

Actividad antiproliferativa *in vitro* e *in vivo* de un producto de origen vegetal (Green Sap)/Onconat sobre líneas celulares tumorales

Claudia Anesini*, Maria Laura Barreiro Arcos, Claudio Coirolo[#], Ana María Genaro and Graciela Cremaschi.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO-CONICET), *Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA-UBA-CONICET), Buenos Aires, Argentina and [#] Laboratorio LABECO, Uruguay.

Introducción

El 80 % de la población mundial recurre a extractos elaborados a partir de plantas medicinales como recursos primarios de salud. Numerosas drogas anticancerígenas de uso actual, derivan de microorganismos, entre ellas, dactinomicina y doxorubicina, o de plantas, en el caso de la vinblastina, irinotecan, topotecan, vincristina, taxanes, etc.

El producto GREEN SAP es una mezcla de tres tinturas correspondientes a ***Rosmarinus officinalis***, ***Plantago major*** y ***Baccharis articulata* L.** Este producto es ampliamente utilizado como suplemento dietario en pacientes con diferentes tipo de cáncer, como ser pancreático y mamario. Extractos acuosos obtenidos a partir de hojas de ***Baccharis articulata*** son utilizados popularmente como diurético y digestivo, principalmente en el sur de Brasil, Uruguay y Argentina. Extractos crudos acuosos presentan actividad antioxidante y antiviral. En medicina tradicional ***Rosmarinus officinalis*** es utilizada como analgésico de eficacia moderada, sedante, diurético, antibacteriano y antioxidante. También son conocidas sus propiedades quimiopreventivas y antimutagénicas. El género ***Plantago*** es utilizado en medicina popular por sus propiedades anticancerígenas. ***Plantago major*** es utilizado en las Islas Canarias, Chile, Venezuela y Panamá en el tratamiento de tumores. Se han reportado también, efectos citotóxicos, antivirales e inmunomoduladores.

Ensayo *in vitro*

En el presente trabajo la actividad antiproliferativa de un producto comercial de origen vegetal (Green Sap) fue evaluada *in vitro* sobre un linfoma T murino, a saber la línea BW5147. Para ello, se realizaron estudios dosis-respuesta a diferentes tiempos, en presencia o ausencia de distintos extractos. La respuesta sobre la proliferación celular fue determinada a través de la incorporación de timidina tritiada al ADN celular. Los extractos analizados fueron: 1- TM (tintura madre, compuesta por tres tinturas individuales: ***Baccharis articulata***, ***Rosmarinus officinalis*** y ***Plantago major***), 2- PF1 (dilución 1:10 de TM en agua, conteniendo 5 % v/v de alcohol), 3- PF3 (igual que PF1 pero con una concentración de alcohol del 15 % v/v). Todos los extractos, TM, PF1 y PF3, presentaron actividad antiproliferativa sobre las células de linfoma. Este efecto fue dependiente de la concentración y fue observado a 24, 48 y 72 hs de cultivo, alcanzando un efecto máximo a las 48 horas de cultivo (Tabla 1). También se encontró una acción sinérgica entre las tres tinturas individuales, componentes de los extractos. La observación microscópica utilizando un colorante de exclusión, demostró que TM y PF ejercieron, a las 24 hs de cultivo, una actividad citostática, sin modificaciones de la viabilidad celular. Sin embargo, efectos citotóxicos, se manifestaron en tiempos de cultivo mayores (Tabla 2). Estos resultados fueron confirmados utilizando otra línea celular correspondiente a un linfoma T derivado de ratones BALB/c, denominada LBC. Nuevamente, TM y PF presentaron acción antiproliferativa concentración y tiempo dependientes sobre las células LBC. El máximo efecto fue alcanzado a las 48 horas de cultivo (% de inhibición para TM: 1/500: 99 ± 0.5,

1/2000: 78.7 ± 0.6 , 1/4000: 41 ± 0.3 ; para PF3: 1/50: 98.9 ± 0.8 , 1/200: 89 ± 0.7 , 1/400: 79 ± 0.5).

Conclusiones

Teniendo en cuenta estos resultados, se puede concluir que ambos extractos TM y PF ejercen una importante actividad antiproliferativa sobre las líneas de linfoma estudiadas. Estos hallazgos justifican el estudio de la evaluación de estas acciones sobre el comportamiento biológico *in vivo* de estos linfomas, inoculados en ratones singéneos.

TABLA 1: Efecto inhibitorio de los extractos sobre la proliferación de las células BW5147 durante 48 horas de cultivo celular.

DILUCION ^a	TM	DILUCION ^a	PF1	PF3
	% Inhib ^b		% Inhib ^b	% Inhib ^b
1/100	$99.4 \pm 0.4^*$	1/10	$98.8 \pm 0.9^*$	$99.5 \pm 8.0^*$
1/500	$80.0 \pm 0.5^*$	1/50	$86.4 \pm 2.7^*$	$87.5 \pm 6.0^*$
1/1000	$38.8 \pm 0.9^*$	1/100	$31.0 \pm 0.4^*$	$73.7 \pm 1.2^*$
1/2000	$25.1 \pm 1.1^*$	1/200	$13.8 \pm 1.1^{\#}$	$30.6 \pm 2.0^*$
1/4000	9.7 ± 0.2	1/400	11.5 ± 3.8	$24.0 \pm 2.1^*$

^a Se utilizaron diluciones correlativas de TM y PF.

^b El porcentaje de inhibición fue calculado considerando como 100% la radioactividad incorporada en cultivos basales (en ausencia de extracto o en presencia del correspondiente vehículo alcohólico). Los resultados mostrados corresponden a la media $\pm$ ES de n =5 experimentos realizados por triplicado. Difieren significativamente del basal *con $p \leq 0.01$ o [#] con $p \leq 0.05$.

TABLA 2: Efecto de TM y PF3 sobre la viabilidad celular en los tiempos de cultivo indicados.

Tiempo o (horas)	% de viabilidad celular					
	TM			PF3		
	1/500	1/2000	1/4000	1/50	1/200	1/400
24	61.3 ± 10.9	84.7 ± 5.1	71.7 ± 2.0	72.5 ± 11.4	72.0 ± 6.6	85.6 ± 4.5
48	$50.3 \pm 11.3^*$	80.3 ± 4.1	76.7 ± 0.6	$49.0 \pm 9.8^*$	77.0 ± 3.3	76.7 ± 2.9
72	$34.3 \pm 1.0^*$	$76.7 \pm 1.9^*$	$84.3 \pm 2.8^{\#}$	$24.3 \pm 1.2^*$	$60.4 \pm 2.3^*$	$80.6 \pm 2.8^*$

^a Los porcentajes de viabilidad celular para cada tiempo (media $\pm$ ES de n=3 experimentos) fueron calculados relacionando el número de células vivas (aquellas que no incorporaron el colorante de exclusión, azul tripán) y el número total de células (vivas más muertas; estas últimas se visualizan microscópicamente como células de color azul). Los resultados fueron comparados con los valores promedio basales (células solas o cultivadas durante los mismos tiempos en presencia del vehículo correspondiente). Difieren significativamente de los valores basales con * $p \leq 0.01$ o [#] $p \leq 0.05$.

Ensayo in vivo

La eficacia antitumoral del producto GREEN SAP (PF3) , fue determinada en un ensayo preliminar.

Para ello, se utilizaron 50 ratones hembras de la cepa BALB/c. Todos los ratones fueron inoculados con células tumorales correspondientes a una línea celular de un linfoma T denominado LBC, las que fueron administradas por vía intraperitoneal (106 células/ml). Seguidamente los ratones fueron divididos en 5 grupos de 10 animales cada uno para seguir diferentes tratamientos. Los grupos fueron: 1) tratado con PF3 diluido 1/400 (equivalente a la dosis terapéutica en humanos), 2) control (sin recibir tratamiento con el producto) 3) tratado con PF3 1/200, 4) tratado con PF3 1/50 y 5) tratado con alcohol en una concentración equivalente a la presente en la dosis mas alta de PF3. El tratamiento con PF3 se inició a los 8 días de haber sido inoculadas las células, momento en que la ascitis comienza a hacerse palpable. El producto PF3 fue administrado por vía oral diariamente una vez por día. Durante todo el estudio los animales fueron pesados día por medio, con el fin de registrar cambios en el peso corporal (indicador del incremento del volumen ascítico). Los parámetros estudiados fueron: incremento del peso corporal ($\{ \text{[peso promedio antes del tratamiento - peso promedio después del tratamiento]} / \text{peso promedio antes del tratamiento} \} \times 100$ (Figura 1, incremento del peso corporal en función del tiempo post-inoculación), mortalidad (Figura 2, % mortalidad en función del tiempo post-inoculación) y tiempo de sobrevida se calculó teniendo en cuenta el tiempo vivido por cada ratón desde el momento de la inoculación con las células tumorales, para cada tratamiento, y se expresa como la media conjuntamente con su error standard (Tabla 1). Los animales que fueron muriendo, se colocaron en formol a fin de realizar los estudios de anatomía patológica correspondientes, a evaluar la aparición o desaparición de metástasis.

Conclusiones

Incremento del peso corporal

Animales controles: El incremento de peso guarda una relación exponencial con el tiempo post- inoculación. A medida que pasa el tiempo el peso se incrementa significativamente hasta la mortalidad del 100 % de los animales.

Animales tratados: En este caso hay incremento y descenso del peso corporal durante todo el tiempo que dura el tratamiento, prolongándose el tiempo de sobrevida. Esto parecería ser compatible con el efecto citostático observado “ in vitro”.

Merece destacarse que cuanto mayor es la dosis de PF3 menor es el incremento de peso observado, como ocurre con PF3 1/50 y PF3 1/200. Los animales que quedaron vivos hasta el día de la fecha presentan un incremento de peso del 0 %.

Mortalidad

En todos los casos, correspondientes a los tratados y controles hay mortalidad en función del tiempo post-inoculación.

Controles: Los porcentajes de mortalidad son mayores a tiempos cortos comparados con los tratados. Alcanzándose una mortalidad de un 100 %.

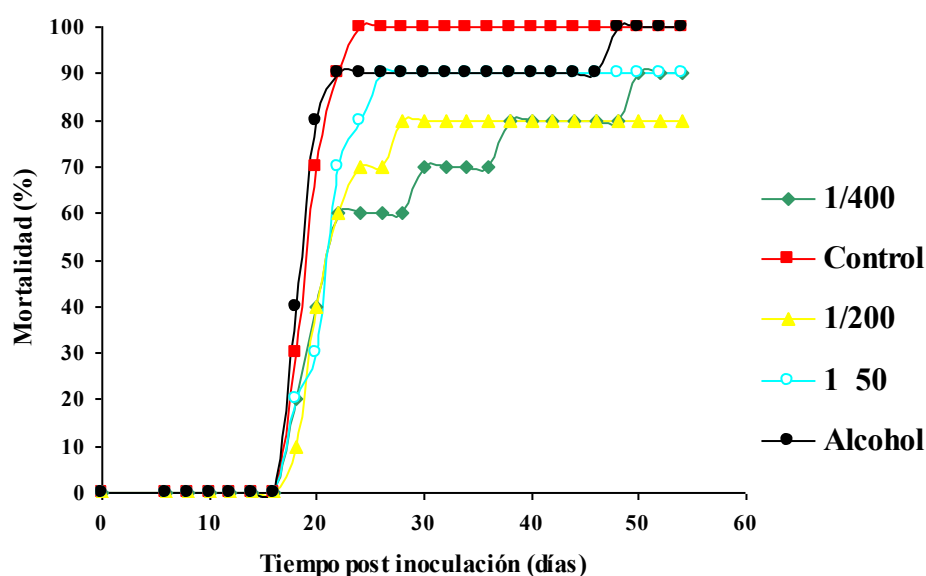
Tratados: Con la dosis terapéutica el mismo porcentaje de mortalidad observado con las otras dosis e incluso con los controles se produce en tiempos mas prolongados, indicando un mayor porcentaje de sobrevida de los animales. En los animales tratados la mortalidad no llegó al 100 %. Hasta el día de la fecha se mantienen vivos, 1 animal correspondiente a la dosis terapéutica, 2 de la dosis 1/200 y 1 de la dosis 1/50.

Tabla 1. Tiempo de sobrevida de los animales controles y de los tratados con PF3.

Tratamiento	Dosis terapéutica (1/400)	Dosis 1/200	Dosis 1/50	Control	Alcohol
Tiempo de sobrevida ($\bar{X} \pm \text{ESM}$)	$39,2 \pm 13,3$	$47,5 \pm 17,9$	$34,3 \pm 13,4$	$19 \pm 0,61$	$23 \pm 3,75$

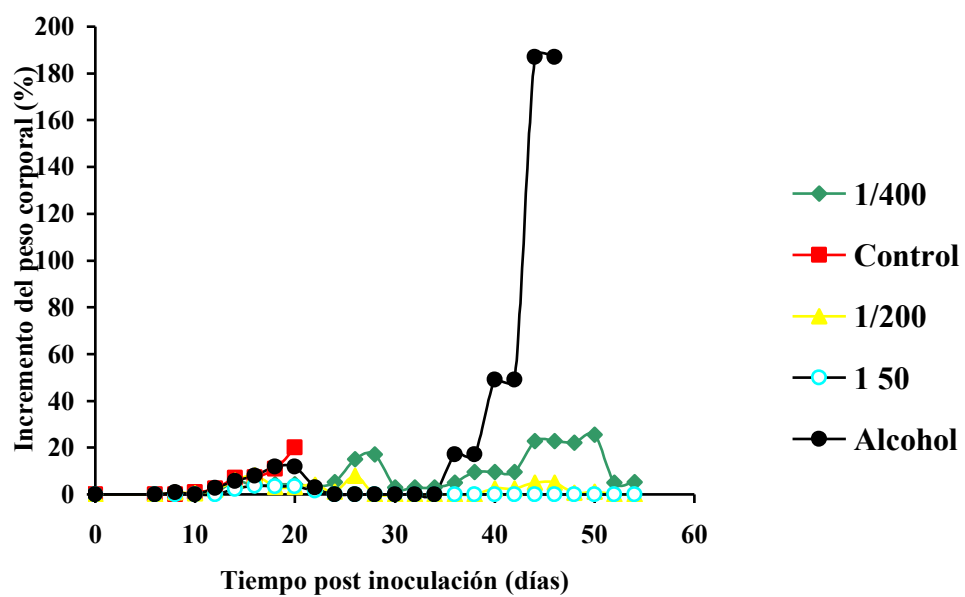
Nota: Los valores de tiempo de sobrevida correspondientes a dosis terapéutica, 1/200 y 1/50 podrían ser aún mayores ,ya que existen animales vivos al día de la fecha: 1 de la dosis terapéutica, 2 de la dosis 1/200 y 1 animal correspondiente a la dosis 1/50. Estos valores se obtuvieron teniendo en cuenta la sobrevida hasta el 10 de febrero de 2005 (155 días post inoculación).

GRÁFICO 1: MORTALIDAD EN FUNCIÓN DEL TIEMPO POSTINOCULACIÓN



155 días post inoculación: 90 % mortalidad 1/400, 80 % 1/200 y 90 % 1/50

GRÁFICO 2: INCREMENTO DEL PESO CORPORAL EN FUNCIÓN DEL TIEMPO POST-INOCULACIÓN



155 días post-inoculación: 1/400, 1/200 y 1/50 incrementos de peso 0 %