

2005-A

COD. 395267319

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



EVALUACION DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA Y ANTITUMORAL DEL EXTRACTO ACUOSO DE AJO (*Allium sativum*), EN EL MODELO MURINO L5178Y.

TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTA

GABINA AGUAYO CERVANTES

Las Agujas, Zapopan, Jal., Febrero de 2006



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias

Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura
en Biología

215/ C. C. BIOLOGÍA

C. GABINA AGUAYO CERVANTES
PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título : “ **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTITUMORAL DEL EXTRACTO ACUOSO DE AJO (*Allium sativum*) EN EL MODELO MURINO L5178Y** ” para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo al M en C. **EDUARDO PADILLA CAMBEROS** y el Asesor es: **DR. JORGE PEREGRINA SANDOVAL** y el **DR. ARTURO OROZCO BAROCÍO**.

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”
Las Agujas, Zapopan., 13 de Julio del 2005.

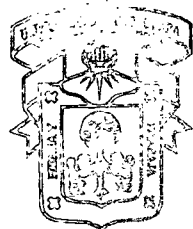

DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACION DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA


DRA. ANA ISABEL RAMÍREZ QUINTANA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

C.c.p. M en C. EDUARDO PADILLA CAMBEROS - Director del trabajo

Dr. Carlos Álvarez Moya.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Carrera de Licenciado en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **TESIS**, opción **TESIS E INFORMES** con el título: **"EVALUACION DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTITUMORAL DEL EXTRACTO ACUOSO DE AJO (*Allium sativum*), EN EL MODELO MURINO L5178Y"** que realizó el/la pasante Gabina Aguayo Cervantes con número de código 395267319 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
"PIENSA Y TRABAJA"
 Las Aguas, Zapopan., 20 de noviembre del 2005.

Firma *Eduardo Padilla Camberos*
 M. en C. Eduardo Padilla Camberos
 Director/a del trabajo,

firma *Jorge Peregrina Sandoval*
 Dr. Jorge Peregrina Sandoval
 Asesor(es)

| Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación | Firma de aprobado | Fecha de aprobación |
|--|-------------------|---------------------|
| Dr. Arturo Orozco Barocio | <i>[Firma]</i> | 5/10/2006 |
| Dr. Carlos Álvarez Moya | <i>[Firma]</i> | 2/12/05 |
| Dr. Edgardo Flores Torales | <i>[Firma]</i> | 6/11/05 |
| Supl. M. en C. Josefina Casas Solís | <i>[Firma]</i> | 7/11/05 |

Recibido
CA
 3/01/06
Carlos Álvarez

SEDE DEL ESTUDIO

El presente trabajo fue realizado en la División de Patología y Biotecnología Ambiental del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

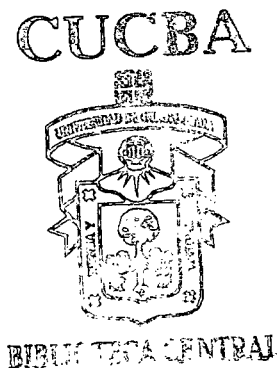
DEPENDENCIAS E INSTITUCIONES PARTICIPANTES

Lab. de Inmunobiología Depto. de Biología Celular y Molecular de la Div. De Ciencias Biológicas y Ambientales, del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. U de G.

Este trabajo fue financiado por el proyecto: "Desarrollo de fungicidas y bactericidas de origen natural para el aseguramiento de la inocuidad microbiológica de frutas y hortalizas".

Clave de registro: SAGARPA-2002-C01-0821.

Director de tesis: **M. en C. Eduardo Padilla Camberos**



Agradecimientos

Agradezco infinitamente a Dios por haberme premiado con mis padres, que fueron, son y serán un gran apoyo en mi vida que además me guiaron de una manera correcta, los regaños, las preocupaciones que pasamos juntos es algo que no voy a olvidar, en pocas palabras gracias por la vida tan satisfactoria que pase con ustedes.

Dedico este trabajo a mi madre Cristina y a mi padre Juan y a mis abuelos paternos y maternos, a los que amo con todo mi corazón, sin los cuales no hubiera llegado a donde me encuentro hoy.

A mis hermanos Patricia, Gloria, Lupita, Alejandro, Isabel por haber estado conmigo en los momentos que los necesite, por sus críticas y consejos, que eso me ayudo mucho para seguir adelante, los admiro y quiero mucho. A mi sobrina Claudia que es mi inspiración.

A mi cuñado Alfonso que es una finísima persona, que sin darse cuenta me ha ayudado mas de lo que se imagina con su seguridad irrefutable, que poco a poco me ha transmitido, es de lo mejor que he conocido.

A mi novio Esteban que con su apoyo incondicional, cariño, paciencia y amor me ha dado confianza para seguir en especial en momentos difíciles. Gracias por estar siempre ahí.

En especial a mi director de tesis el M. en C. Eduardo por brindarme su apoyo y conocimiento incondicional, por haberme tenido tanta paciencia, le doy las gracias, de no ser por su ayuda no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

A mis maestros y sinodales, Jorge, Arturo, Edgardo, Carlos, Josefina por guiarme de manera correcta en este camino que a veces parece muy difícil.

A mi amiga y compañera mi tutora de la escuela la maestra Maria Magdalena, y su esposo que me apoyaron en momentos difíciles.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

| | Pág. |
|---|------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 2 |
| 3. ANTECEDENTES | 4 |
| 3.1 Generalidades del ajo | 4 |
| 3.2 Historia y uso del ajo | 5 |
| 3.3 Composición del ajo | 6 |
| 3.4 Componentes con actividad biológica del ajo | 8 |
| 3.5 Uso terapéutico general del ajo | 9 |
| 3.6 Uso del ajo en la prevención del cáncer | 10 |
| 3.7 Estudios epidemiológicos | 12 |
| 3.8 Citotoxicidad del ajo en líneas tumorales <i>in vitro</i> | 14 |
| 3.9 Estudios <i>in vivo</i> | 14 |
| 4. JUSTIFICACIÓN | 15 |
| 5. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS PARTICULARES | 16 |
| 6. HIPÓTESIS | 17 |
| 7. METODOLOGÍA | 18 |
| 8. MATERIAL Y MÉTODOS | 19 |
| 8.1 Material biológico | 19 |
| 8.2 Preparación de extracto acuoso de ajo (<i>Allium sativum</i>) | 19 |
| 8.3 Análisis cualitativo para identificación de alicina | 20 |
| 8.4 Ensayos <i>in vitro</i> | 21 |
| 8.5 Método de MTS | 21 |
| 8.6 Estudios de actividad antitumoral | 22 |
| 8.7 Análisis estadístico | 24 |
| 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 25 |
| 10. CONCLUSIONES | 33 |
| 11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 34 |

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

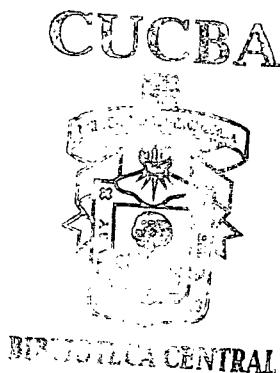
Pág.

FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Conversión de aliina en alicina | 6 |
| Figura 2. Esquema general de Metodología | 18 |
| Figura 3. Conversión de MTS a Formazan por células vivas. | 22 |
| Figura 4. Identificación de alicina | 26 |
| Figura 5. Grafico de citotoxicidad en L5178Y | 27 |
| Figura 6. Grafico de citotoxicidad en CMSP | 28 |
| Figura 7. Grafico de Kaplan Meier (vía oral) | 30 |
| Figura 8. Grafico de Kaplan Meier (vía intraperitoneal) | 31 |

CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Propiedades físicoquímicas del ajo | 7 |
| Cuadro 2. Principales componentes organosulfurados en ajo | 8 |
| Cuadro 3. Grupos experimentales | 24 |
| Cuadro 4. Resultados de la prueba estadística (t de student). Prueba de MTS con L5178Y | 29 |
| Cuadro 5. Resultados de la prueba estadística (t de student). Prueba en CMSP de ratón | 29 |



1. RESUMEN

El ajo (*Allium sativum*) es utilizado desde hace más de 5,000 años ya que se le han atribuido importantes funciones en la prevención de un gran número de enfermedades como las cardiovasculares. Actualmente los estudios se han encaminado a la evaluación del ajo y sus componentes en relación con el cáncer.

En este trabajo se utilizó un extracto acuoso de ajo, para evaluar su actividad antitumoral en un modelo murino y citotoxicidad en la línea tumoral L5178Y. Los extractos obtenidos se analizaron por cromatografía en capa fina para detectar la presencia de alicina, el principal componente activo del ajo.

Se inocularon ratones con células de linfoma L5178Y. El tratamiento con extractos de ajo se administró pre y postinoculación, por vía intraperitoneal (i.p) y oral. Por su parte, la prueba de citotoxicidad se realizó *in vitro* exponiendo células tumorales y células mononucleares de sangre periférica (CMSP) al extracto de ajo y evaluando la viabilidad celular.

Los resultados obtenidos mostraron una mayor sobrevivencia en el grupo de animales tratados con extracto de ajo administrado vía i.p a una dosis de 100 μ L, previo a la inoculación con células tumorales (preinoculación). La citotoxicidad del extracto de ajo en la línea tumoral L5178Y se observó en concentraciones de 50 y 100%. El extracto mostró menor efecto citotóxico en células mononucleares de sangre periférica de ratón.

Estos resultados demuestran el efecto antitumoral del extracto acuoso de ajo tanto en el modelo *in vivo* como *in vitro*, en la línea L5178Y. Se sugiere continuar con los estudios para determinar mecanismos de acción antitumoral y el papel de los componentes químicos del ajo en la respuesta biológica observada.

2. INTRODUCCION

La utilización de productos de origen vegetal para la prevención y tratamiento de enfermedades como el cáncer, esta tomando un gran auge, debido principalmente a los efectos secundarios que se observan con los tratamientos convencionales.

Algunos vegetales a los que se les atribuyen beneficios en aplicaciones terapéuticas son el género *Allium* que incluye aproximadamente 500 especies; de las más usadas son el ajo, la cebolla, cebollines y puerros. El ajo (*Allium sativum*), es un bulbo de olor y sabor intensos, el ajo es cultivado en todo el mundo. Sus constituyentes a base de sulfuros le confieren la mayoría de sus propiedades farmacológicas. El ajo cocido no produce un olor fuerte, el ajo crudo tiene efectos fisiológicos importantes (Haydar *et. al*, 2005).

El ajo se ha considerado un agente medicinal y terapéutico, desde antiguos escritos que datan 1550 años antes de cristo (Kyo *et. al*, 2001).

Se han reportado en estudios experimentales y clínicos sobre la eficacia de esta planta en la prevención y tratamiento de innumerables enfermedades (Caragay, 1992).

De acuerdo a estudios epidemiológicos, el consumo del ajo puede reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y cáncer, posiblemente mediante la regulación de la respuesta inmune (Young *et al*, 2000). Trabajos recientes confirman que los extractos de ajo tienen una capacidad inhibitoria suprimiendo proliferación de células tumorales (Bianchini y Vainio, 2001). El ajo posee una acción citotóxica y preventiva frente al desarrollo de varias líneas celulares de cáncer de piel, mucosa oral, esófago, mamas, linfoma de Burkitt, etc. (Kyo *et. al*, 2001).

Los principios activos responsables de la actividad biológica en el ajo son la alicina, que es el componente mayoritario y otros componentes organoazufrados que se producen al degradarse la alicina (Hirsch *et. al*, 2000).

En este estudio, se evaluó la citotóxicidad de un extracto acuoso de ajo sobre la línea tumoral L5178Y y sobrevida en ratones portadores de linfoma L5178Y.

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades del ajo

Los géneros *Allium* incluyen aproximadamente 500 especies de las más usadas son las cebollas (*Allium cepa*), ajo (*Allium sativum*), puerros (*Allium porrum*), cebollines (*Allium schoenoprasum*) y porros (*Allium ascalonicum*) (Itakura et. al, 2001).

Se considera que el ajo procede de Asia Central, desde donde se difundió a través de Asia Menor y de Egipto a toda Europa. Esta planta de la familia de las Liliáceas fue introducida a América poco después del descubrimiento del continente, iniciándose así su cultivo en Centro y Sur de América, actualmente, la planta se ha distribuido a través del mundo (Das, 2002).

El nombre "*Allium sativum*" es derivado de la palabra Celta "*al*", que significa quemadura o picadura, y "*sativum*" del latín, plantado o cultivado. El ajo es una especie medicinal con nombres comunes tales como: Ail, alii sativi bulbs, garlic. Russian penicillium, stinky rose, Knoblauch (Estrada, 2004).

El ajo es una planta bianual cuyas raíces son blancas, fasciculadas, muy numerosas y con escasas ramificaciones. El tallo o disco, es una masa cónica que en la madurez forma un callo duro, las yemas vegetativas axilares de las hojas se hipertrofian durante la fase de bulberización formando los dientes del ajo por acumulación de sustancias nutritivas, que se encuentran rodeadas de túnicas, restos de vainas foliares.

Las hojas del ajo son planas, acanaladas, la anchura de las hojas oscila entre los 3 cm, terminan en punta y se distribuyen de forma alterna. Su desarrollo vegetativo y productivo óptimos se consiguen en climas templados y boreales del hemisferio norte. La brotación óptima se realiza entre 20 y 22° C, con una humedad relativa elevada. Habitualmente son plantas de lugares abiertos,

soleados y secos, con climas áridos, siendo plantas poco competitivas y no se encuentran en la vegetación densa (García, 1998).

El ajo, al igual que la cebolla, con la que está emparentado, tiene flores pequeñas, blancuzcas, de seis piezas, dispuestas en umbelas. El fruto es una cápsula que encierra unas semillas negras arriñonadas (Estrada, 2004).

El bulbo, de olor y sabor intensos característicos, está cubierto por una envoltura papirácea y consta de varias piezas fáciles de separar llamadas dientes.

El ajo es cultivado y consumido en todo el mundo, por sus efectos benéficos, descritos desde la antigüedad (Itakura *et. al*, 2001).

Actualmente la comunidad científica esta interesada en las propiedades farmacológicas de los vegetales del género *Allium* y sus respectivos constituyentes químicos, siendo estos los responsables de la mayoría de las propiedades farmacológicas del ajo (Bianchini y Vainio, 2001).

3.2 Historia y uso del ajo

El ajo es usado a lo largo de la historia, como tratamiento de gran variedad de enfermedades. Se ha documentado el uso de ajo en remedios, desde hace aproximadamente 5000 años. En China lo han usado por más de 3000 años, médicos de la antigüedad como, Hipócrates, Galeno, Celso, Plinio el viejo, y Discorides citan numerosos usos terapéuticos de ajo, como cura para una gama muy amplia de patologías (Siegers *et. al*, 1999).

El ajo se utilizó en formulaciones terapéuticas en la época de los Egipcios aproximadamente en el año 1550 A. C. Así mismo, en Grecia era consumido para tratar desordenes intestinales. En 1858, Louis Pasteur reportó las propiedades antibacteriales del ajo. En India se ha utilizado por siglos como antiséptico en

ulceras. En la Segunda Guerra Mundial, el ajo fue empleado para tratar las heridas de los soldados. Más de 3000 referencias bibliográficas avalan la eficacia de esta planta (Farbman *et. al*, 1993).

3.3 Composición del ajo

El ajo contiene en todas sus partes, principalmente en el bulbo, una sustancia sulfurada inodora llamada aliina (S alil-L cisteina sulfoxido). La aliina, por la acción de una enzima contenida en los ajos, la aliinasa, primero se convierte en alicina, y después en disulfuro de alilo, con el característico olor a ajo, como se observa en la figura 1.

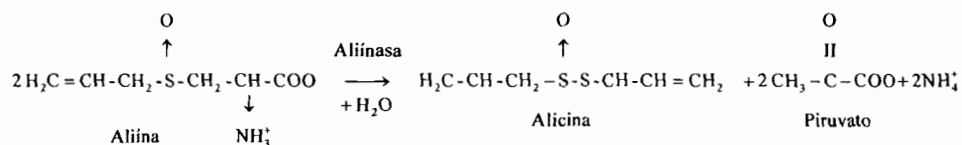


Figura 1. Conversión de Aliina en Alicina (Lawson y Wang, 2005).

El ajo fresco contiene agua, carbohidratos, proteínas, fibras y ácidos grasos, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales particularmente selenio (Haydar *et. al*, 2005).

El ajo contiene 0.1 - 0.36 % de compuestos volátiles de aceite, el aceite de ajo se obtiene por vapor de destilación de bulbos frescos (Banerjee y Maulik, 2002).

Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas del ajo (Haydar *et. al*, 2005).

| | |
|------------------------------|--------|
| Humedad | 66.32% |
| Aceite crudo | 0.34% |
| Fibra cruda | 2.17% |
| Extracto soluble en agua | 18.4% |
| Acidez | 0.172% |
| Proteína cruda | 9.26% |
| Energía liberada (Kcal/100g) | 410.7 |
| Cenizas | 2.30% |
| pH | 6.05 |
| Aceite esencial | 0.14% |

3.4 Componentes con actividad biológica del ajo.

El ajo contiene principalmente los compuestos de sulfuros: Alicina, Dialildisulfuro, Dialiltrisulfuro, etc. (Cuadro 2). Estos compuestos son los responsables de la mayoría de las propiedades farmacológicas del ajo (Knowles y Milner 2001).

Cuadro 2. Principales componentes organosulfurados en ajo

| Compuesto | Estructura Química | Abreviación |
|---------------------------------|--|-------------|
| Compuestos Liposolubles | | |
| S-Alil cisteína sulfóxido | $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CH}_2 - \text{S}(\text{O})-\text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$ | Aliina |
| Tiosulfinato de dialilo | $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CH}_2 - \text{S}(\text{O})-\text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}=\text{CH}_2$ | Alicina |
| Ajoene | $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CH}_2 - \text{S}(\text{O})-\text{CH}_2 - \text{CH}=\text{CH}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2 - \text{CH}=\text{CH}_2$ | Ajoeno |
| Dialil sulfuro | $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CH}_2 - \text{S}-\text{S}-\text{CH}_2 - \text{CH}=\text{CH}_2$ | DAS |
| Dialil disulfuro | $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CH}_2 - \text{S}-\text{S}-\text{CH}_2 - \text{CH}=\text{CH}_2$ | DADS |
| Dialil trisulfuro | $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CH}_2 - \text{S}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2 - \text{CH}=\text{CH}_2$ | DATS |
| Compuestos hidrosolubles | | |
| S-Alil cisteína | $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CH}_2 - \text{S}-\text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$ | SAC |
| S-Alil mercapto cisteína | $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CH}_2 - \text{S}-\text{S}-\text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$ | SAMC |
| Alil mercaptano | $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CH}_2 - \text{S}-\text{H}$ | AM |

La actividad biológica del ajo se debe a su contenido de compuestos a base de azufre. Estos compuestos son precursores sulfoxidos de la L-cisteina (Estrada, 2004).

La Alicina (dialiltiosulfinato) es uno de los principales compuestos activos formados en el ajo y representa cerca del 70% de los tiosulfatos formados cuando se cortan o maceran los dientes de ajo (Miron *et. al*, 2002).

La alicina es precursor de varios productos de transformación, incluidos ajoenos, vinilditiinos, oligosulfuros, dependiendo de las condiciones aplicadas como temperatura y tipo de solvente de extracción (Hirsch *et. al*, 2000).

La alicina es un compuesto oloroso y extremadamente inestable, la cual se descompone en compuestos volátiles, S-Alil mercaptocisteina (SAMC), dialil sulfuro (DAS), dialil disulfuro (DADS), dialil trisulfuro (DATS), S-alil cisteina (SAC) y ajoene; muchas veces confundida con aceite de ajo debido a que no esta presente en ajo intacto (Hirsch *et. al*, 2000).

Se ha reportado que alicina es producida por los microsomas del hígado a partir de dialil disulfuro (Hirsch *et. al*, 2000). Otro efecto biológico de la alicina es su rápida reacción con los compuestos que contienen grupos tioles, lo que puede afectar a diversas proteínas celulares (Prasad *et. al*, 1995).

3.5 Uso terapéutico general del ajo

El ajo ha sido utilizado por todo el mundo, como un agente medicinal y terapéutico (Kyo *et. al*, 2001).

En general el ajo, es usado en el tratamiento, de hipertensión, aterosclerosis, diarrea, disentería amebiana, difteria, vaginitis, y otros

padecimientos. Se le atribuyen al ajo diversas funciones para la prevención de enfermedades (Keiss *et. al*, 2003).

Por otra parte, se han reportado los beneficios del ajo en padecimientos cardiovasculares, debido a su habilidad para disminuir el colesterol sérico (Ali *et. al*, 2000), así como efectos hipoglucemiantes, antitrombóticos, antimicrobianos y antioxidantes, entre otros (Patya *et. al*, 2004).

El ajo inhibe la coagulación sanguínea, mejorando la circulación y la presión sanguínea (Banerjee y Maulik, 2002).

El ajo ejerce actividad antimicrobiana contra bacterias gram-positivas y gram-negativas, virus, hongos y parásitos intestinales (Tattelman, 2005).

3.6 Uso del ajo en la prevención del cáncer

El cáncer es una enfermedad que se manifiesta como una división celular incontrolada, la transformación de células normales en células neoplásicas incluye tres procesos; iniciación, promoción y progresión. Actualmente se considera un problema de salud pública en el ámbito mundial debido a su amplia distribución e incidencia, la cual se calcula en 10 millones de nuevos casos por año (WHO, 2003). En México, el cáncer es una de las principales causas de muerte, con 25,000 muertes en el año 2003 (Secretaría de Salud, 2003).

Los factores ambientales, como los hábitos en la dieta son un factor importante de riesgo de cáncer (Young *et. al*, 2000).

El tratamiento para el cáncer, como la cirugía, la radiación y los fármacos o agentes quimioterapéuticos tienen resultados variables en función de la evolución del tumor y estado del huésped (Knowles y Milner 2001). Los tratamientos descritos, no son selectivos y dañan las células normales del organismo, como

consecuencia, los pacientes sufren severos efectos colaterales, por lo que en la actualidad toma gran importancia la quimioprevención a través de sustancias químicas puras o mediante constituyentes naturales de los alimentos (Stoner *et. al*, 1997).

En 1990 el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos diseñó un programa de alimentación para determinar cuáles alimentos jugaban un importante papel en la prevención de cáncer, concluyendo que el ajo puede ser el alimento con mayor potencial para la prevención de cáncer (Das, 2002).

El uso del ajo en el tratamiento de tumores data de 1550 años antes de cristo, los antiguos egipcios lo administraban oral y tópicamente; Sin embargo el efecto antitumoral del ajo se demostró experimentalmente cuando Weisberger y Pensky (1958) demostraron *in vitro* e *in vivo* que extractos de ajo inhiben el crecimiento de células malignas y previene el crecimiento de sarcoma 180, un tumor ascítico (Knowles y Milner 2001).

La actividad anticancerígena de varios extractos de ajo y sus componentes químicos, se han evidenciado en estudios *in vivo* e *in vitro* (Thomson y Ali, 2003). La protección anticancerígena del ajo no está limitada a un solo tipo de tejido o a un tipo particular de carcinógeno (Young *et. al*, 2000).

Los estudios realizados *in vivo*, e *in vitro* del ajo y sus respectivos constituyentes sugieren posibles efectos de prevención de cáncer, esta protección puede presentarse por varios mecanismos incluyendo: bloqueo en la formación de compuestos N-nitroso (NOC)², supresión en la bioactivación de varios agentes carcinogénicos, incremento en la reparación del ADN, reducción en la proliferación celular y/o inducción de apoptosis de células tumorales (Milner, 2001).

Uno de los posibles mecanismos de acción de los derivados de ajo es la inhibición de la enzima citocromo P450 2E1. Estas enzimas activan un número de sustancias xenobióticas, incluyendo carcinógenos tales como nitrosaminas, hidrazinas e hidrocarburos halogenados (Brady *et. al*, 1991).

Investigaciones de laboratorio muestran la eficacia de los compuestos hidrosolubles y liposolubles del ajo que proporcionan estos efectos anticarcinogenicos benéficos (Kun y Milner 2001).

Evidencias sugieren que los derivados de ajo pueden bloquear la expresión nuclear de factores de transcripción de proteínas y regular la progresión de células tumorales (Pinto y Rivling 2001).

Algunas investigaciones indican que el ajo puede modular la respuesta inmune mediante la proliferación de células T e incremento de actividad de células Natural Killer (Zuhair, 2003).

Los estudios del efecto antitumoral del ajo se han realizado primordialmente mediante la epidemiología, aunque existen también varios estudios *in vitro* y muy pocos *in vivo*, como se menciona en los siguientes apartados.

3.7 Estudios epidemiológicos

En los últimos años, numerosos estudios epidemiológicos han demostrado relación entre el consumo de ajo y una mejor salud (Bianchini y Vainio, 2001).

Las primeras evidencias anticarcinogénicas del *Allium* provienen de China en la prevención de cáncer de estomago, en un estudio realizado en dos provincias de China, atribuyen al consumo del ajo, la baja incidencia de muerte con un consumo de aproximadamente 20 g/día con un bajo riesgo en el área y menos de 1 g/día un alto riesgo en el área (Bianchini y Vainio, 2001).

Se ha reportado que el ajo y sus componentes sulfurados disminuyen la incidencia de tumor de mama, colon, piel, uterino, esófago y pulmón (Milner, 2001).

Estudios en Asia y Europa valoraron el efecto antitumoral del ajo en el riesgo de cáncer de estómago (Bianchini y Vainio, 2001). Otros reportes indican la disminución de riesgo de cáncer con un aumento en el consumo de ajo (Young *et al.*, 2000).

La asociación entre el consumo de ajo y la disminución de riesgo de contraer cáncer ha sido evaluada en varios estudios epidemiológicos en China, Italia y Norteamérica, donde se ha demostrado que el riesgo de cáncer está inversamente asociado al consumo de ajo (Pinto y Rivling 2001).

Existen limitaciones en la definición del papel exacto que el ajo tiene en el proceso canceroso. El efecto protector es mantenido por estudios epidemiológicos y preclínicos. Resultados epidemiológicos acerca del ajo, como componente dietético anticancerígeno es presentado en un artículo de revisión donde se concluye que el cáncer de estómago y colon son principalmente protegidos por el consumo de ajo (Fleischauer y Arab, 2001).

Un estudio reciente, demostró que el consumo de ajo crudo reduce el riesgo de cáncer en las personas, en un 60%. Asimismo, las personas que consumen menor cantidad de ajo, tienen mayor incidencia de cáncer (19% contra 15.5%) (Bianchini y Vainio, 2001).

3.8 Citotóxicidad del ajo en líneas tumorales *in vitro*

Algunos componentes del ajo han demostrado su capacidad para inhibir el crecimiento de líneas celulares tumorales de colon y próstata (Knowles y Milner, 2001). Los Alil sulfuros presentes en el ajo son efectivos en retardar la iniciación y promoción de las fases de la carcinogénesis (Knowles y Milner 2001).

La alicina inhibe la proliferación de las líneas de carcinoma mamario humano (MCF-7), endometrial (llamado carcinoma Ishikawa) y colon (HT-29) a una concentración de 10 -25 μ M (Hirsch *et. al*, 2000).

La supresión de células tumorales por compuestos derivados de ajo se ha evaluado en diferentes cultivos celulares. Tales como células de colon humano, pulmón, piel, células humanas de neuroblastoma, melanoma murino y células de carcinoma de próstata (Bianchini y Vainio, 2001).

3.9 Estudios *in vivo*

Los estudios experimentales *in vivo*, son escasos. Sin embargo hay algunos como se muestran a continuación.

Estudios con animales experimentales demuestran que la administración, vía oral de ajo, así como sus componentes purificados inhiben tumores inducidos químicamente (Samaranayake *et. al*, 2000).

En un estudio evaluando el efecto quimiopreventivo del extracto de ajo, en hepatocarcinoma en ratas Wistar inducido por N-nitrosodietilamina, la administración de extracto de ajo a 250 mg/kg redujo la masa tumoral del hígado indicando supresión de carcinogénesis (Sundaresan y Subramanian 2002).

4. JUSTIFICACION

El riesgo de cáncer en la actualidad se incrementa de forma notable, por lo que diversos grupos de investigación se enfocan en la búsqueda de nuevas sustancias para la quimioprevención de esta enfermedad. Algunos productos naturales muestran un interesante potencial de uso como agentes antitumorales.

El ajo ha sido empleado a lo largo de la historia como tratamiento de una gran variedad de enfermedades como hipertensión, aterosclerosis, padecimientos gastrointestinales y otras mas, incluyendo la inhibición del desarrollo de células tumorales (Dausch *et. al*, 1990).

Actualmente existen modelos *in vivo e in vitro* para evaluar el potencial anticancerígeno de las sustancias, uno de estos modelos es el linfoma murino L5178Y, el cual ha sido utilizado para demostrar la actividad antitumoral de varios productos naturales (Dzhambazov *et. al*, 2002).

Numerosas investigaciones realizadas reportan la efectividad del extracto acuoso de ajo, por su alto contenido de sulfuros principalmente Alicina. Sin embargo, en este trabajo se plantea evaluar la actividad citotóxica en la línea L5178Y y el efecto antitumoral en ratones con linfoma.

5. OBJETIVO GENERAL

- EVALUAR LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTITUMORAL DEL EXTRACTO ACUOSO DE AJO (*Allium sativum*) EN EL MODELO MURINO CON LINFOMA L5178Y

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener un extracto acuoso de ajo mediante maceración.
- Determinar la presencia de alicina en el extracto mediante cromatografía de capa fina.
- Evaluar *in vitro* la actividad citotóxica del extracto acuoso de ajo sobre las células tumorales de linfoma murino L5178Y.
- Evaluar *in vivo* la actividad antitumoral del extracto de ajo en ratones Balb/C con linfoma murino L5178Y.

6. HIPOTESIS

El extracto acuoso de ajo es citotóxico en las células L5178Y e incrementa la sobrevivencia de ratones con linfoma L5178Y.

7. METODOLOGÍA

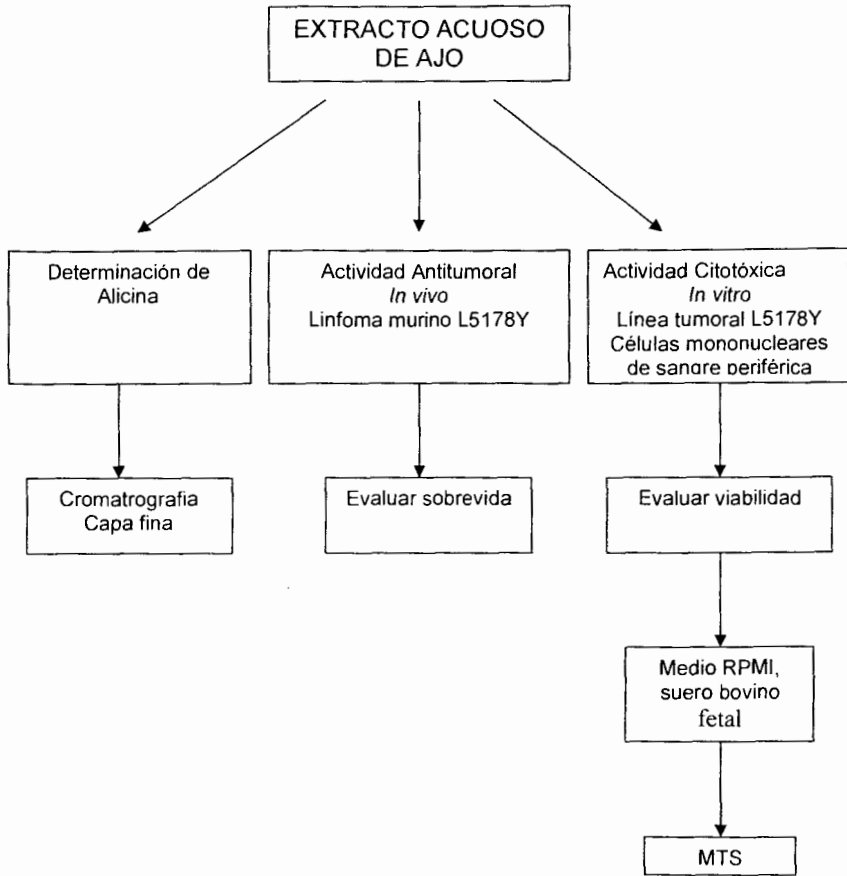


Figura 2. Esquema general de Metodología

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Material biológico

Animales de experimentación: se utilizarón ratones singénicos Balb/C machos de 20 a 30 g, formados por grupos de 4 animales, alojados en jaulas de policarbonato. Los animales fueron proporcionados por el Zooterio de la U de G. Se mantuvieron en condiciones de temperatura controlada a 25° C y ciclos alternos de Luz-oscuridad de 12 h, alimentados con una dieta balanceada especial para roedores (Nutricubos) y agua purificada a libre acceso.

Células tumorales: Se utilizó como modelo el linfoma murino L5178Y, el cual es un Linfoma Tipo T.

La línea celular L5178Y se originó en la Universidad de Filadelfia, las células son mantenidas a 37°C a una atmósfera de 5% de CO₂. Esta línea tumoral es derivada del linfoma murino tímico (H-2d) y es mantenido mediante transplantes intraperitoneales sucesivos de células tumorales (Puebla, 1998).

8.2 Preparación de extracto acuoso de ajo (*Allium sativum*)

El ajo proviene del Estado de Michoacán. 1 g de dientes de ajo se macera con 2 ml de agua destilada en un mortero, se deja reposar durante 10 minutos y posteriormente se filtra a través de papel Whattman 41 y se esteriliza a través de un filtro Millipore de poro 0.4 µm. Debido a que la alicina es el principal componente con actividad biológica en el ajo, se trata de obtener un extracto acuoso con un alto contenido de alicina.

8.3 Análisis cualitativo para identificación de alicina en el extracto acuoso de ajo.

La metodología para la identificación de alicina en el extracto acuoso de ajo se realizó de acuerdo a (CAMAG, 2004) y se describe a continuación.

Fase estacionaria

Las placas de sílica gel 60 F254 (Merck), 20 X 20 cm, fueron prelavadas con metanol y secadas en una estufa a 100 ° C por 1 hr con el fin de activarla, se deja enfriar en la cámara al vacío.

Fase móvil

La solución tolueno: acetato de etilo en una proporción (10:3) fue añadida a la cámara de desarrollo de tal manera que el volumen alcanzara una altura de 5 mm por arriba del borde inferior.

Aplicación de la muestra

10 µL de cada uno de los extractos obtenidos y 10 µL de la solución estándar de alicina fueron aplicados a 1 cm del extremo inferior de la placa.

Fase de desarrollo

Después de evaporado el disolvente de la muestra, se colocó la placa en la cámara de desarrollo saturada con los vapores de la fase móvil, los cuales desplazan la muestra hasta una longitud de 6 cm, ya recorrida esta longitud, la placa fue retirada y secada con aire frío por 5 min.

Identificación de la muestra.- UV 254 nm, esto se realizó con una lámpara de luz ultravioleta.

8.4 Ensayos *in vitro*

Estudios de citotóxicidad de los extractos de ajo

Para evaluar la citotóxicidad del extracto acuoso de ajo se realizaron cultivos de células tumorales y (CMSP) por duplicado en medio RPMI con 10% de suero bovino fetal y diferentes concentraciones del extracto acuoso de ajo (0, 10, 50 y 100%).

Los extractos de ajo se determinaron cromatográficamente comparándolos con un estándar de alicina, antes de cada experimentación.

Se resuspendieron 5×10^5 células tumorales L5178Y y en medio RPMI (Gibco, U.S.A) adicionando 10 % de suero bovino fetal (Gibco, Canadá) y se agregó el extracto de ajo. Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Se obtuvieron por punción cardiaca y separación por gradiente de densidad en linfoprep (Axis-shield). Posteriormente, ambos tipos de células se incubaron en placas de 96 pozos a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5 % y 95 % de humedad por 24 horas.

Al final del periodo de incubación se determinó la viabilidad celular mediante el método MTS (Promega, 2005).

8.5 Método de MTS

El método MTS es un método colorimétrico marca Promega, para determinar la viabilidad celular y proliferación. Se utiliza un compuesto de tetrazolio denominado MTS el cual es reducido por células vivas para generar el

compuesto formazan, el cual es soluble en el medio. La producción de formazan es proporcional al número de células vivas.

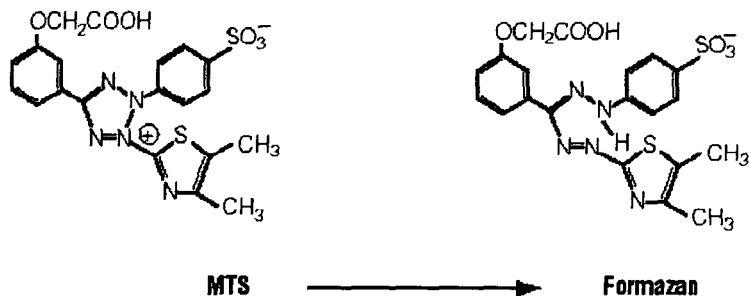


Figura 3. Conversión de MTS a Formazan por células vivas.

El ensayo mide la actividad de las enzimas deshidrogenasas encontradas en células metabólicamente activas.

El reactivo MTS se agregó directamente al cultivo celular, después del periodo de incubación. La reacción se realizó durante 4 horas y posteriormente se leyó la absorbancia a 490nm en un lector de placas para Elisa.

8.6 Estudios de actividad antitumoral

Para evaluar la actividad antitumoral de productos naturales es necesario contar con métodos adecuados para estos fines, uno de los métodos utilizados para evaluar la actividad antitumoral es el modelo de linfoma murino L5178Y, el cual se ha utilizado para evaluar productos de origen natural (Del Toro-Arreola *et. al*, 2005; Dzhambazov *et. al*, 2002).

En este estudio, se utilizarón ratones machos Balb/C sanos de 20 a 30 g de peso a los que se les inyectó por vía intraperitoneal 2×10^4 células de linfoma murino L5178Y.

Después de 24 horas se inició el tratamiento en los grupos de 4 ratones cada uno. El tratamiento se administró por 2 vías intraperitoneal y oral, en cuatro aplicaciones: los días 1, 4, 6 y 8. Para evaluar sobrevida de los ratones por grupo (Patya *et. al*, 2004).

A dos grupos, se les administró el pretratamiento 24 horas antes de inoculación del tumor, transcurridas 24 horas se administró el tratamiento en 3 aplicaciones más.

Se usaron como controles un grupo de ratones portadores de tumor sin tratamiento y dos grupos tratados con solución salina fisiológica administrada por vía oral e intraperitoneal. La dilución de las células tumorales se realizó en solución salina, la cual se utilizó como control.

El extracto de ajo se analizó mediante cromatografía cada día de la administración del tratamiento a los ratones con linfoma.

Se cuantificó el peso de los animales. Asimismo, se registraron las fechas de mortalidad de los grupos tratados y se compararon con los grupos controles para determinar la sobrevida de los animales.

Cuadro 3. Grupos experimentales

| Grupos tratados | |
|------------------------|---|
| Grupo 1 | Linfoma + Extracto de ajo 100 μ L I.p |
| Grupo 2 | Linfoma + Extracto de ajo 100 μ L Oral |
| Grupo 3 | Linfoma + Extracto de ajo 100 μ L I.p (pretratamiento) |
| Grupo 4 | Linfoma + Extracto de ajo 100 μ L Oral (pretratamiento) |
| Grupo 5 | Sanos + Extracto de ajo 100 μ L I.p |
| Grupo 6 | Sanos + Extracto de ajo 100 μ L Oral |
| Grupos control | |
| Grupo 7 | Linfoma + Solución salina I.p |
| Grupo 8 | Linfoma + Solución salina Oral |

8.7 Análisis estadístico

Los resultados de viabilidad, se presentan como promedio \pm desviación estándar. La comparación estadística se realizó mediante la prueba t de Student; la significancia se consideró con un valor de $p < 0.05$. Se utilizó el programa Statgraphics versión 4.

La actividad antitumoral de los extractos se expresó como sobrevida de los ratones mediante pruebas de Kaplan Meier y la comparación estadística de los grupos mediante Regresión de Cox, utilizando el programa SPSS versión 10.

9. RESULTADOS Y DISCUSION

El extracto acuoso de ajo se obtuvo mediante maceración de bulbos frescos. Cabe mencionar que los mayores rendimientos de alicina se obtienen al utilizar agua como solvente y que la utilización de temperaturas elevadas en el proceso de extracción inactivan los precursores de alicina, impidiendo su formación (Amagase *et. al*, 2001).

De las referencias citadas la metodología indica la centrifugación de los extractos de ajo con la finalidad de que las vacuolas al ser dañadas por la fuerza de centrifugación liberen la enzima aliínasa y exista una mezcla entre disolvente y alicina formada, lo cual en este proceso no fue utilizado debido al tiempo de contacto, entre disolvente y ajo y al proceso de maceración utilizado.

Respecto a la identificación de alicina en el extracto acuoso de ajo, esta se realizó mediante cromatografía en placa fina TLC, el cual es un método cualitativo de identificación de compuestos químicos. Sin embargo existen otros métodos para la identificación y cuantificación de alicina, principalmente cromatografía líquida de alta presión HPLC.

En este trabajo se utilizó TLC por la disponibilidad del método en el laboratorio, ya que se requirió comprobar la presencia de alicina en los extractos, cada vez que se administró el tratamiento.

En la cromatoplaque se muestra el extracto acuoso de ajo se desplaza a una misma distancia que el estándar de alicina. Por lo que se infiere que el extracto contiene alicina.

Los resultados del análisis cromatográfico en placas de sílica gel del extracto acuoso de ajo se muestran en la Figura 4. En la placa de sílica gel se observa de izquierda a derecha: 1.- El control negativo (Agua destilada), 2.- El estándar de alicina, 3.- El extracto acuoso de ajo.

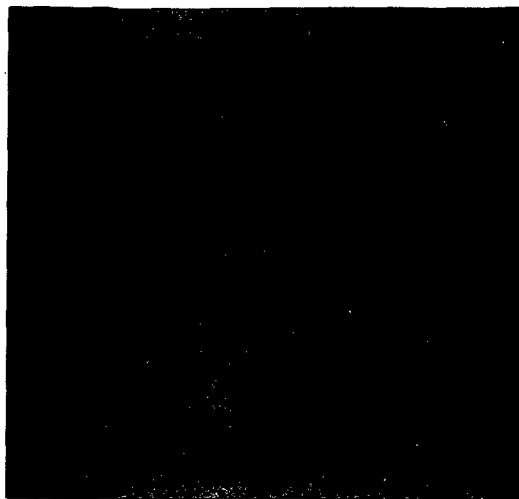


Figura 4. Identificación de alicina.

La identificación de alicina por cromatografía en capa fina es una evaluación rápida para la determinación cualitativa, de tal manera que solo indica la ausencia o presencia de alicina en el extracto.

Estudios de citotoxicidad de los extractos de ajo

El extracto acuoso de ajo mostró un efecto citotóxico en la línea tumoral L5178Y, con la prueba MTS en las concentraciones de 50 y 100% ($p < 0.05$ comparado con el control).

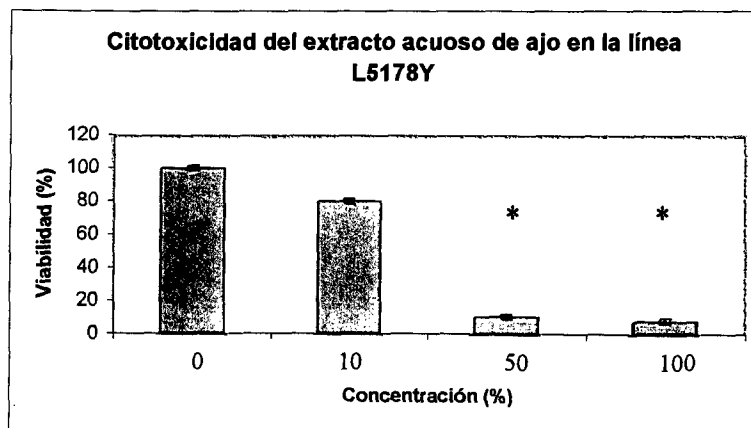


Figura 5. Grafico de citotoxicidad en la línea tumoral L5178Y, mediante el método de MTS (n=5). * $p < 0.05$

La prueba MTS evidencia el efecto citotóxico de las sustancias de prueba, mediante la afectación en el metabolismo mitocondrial.

La prueba realizada en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de ratón, muestra un efecto citotóxico del extracto de ajo al 100%.

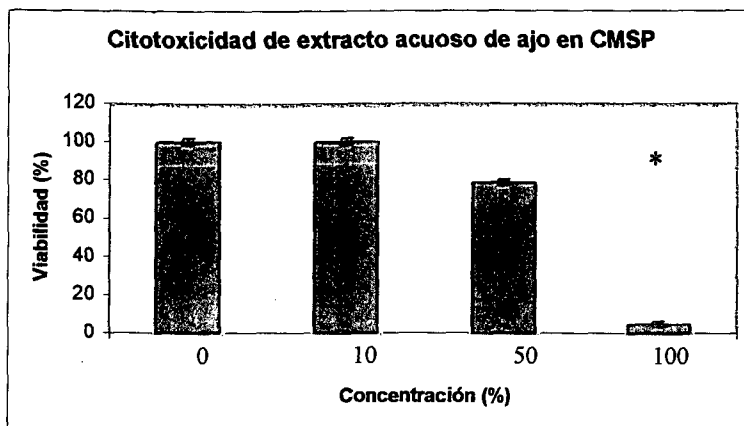


Figura 6. Grafico de citotoxicidad en CMSP, mediante el método de MTS (n=5).
* $p < 0.05$

Estos resultados indican que el extracto de ajo resulta tóxico en la línea L5178Y, lo cual es acorde con varios artículos realizados en otras líneas celulares (Young *et. al*, 2000).

Desafortunadamente, el efecto citotóxico del extracto de ajo no se limitó a la línea L5178Y, sino que también afecto a células normales, aunque en menor grado.

En este aspecto, existen pocos estudios donde se evalúa comparativamente la citotoxicidad de extractos de ajo en células tumorales y en células normales, lo cual es importante para evitar efectos secundarios.

Los resultados de citotoxicidad fueron analizados estadísticamente para observar diferencias significativas. El análisis estadístico se presenta en los siguientes cuadros:

Cuadro 4. Resultados de la prueba estadística (t de student). Prueba de citotóxicidad con L5178Y (n=5).

| Grupos analizados | Valor de t calculado | Valor de p calculado | Decisión |
|--|----------------------|----------------------|------------------------------------|
| Solución salina vs. Extracto de Ajo 10% | T= 1.1628 | P= 0.289 | Diferencia <u>no</u> significativa |
| Solución salina vs. Extracto de Ajo 50% | T= 8.156 | P= 0.0001 | Diferencia significativa |
| Solución salina vs. Extracto de Ajo 100% | T= 7.949 | P= 0.0002 | Diferencia significativa |

Cuadro 5. Resultados de la prueba estadística (t de student). Prueba de citotóxicidad en CMSP de ratón (n=5).

| Grupos analizados | Valor de t calculado | Valor de p calculado | Decisión |
|--|----------------------|----------------------|------------------------------------|
| Solución salina vs. Extracto de Ajo 10% | t= 0.578 | p= 0.583 | Diferencia <u>no</u> significativa |
| Solución salina vs. Extracto de Ajo 50% | t= 2.11 | p= 0.079 | Diferencia <u>no</u> significativa |
| Solución salina vs. Extracto de Ajo 100% | t= 9.95 | p= 0.00005 | Diferencia significativa |

Ensayos *in vivo* actividad antitumoral

En la Grafica de sobrevivida (Figura 7), se observa la sobrevivida de ratones portadores del tumor (inoculados con 2×10^4 células), tratados con solución salina (controles) y los grupos experimentales tratados y pretratados con el extracto acuoso de ajo a razón de 100 μ L de administración, utilizando: la vía de administración oral.

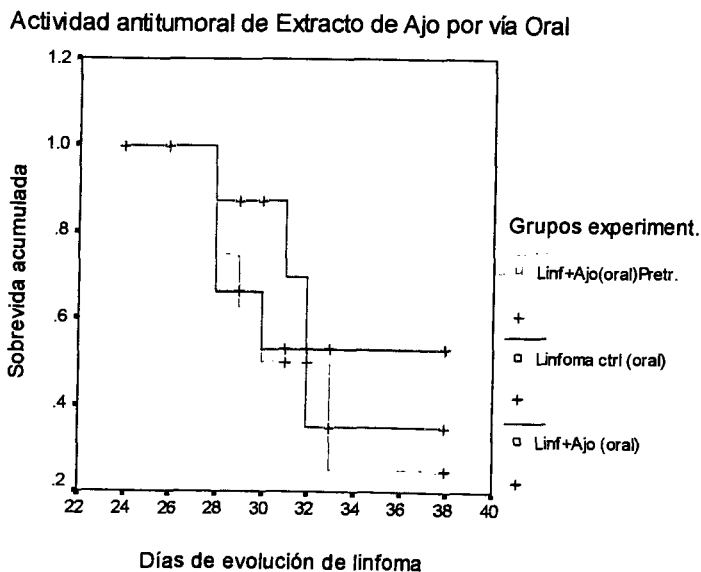


Figura 7. Gráfico de Kaplan Meier. Muestra la sobrevivida de los diferentes grupos experimentales (n=4).

En la Grafica de sobrevivida (Figura 8), se observa la sobrevivida de ratones portadores del tumor (inoculados con 2×10^4 células), tratados con solución salina (controles) y los grupos experimentales tratados y pretratados con el extracto acuoso de ajo a razón de 100 μ L de administración, utilizando la vía de administración intraperitoneal.

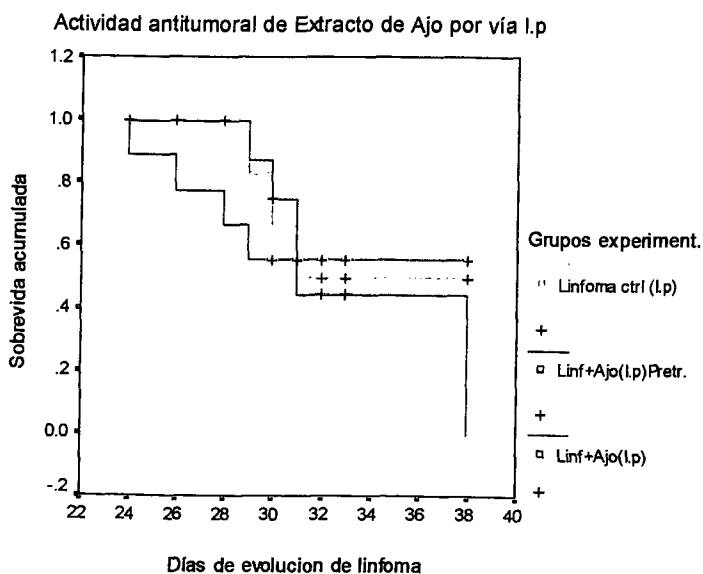


Figura 8. Gráfico de Kaplan Meier. Muestra la sobrevivida de los diferentes grupos experimentales (n=4).

Los grupos que mostraron una mayor sobrevivida fueron los pretratados 24 horas antes de inoculación del tumor, mientras que los demás grupos presentaron un periodo de vida promedio de 30 a 33 días. El mejor resultado se observó por la vía de administración i.p., seguido de la administración oral.

Estos resultados sugieren que el extracto acuoso de ajo pueda tener un efecto quimiopreventivo sobre este modelo de linfoma.

El mecanismo que pudiera estar involucrado en este efecto, así como las moléculas responsables es tema de recientes investigaciones, las cuales mencionan que la inducción de apoptosis en las células tumorales pudiera ser la vía de acción de los componentes del ajo (Herman y Singh, 2005).

Otros autores mencionan como responsable de la actividad antitumoral al sistema inmune mediante la activación de macrófagos, linfoproliferación y liberación de citocinas específicas (Patya, 2004).

10. CONCLUSIONES

El extracto acuoso de ajo tiene actividad citotóxica en la línea tumoral L5178Y a partir de una concentración de 50 y 100%. La concentración de 10 % no mostró actividad citotóxica.

El extracto acuoso de ajo tiene actividad citotóxica en las CMSP únicamente en la concentración de 100%.

La administración de extracto acuoso de ajo, previa a la inoculación del linfoma murino L5178Y, presenta un mejor efecto antitumoral *in vivo*.

Después de 24 horas posterior a la inoculación hay un menor efecto antitumoral observado en los animales con linfoma L5178Y.

La vía de administración intraperitoneal tiene mayor efecto antitumoral que la vía de administración oral.

Los estudios empleando el modelo de linfoma murino ayudan a dirigir las investigaciones sobre los efectos benéficos de productos naturales.

Perspectivas:

Se sugiere realizar estudios de actividad inmunomoduladora con el extracto acuoso de ajo, como parámetros Inmunológicos tales como citocinas, actividad de células Natural Killer, macrófagos, linfocitos. Asimismo sería adecuado cuantificar Alicina y sus principales metabolitos para evidenciar la molécula responsable del efecto biológico.

11.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Ali, M. *et. al*, 2000. .Effect of Allicin from Garlic Powder on Serum Lipids and Blood Pressure in Rats Fed with a High Cholesterol Diet.*Prostagl.Leukot.Essent.Fatty Acids*, 62:253-259.

Amagase, H. *et. al*, 2001. Intake of Garlic and Its Bioactive Components. *J. Nutr*, 955S-956S.

Bianchini, F y Vainio, H. 2001. *Allium* Vegetables and Organosulfur Compounds: Do They Help Prevent Cancer, 109:893-902.

Banerjee S, K, Maulik S, K. 2002. Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. *Nutrition J*, 1(4):1-14.

Brady, J. F., Ishizaki, H., *et. al*, 1991 Inhibition of cytochrome P450 IIE1 by diallyl sulfide and its metabolites. *Chem. Res. Toxicol.* 4: 642-647.

CAMAG 2004 "HPTLC Identification of Garlic (*Allium sativum*)". En línea www.CAMAG.com Abril 23, 2004 .

Caragay, A. B. 1992 Cancer-preventive foods and ingredients. *Food Technol.* 4: 65-68.

Das, S. 2002 Garlic – A Natural Source of Cancer Preventive Compounds. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 3: 305-311.

Daush, J. *et. al*, 1990. Garlic: review of its relationship to malignant disease. *Prev Med* 19:346-352.

Del Toro-Arreola, S. *et. al*, 2005. Effect of d-limonene on immune response in BALB/c mice with lymphoma. *International Immunopharmacology*, 5:829–838.

Dzhambazov, B. *et. al*, 2002. *In Vitro* Screening for Antitumour Activity of *Clinopodium vulgare* L. (Lamiaceae) Extracts. *Biol. Pharm. Bull.* 25(4) 499-504.

Estrada, E. M. 2004. Determinación del contenido de alicina en extracto de ajo. Tesis Licenciatura, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara.

Farbman, K, S. Barnett, E, D. Bolduc, G, R. Klein, J, O. 1993. Bacterial Activity of Garlic and Onions; A Historical Perspective. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 12:613-614.

Fleischauer, A. y Arab, L. 2001. Garlic and Cancer: A Critical Review of the Epidemiologic Literature. *J. Nutr.* 131:1032S–1040S.

García, A. 1998. El ajo cultivo y aprovechamiento. Ed. Mundi-prensa. México.

Haydar, H. *et. al*, 2005. Some nutritional and technological properties of garlic (*Allium sativum* L.) *Journal of Food Engineering* 68:463-469.

Itakura, Y. *et. al*, 2001. How to distinguish garlic from the other *Allium* vegetables. *J. Nutr.* 131:963-967.

Hernan, A. y S. Singh. 2004. Signal transduction pathways leading to cell cycle arrest and apoptosis induction in cancer cells by *Allium* vegetable-derived organosulfur compounds: a review. *Mutat Res.* 555:21-131.

Hirsch, K. *et. al*, 2000. Effect of Purified Alicin, the Major Ingredient of Freshly Crushed Garlic, on Cancer Cell Proliferation. *Nutrition and Cancer*: 38(2):245-254.

Keiss, H. *et. al*, 2003. Garlic (*Allium sativum* L.) Modulates Cytokine Expression in Lipopolysaccharide-Activated Human Blood Thereby Inhibiting NF-kB Activity. *J. Nutr*, 133:2171-2175.

Knowles, L. y Milner, J. 2001. Possible Mechanisms by which Allyl Sulfides Suppress Neoplastic Cell Proliferation. *J. Nutr*, 131:1061S-1066S.

Kyo, E. *et. al*, 2001. Immunomodulatory Effects of Aged Garlic Extract. *J. Nutr*. 131:1075S-1079S.

Kun, S. y Milner, J. 2001. The Influence of Heating on the Anticancer Properties of Garlic. *J. Nutr*. 131:1054S-1057S.

Lawson, L. y Wang, J. 2005. Allicin and Allicin-Derived Garlic Compounds Increase Breath Acetone through Allyl Methyl Sulfide: Use in Measuring Allicin Bioavailability. *J Agric Food Chem*. 53:974-1983.

Milner, J. A. 2001. A Historical Perspective on Garlic and Cancer. *J. Nutr*. 131: 1027S-1031S.

Miron, T. *et. al*, 2002. A spectrophotometric assay for allicin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfinates. *Analytical Biochemistry* 307:76–83.

Pinto, J. y Rivling, R. 2001. Antiproliferative Effects of Allium Derivatives from Garlic *J. Nutr*. 131:1058S–1060S.

Patya, M. 2004. Allicin stimulates lymphocytes and elicits an antitumor effect: a possible role of p21 RAS. *International Immunology*. 16:275S-281S.

Puebla, P. *et. al*, 1998. Cytotoxic and Antitumour Activity from *Bursera fagaroides* Ethanol Extract in Mice with L5178Y Lymphoma. *Phytotherapy Research*, 12:545-548.

Prasad, K. *et. al*, 1995. Antioxidant activity of allicin, an active principle in garlic. *Mol Cell Biochem* 148:183-189.

Samaranayake, M. *et. al*, 2000. Inhibition of chemically induced liver carcinogenesis in Wistar rats by garlic (*Allium sativum*). *Phytotherapy Research* 14:564 – 567.

Secretaria de Salud. México. 2003. Sistema Nacional de Investigación en Salud. En línea. www.salud.gob.mx. Octubre 25, 2005.

Siegers, C. *et. al*, 1999. The effects of garlic preparations against human tumor cell proliferation. *Phytomedicine* 6:7-11.

Stoner, G. *et. al*, 1997. Perspectives in Cancer Chemoprevention. *Environ Health Perspectives*. 105 Suppl. 4:945-954.

Sundaresan, S. y Subramanian, P. 2002. Evaluation of Chemopreventive Potencial of Garlic Extract on N-Nitrosodiethylamine-Induced Hepatocarcinoma in Rats. *Pharmaceutical Biology* 40:548-551.

Tattelman, E. 2005. Health Effects of Garlic. *American Family Physician* 72:103-106.

Thomson, M. y M. Ali. 2003. Garlic [*Allium sativum*]:A Review of its Potential Use as an Anti-Cancer Agent. *Current Cancer Drug Target*. 3:67-81 67.

WHO. 1993. Cancer. Página electrónica de la World Health Organization.
www.who.int/cancer. Mayo 12, 2004.

Young, H. *et. al*, 2000. Effects of allyl sulfur compounds and garlic extract on the expressions of Bcl-2, Bax and p53 in non small cell lung cancer cell lines. *Exp. Mol. Med.* 32:127S- 134S.

Promega 2005. Boletín técnico. En línea. www.promega.com. Junio 12, 2004.

Zuhair, M. 2003. Immunomodulatory affect of R10 fraction of garlic extract on natural killer activity. *International Immunopharmacology.* 3:1483- 1489.