dosis de 400 µg/mL, 63% y 69% de inhibición, respectivamente). Los resultados de estos experimentos (Cuadro 1) muestran que el extracto de azafrán inhibe de manera dosis-dependiente la formación de colonias en todas las líneas celulares. La inhibición del crecimiento celular en 50% (IC₅₀) se obtuvo a concentraciones de 180 µg/mL en HeLa, de 195 µg/mL en A-204 y SW480 y de 220 µg/mL en HepG2.

Efecto inhibitorio de los componentes del azafrán en células tumorales

Los diferentes componentes del azafrán inhibieron en diverso grado la formación de colonias de células de carcinoma epidermoide de cérvix (Figura 1). La *trans*-crocina 3, la picrocrocina ácida, la picrocrocina y la *trans*-crocina 4 fueron los componentes que tuvieron mayor porcentaje de inhibición sobre el cre-

cimiento de células transformadas (36, 30, 27 y 27%, respectivamente). Para el caso del kaempferol no pudimos determinar su actividad citotóxica, ya que la cantidad colectada de este componente fue insuficiente.

Efecto mutagénico del extracto de azafrán

Los resultados obtenidos del potencial mutagénico del extracto de azafrán se presentan en el cuadro 2, donde se observa que éste no es mutagénico hasta 1,500 µg/caja en comparación con el BP. El índice de mutación (IM) fue menor a 2 para todas las concentraciones del extracto, mientras que para el BP fue de 8.7.

Efecto antimutagénico y comutagénico del extracto de azafrán

De igual manera, tampoco se observó que el extracto de azafrán sea antimutagénico ni comutagénico hasta 1,500 µg/caja, ya que es incapaz de inhibir o potenciar el efecto mutagénico del BP en la prueba de Ames/*Salmonella* (Cuadro 3).

DISCUSIÓN

Los resultados de los experimentos de toxicidad aguda en ratones mostraron que la administración oral del extracto de azafrán hasta dosis de 5,000 mg/kg de peso corporal fue aparentemente inocua. Estudios previos en ratones indican que un pretratamiento por cinco días con extracto de azafrán no induce

Cuadro 2. Actividad no mutagénica del extracto de azafrán en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium* con la prueba de incorporación en placa, con activación metabólica.

Extracto de azafrán (µg/placa)	Revertantes por placa $\bar{X} \pm D.E.$ ^(a)	IM
0	45 ± 6.7	—
50	41 ± 8.3	0.9
100	35 ± 5.4	0.8
200	37 ± 7.3	0.8
300	35 ± 8.9	0.8
500	36 ± 7.1	0.8
1,000	38 ± 6.5	0.8
1,500	34 ± 3.8	0.7
BP (testigo positivo)	391 ± 19.5	8.7

^(a)media ± desviación estándar.

BP = Benzo[a]pireno (10 µg/placa).

IM = Índice de mutación.

Cuadro 3. Antimutagenicidad del extracto de azafrán en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium* con la prueba de incorporación en placa, con activación metabólica.

Extracto de azafrán (µg/placa)	Revertantes por placa $\bar{X} \pm D.E.$ ^(a)	% de inhibición de la mutagenicidad inducida por BP
0 + BP	391 ± 19.5	—
500 + BP	347 ± 29.6	11.3
1,000 + BP	344 ± 30.4	12.1
1,500 + BP	343 ± 32.7	12.3

^(a)media ± desviación estándar

BP = Benzo[a]pireno (10 µg/placa)

cambios significativos en la actividad de la enzima glutatión *S*-transferasa y puede inhibir la actividad genotóxica *in vivo* de cisplatina, ciclofosfamida, mitomicina y uretano a través de diversos mecanismos de acción.¹⁹ Sin embargo, serán necesarias las pruebas de toxicidad subaguda y crónica en ratones y en otras especies animales para obtener argumentos adicionales que permitan proponer la utilización del azafrán como agente terapéutico con un amplio margen de seguridad en la quimioprevención.

Gracias al uso del acetonitrilo en lugar del ácido acético en la fase móvil del método HPLC semiprepa-

rativo, se logró la purificación de doce componentes del extracto de azafrán en cantidades suficientes sin que se alterara su composición química y se le determinara su actividad citotóxica. De esta manera, se demostró la utilidad de esta metodología en los procedimientos a nivel semipreparativo para la recolección de los componentes del extracto de azafrán.

Nuestros estudios indican que el extracto de azafrán posee una fuerte actividad citotóxica en diferentes líneas celulares malignas. El extracto de azafrán presenta una inhibición dosis-dependiente en la formación de colonias de todas las líneas celulares malignas estudiadas. Se demostró que los diferentes componentes del extracto de azafrán causaron un efecto inhibitorio en el crecimiento de colonias de las células malignas empleadas en pruebas *in vitro*. Previamente, nuestras investigaciones demostraron que el extracto de azafrán no tiene ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento de células humanas normales *in vitro*.¹⁷ También se determinó que un pretratamiento con azafrán de células tumorales induce un incremento de casi el doble de los niveles basales de compuestos intracelulares con grupos sulfidrido (SH),²³ lo cual constituye una posible explicación para la inhibición observada en la formación de colonias de células tumorales. Además, los resultados sugieren que el efecto citotóxico del azafrán se debe principalmente a los carotenoides que contiene.

Los datos obtenidos con el extracto de azafrán señalan que éste no posee actividad mutagénica, antimutagénica ni comutagénica al realizarle la prueba de Ames en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium* utilizando al BP como testigo, además de que no se observa en la misma prueba un efecto tóxico o letal para el microorganismo. Esta última posibilidad fue examinada con detenimiento por el análisis microscópico del crecimiento bacteriano de fondo en las cajas de cultivo y no se encontró evidencia de efecto tóxico en las concentraciones usadas con el extracto de azafrán. Las mutaciones que se presentan en etapas muy tempranas son importantes para la carcinogénesis, es por ello que la prueba de mutación en *Salmonella typhimurium* ha sido usada con éxito para detectar mutágenos/carcinógenos y antimutágenos/anticarcinógenos en los estudios genéticos.²⁴

La quimioprevención del cáncer con agentes naturales y sintéticos representa una fase importante en la investigación biomédica, proporcionando un potencial muy útil para la identificación de sustancias antitumorales y nos da la oportunidad de poder estudiar los mecanismos moleculares de éstos.³

La escasez y el alto costo para obtener grandes cantidades de azafrán son impedimento para utili-

zarlo en la quimioprevención y tratamiento del cáncer; sin embargo, una alternativa podría ser su cultivo en invernadero o determinar sus componentes biológicamente activos y producirlos sintéticamente, lo que permitiría resolver estas limitantes.

En conclusión, nuestros resultados revelan que el extracto de azafrán no es tóxico, mutagénico, antimutagénico ni comutagénico; sin embargo, presenta actividad citotóxica en diferentes células malignas humanas. El presente estudio nos ayuda a incrementar las evidencias de que el azafrán y sus componentes principales pueden jugar un papel muy importante en la quimioprevención del cáncer y que es necesario hacer estudios adicionales para determinar las concentraciones terapéuticas adecuadas de estos agentes naturales, así como para establecer su mecanismo molecular antitumoral.

AGRADECIMIENTOS

Los autores deseamos agradecer el apoyo recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Proyecto No. 28513.

REFERENCIAS

1. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), mortality statistics, México, 2001.
2. Abdullaev FI, Rivera Luna R, Roitenburd Belacortu V, Espinosa Aguirre JJ. Pattern of childhood cancer mortality in Mexico. *Archives of Medical Research* 2000; 31: 26-531.
3. Abdullaev FI. Plant-derived agents against cancer. New Delhi, India. In: S.K. Gupta, ed. Pharmacology and therapeutics in the new millennium. *Narosa Publishing House* 2001; 30: 345-54.
4. Abdullaev FI. Biological effects of saffron. *Bio Factors* 1993; 4(2): 83-6.
5. Abdullaev FI, Frenkel GD. Saffron in biological and medical research. In: "Saffron *Crocus sativus* L.". M. Negbi, ed. Harwood Academic Publisher; 1999, p. 103-113.
6. Ríos JL, Recio MC, Giner RM, Mañez S. An update review of saffron and its active compounds. *Phytother Res* 1996; 10(3): 189-93.
7. Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *EBM*, in press; 2001.
8. Lozano P, Delgado D, Gómez D, Rubio M, Iborra JL. A non-destructive method to determined the safranal content of saffron (*Crocus sativus* L.) by supercritical carbon dioxide extraction combined with high-performance liquid chromatography and gas chromatography. *J Biochem Biophys Methods* 2000; 43: 367-78.
9. Winterhalter P, Straubinger M. Saffron-renewed interest in an ancient spice. *Food Rev Int* 2000; 16(1): 39-59.
10. García-Olmo DC, Riese HH, Escribano J, Ontañón J, Fernández JA, Atienzar M, García-Olmo D. Effects of long-term treatment of colon adenocarcinoma with crocin, a carotenoid from saffron (*Crocus sativus* L.): An experimental study in the rat. *Nutr & Cancer* 1999; 15(2): 120-26.

11. Lozano P, Castellar MR, Simancas MJ, Iborra JL. Quantitative high-performance liquid chromatographic method to analyze commercial saffron (*Crocus sativus* L.) products. *J Chromatog A* 1999; 830: 477-83.
12. Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M, Fernández JA. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells *in vitro*. *Cancer Lett* 2000 100(1-2): 23-30.
13. Nair SC, Kurumboor SK, Hasegawa JH. Saffron chemoprevention in biology and medicine: A review. *Cancer Biother* 1995; 10(4): 257-64.
14. Tarantilis PA, Tsoupras G, Polissiou M. Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry. *J. Chromatogr* 1995; 699(1-2): 107-18.
15. Tarantilis PA, Polissiou M, Manfait M. Separation of picrocrocin, *cis-trans*-crocin and safranal of saffron using high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J. Chromatogr* 1994; 664: 55-61.
16. Abdullaev FI, Frenkel GD. Effect of saffron on cell colony formation and cellular nucleic acid and protein synthesis. *BioFactors* 1992; 3: 201-5.
17. Abdullaev FI, Frenkel GD. The effect of saffron on intracellular DNA, RNA and protein synthesis in malignant and non-malignant human cells. *BioFactors* 1992; 4(1): 43-5.
18. Nair SC, Pannikar B, Pannikar KP. Antitumour activity of saffron (*Crocus sativus*). *Cancer Letters* 1991; 57(2): 109-14.
19. Premkumar K, Abraham S, Santhiya S, Gopinath P, Ramesh A. Inhibition of genotoxicity by saffron (*Crocus sativus* L.) in mice. *Drug and chemical toxicology* 2001; 24(4): 421-8.
20. Ames BN, Cann J, Yamasaki JE. Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 1975; 31: 347-64.
21. OECD. Guidelines for testing of chemicals. Test # 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. www.dicer-org/dicer/DB/html/3main-method-oecd-01.htm
22. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113: 173-215.
23. Abdullaev FI, González de Mejía E. Inhibition of colony formation of HeLa cells by naturally occurring and synthetic agents. *BioFactors* 1995; 5(3): 133-8.
24. Rauscher R, Edenharder R, Platt KL. *In vitro* antimutagenic and *in vivo* anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids. *Mutat Res* 1998; 413: 129-42.

Reimpresos:

Dr. Filkrat Abdullaev

Jefe de Laboratorio Oncología Experimental

Instituto Nacional de Pediatría

Avenida IMAN # 1

Torre de Investigación, 6 piso

04530 México, D.F.

Tel: 52-5- 606 00 02 ext. 4747

Fax: 52-5-606 94 55

Correo electrónico: fikrat@servidor.unam.mx

o fikrat@yahoo.com

Recibido el 11 de octubre de 2001.

Aceptado el 23 de abril de 2002.