

Instituto de Oncología y Radiobiología (INOR)
Unidad de Evaluación e Investigación de Productos Antitumorales
Departamento de Ensayos Preclínicos

Actividad antitumoral de extractos de plantas de la flora cubana frente a la Leucemia Linfocítica P-388

Dra. Yamila Colom Loo,¹ Lic. Mairelys Azcue Ferrera,² Lic. Rita M. Pérez Gil,³ Dra. Mabel Respall Robledo,⁴
Dr. Relman Ruiz García⁵ y MSc. Waldo Quesada Cepero⁶

Resumen

La búsqueda de compuestos naturales con actividad antineoplásica es una de las prioridades actuales en la lucha contra el cáncer, en todos los países del mundo. El creciente empleo de la medicina verde en la prevención y cura de diferentes enfermedades ha llevado a la evaluación antitumoral de nuevos extractos de plantas, principalmente pertenecientes a la flora autóctona de cada país. En el presente trabajo se evaluó la actividad antitumoral de 27 extractos obtenidos de plantas de la flora cubana en el tumor señal murino Leucemia Linfocítica P-388 trasplantado en ratones B₂D₆F₁. Los animales recibieron tratamiento durante 9 días por vía intraperitoneal. En todos los casos se determinó el aumento del tiempo de supervivencia respecto al grupo control negativo, después de 30 días de observación. De los productos estudiados se observó actividad antitumoral en 2 extractos frente a la Leucemia Linfocítica P-388, lo que las hace candidatas a ser estudiadas química y farmacológicamente con amplias perspectivas de convertirse en posibles productos para el tratamiento del cáncer.

Palabras clave: Actividad antitumoral, cáncer, extracto de plantas, tumor señal murino P-388.

Una de las prioridades del Sistema Nacional de Salud es realizar investigaciones que puedan conducir a la obtención de nuevos medicamentos para el tratamiento del cáncer, o para el mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes aquejados de esta enfermedad.

La obtención de nuevos fármacos debe estar dirigida a garantizar la reducción de la diseminación de las células tumorales por el organismo (metástasis), responsable del fracaso de los tratamientos y a la búsqueda de productos que eleven la respuesta inmune del paciente deprimido debido al tratamiento o a la propia enfermedad.

En los últimos años se ha generado una intensa búsqueda de nuevos agentes antitumorales de diversas

fuentes de origen, entre ellas, de la flora autóctona cubana. Las plantas han sido fuente de medicamentos de amplio uso en la quimioterapia del cáncer como los alcaloides de la *Vinca* y más recientemente el Taxol y las Camptothecinas.¹

Las quinonas tienen una importancia marcada en la búsqueda de sustancias antitumorales a partir de plantas, ya se han aislado compuestos tales como el Lapachol y la Jacaranona, con actividad frente a algunos tumores.²

Las plantas presentan una composición muy variada en su estructura y de ellas son diversos los compuestos activos que manifiestan efecto antitumoral. Por estas razones la búsqueda de agentes antitumorales a partir de plantas continúa siendo una tarea de interés en la obtención de mecanismos novedosos de actividad antitumoral.

Dado los resultados de estudios antitumorales *in vitro* de plantas de diferentes familias frente a líneas tumorales murinas y humanas,³⁻⁷ en el presente trabajo se evalúa la actividad antitumoral de 27 extractos de plantas de la flora cubana, fundamentalmente de la familia Euphorbiaceae, con el objetivo de obtener nuevos compuestos que puedan servir de base de posibles medicamentos antitumorales.

Métodos

Especie animal y línea. Se emplearon ratones machos de la línea B₂D₆F₁ entre 18-20 g de peso corporal, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Todos los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura (21- 25° C), humedad relativa (50- 70 %) y ciclos de luz de 12 h/día, alimentados a voluntad con pienso en forma de pelotillas suministrado por CENPALAB y agua acidulada.

Preparación de los extractos. En este experimento se evaluaron 27 extractos de las familias Zingiberaceae, Papaveraceae, Malvaceae, Polipodeaceae, y Euphorbiaceae, los que se codificaron según las normas establecidas en el Laboratorio de Oncofarmacología del INOR. Los extractos se obtuvieron de las hojas y frutos de las plantas recolectadas en el Jardín Botánico Nacional y otras zonas de la Habana y clasificadas por la especialista del Jardín Botánico DraC. *Cristina Panfet*.

Extractos de bajo peso molecular (BPM). El material vegetal previamente lavado se secó en una estufa bajo corriente de aire a una temperatura menor de 40° C, se molió en un molino de cuchillas y se pesó. El material molido se extrajo previamente con éter de petróleo en una relación 1:2 (p:v) a temperatura ambiente con agitación durante 24 h. Se filtró este extracto etéreo y se procedió a secar a temperatura ambiente el material vegetal. El material seco se extrajo con etanol al 95 % en una relación 1:10 (p:v) con agitación en una zaranda. Los extractos previamente filtrados se concentraron a sequedad bajo presión reducida en un rotaevaporador a una temperatura menor de 40° C.

Extractos de alto peso molecular (APM). El material vegetal se cortó finamente, se pesó y lavó 2 veces, primero con agua corriente y después con agua destilada. Se procedió a su secado con ayuda de una gasa.

La extracción se realizó con agua destilada 10 % (p:v) durante 24 h a temperatura ambiente y con agitación en una zaranda. Esta extracción se realizó 2 veces. Los extractos se filtraron, se unieron, y concentraron por rotaevaporación a presión reducida en un rotaevaporador hasta un volumen de 1 L, a una temperatura menor de 40° C. La eliminación del agua restante se realizó por liofilización.

Selección de las dosis. Se realizó un estudio previo de toxicidad a cada extracto con dosis de 400, 200 y 100 mg/kg definidas por el Laboratorio de Oncofarmacología del INOR, excepto para los extractos QT2B02, QT2B015 y QT2B38, en que se emplearon dosis inferiores por dificultades con la solubilidad del extracto en la solución de cloruro sodio al 0,9 % (NaCl). A partir de los resultados obtenidos en estos estudios, se seleccionaron las dosis que se emplearían en la evaluación de la actividad antitumoral. Para cada uno de los extractos se utilizaron 3 dosis y NaCl al 0,9 % como solvente (tabla 1).

Tabla 1. *Datos de los extractos ensayados*

Extracto codificado	Familia	Zona de colecta	Parte de la planta	Tipo de extracto	Toxicidad	Dosis utilizadas en la evaluación antitumoral (mg/kg)
QT2B01	Euphorbiaceae	Centro Habana	hojas	APM	No tóxico	100, 200, 400
QT2B02	Euphorbiaceae	Centro Habana	hojas	APM	No tóxico	6,25, 12,5, 25 y 50
QT2B07	Zingiberacea	Plaza	hojas	BPM	Tóxico en dosis \geq 400 mg	50, 100 y 200
QT2B08	Euphorbiaceae	Víbora	hojas	BPM	Tóxico en dosis \geq 200 mg	12,5, 25 y 50
QT2B12	Malvacea	Guanabacoa	hojas	APM	Tóxico en dosis \geq 50 mg/kg	12,5, 25 y 50
QT2B13	Papaveracea	Plaza	hojas	APM	Ligeramente tóxico en dosis $>$ 50 m/kg	6,25, 12,5, 25 y 50
QT2B14	Zingiberacea	Plaza	hojas	APM	Tóxico en dosis \geq 200 mg/kg	12,5, 25 y 50

QT2B15	Euphorbiaceae	Centro Habana	hojas	APM	No tóxico	75, 150 y 300
QT2B16	Euphorbiaceae	Vibora	hojas	APM	No tóxico	100,200 y 400
QT2B18	Polipodeacea	Vedado	hojas	APM	Tóxico en dosis ≥ 100 mg/kg	12,5, 25 y 50
QT2B21	Polipodeacea	JBN	hojas	APM	Tóxico en dosis ≥ 400 mg/kg	12,5, 25 y 50
QT2B23	Euphorbiaceae	JBN	frutos	APM	Tóxico en dosis ≥ 200 mg/kg	12,5, 25 y 50
QT2B27	Euphorbiaceae	JBN	hojas	APM	Tóxico en dosis ≥ 100 mg/kg	12,5, 25 y 50
QT2B28	Euphorbiaceae	JBN	hojas	APM	Ligeramente tóxico en dosis > 200 mg/kg	200, 100 y 50
QT2B30	Euphorbiaceae	JBN	hojas	BPM	Tóxico en dosis ≥ 200 mg/kg	25, 50 y 100
QT2B31	Euphorbiaceae	JBN	hojas	APM	Tóxico en dosis ≥ 100 mg/kg	12,5, 25 y 50
QT2B32	Euphorbiaceae	JBN	hojas y frutos	BPM	Tóxico en dosis ≥ 200 mg/kg	25, 50 y 100
QT2B33	Euphorbiaceae	JBN	hojas	APM	No tóxico	100, 200 y 400
QT2B34	Euphorbiaceae	JBN	hojas	APM	No tóxico	100, 200 y 400
QT2B35	Euphorbiaceae	JBN	hojas	BPM	No tóxico	100, 200 y 400

QT2B36	Euphorbiaceae	JBN	hojas	BPM	Tóxico en dosis ≥ 200 mg/kg	25, 50 y 100
QT2B37	Euphorbiaceae	JBN	hojas	BPM	Tóxico en dosis ≥ 200 mg/kg	25, 50 y 100
QT2B38	Euphorbiaceae	JBN	hojas	BPM	No tóxico	8,25, 16,5 y 33
QT2B39	Euphorbiaceae	JBN	hojas	BPM	Tóxico en dosis ≥ 100 mg/kg	12,5, 25 y 50
QT2B40	Euphorbiaceae	JBN	hojas	APM	Tóxico en dosis ≥ 100 mg/kg	12,5, 25 y 50
QT2B41	Euphorbiaceae	JBN	hojas	APM	No tóxico	100, 200 y 400
QT2B42	Euphorbiaceae	JBN	hojas	BPM	No tóxico	100, 200 y 400

APM: alto peso molecular, BPM: bajo peso molecular, JBN: jardín botánico nacional

Diseño experimental. A cada animal se le inocularon 1×10^6 células tumorales de la Leucemia P-388 y a las 24 h se distribuyeron al azar en 5 grupos experimentales, 10 animales por grupo. Todos los animales se trataron con las 3 dosis de cada extracto. Se conformó otro grupo control positivo con 5-fluoracilo (5FU)⁸ diluido en una solución de NaCl 0,9 %, a una concentración de 2 mg/mL y en dosis de 20 mg/kg, además, se trabajó con un grupo control negativo de 20 ratones, a los cuales se les administró NaCl al 0,9 %. Los productos se administraron por vía intraperitoneal durante 9 días de tratamiento.

Los animales se mantuvieron en observación durante 30 días y se registró diariamente la sobrevida.

La evaluación de la actividad antitumoral se realizó comparando el promedio de sobrevida de los grupos tratados respecto al promedio de sobrevida del grupo control negativo, Ps/t y Ps/c, respectivamente. El aumento de la supervivencia (AS), para todos los casos, se calculó mediante la fórmula:

$$AS (\%) = \frac{Ps/t - Ps/c}{Ps/c} \times 100$$

El criterio de actividad antitumoral se tomó cuando el valor de AS fue mayor de 25 %.

Método estadístico. Para el procesamiento de los datos se empleó el método estadístico de Kaplan-Meier, con un 95 % de intervalo de confianza ($p < 0.05$).

Resultados

De los 17 extractos acuosos (APM) estudiados, sólo el codificado como QT2B18, perteneciente a una especie de la familia Polipodeacea mostró actividad antitumoral frente a la Leucemia Linfocítica P-388.

En la tabla 2 se observa un efecto marcado en las dosis de 12,5 y 25 mg/kg, con diferencias significativas en los grupos tratados respecto al grupo control negativo ($p < 0,05$), aunque los valores de aumento de sobrevida obtenidos fueron superiores al valor aceptado no superaron el valor del control positivo, pero es importante señalar que se trata de un extracto de origen natural y que en este caso, tuvo efecto sobre las células tumorales. Dato relevante, por ser esta línea tumoral murina, un tumor señal en los experimentos de tamizaje de productos antitumorales y ser una línea muy sensible para la evaluación de productos naturales.⁹

Tabla 2. Valores de promedio de sobrevida (Ps) y aumento del índice de sobrevida (AS) obtenidos en ratones $B_2D_6F_1$ portadores de la Leucemia Linfocítica P-388, bajo el efecto del tratamiento con el extracto QT2B18

Extracto/Dosis (mg/kg)	Promedio de sobrevida (Ps)	Aumento del índice de sobrevida (%)
QT2B18 (12,5)	13,60±1,12	55,4 *
QT2B18 (25)	13,20±0,82	50,8 *
QT2B18 (50)	10,90±0,84	25,0
5FU (20 mg/kg)	19,20±0,54	119,42
Control NaCl 0,9 %	8,75±0,10	—

En la figura 1, se observa que los animales del grupo control negativo murieron antes de los 10 días de observación, mientras que en los grupos tratados con el QT2B18 habían animales vivos después de los 20 días de observación.

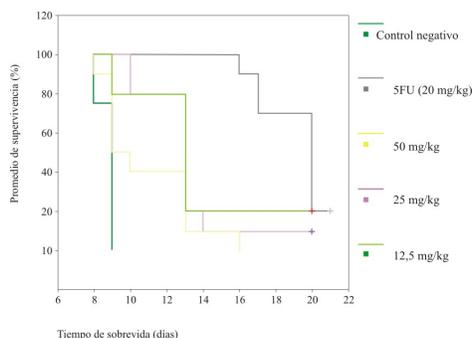


Fig. 1. Actividad antitumoral del extracto QT2B18 en ratones B₂D₆F₁ inoculados con la Leucemia Linfocítica P-388.

En la tabla 3 se aprecia que el extracto QT2B30, perteneciente a una especie de la familia Euphorbiaceae, el cual fue de los 10 extractos de BPM evaluados, mostró efecto antitumoral en la dosis mas baja (25 mg/kg) frente a la leucemia P-388. Se observó diferencia significativa en este grupo tratado respecto al grupo control negativo ($p < 0,05$) y se obtuvo en el primero, un valor de aumento de supervivencia mayor al valor aceptado (25 %).

Tabla 3. Valores de promedio de supervivencia (Ps) y aumento del índice de supervivencia (AS) obtenidos en ratones BDF₁ portadores de la Leucemia Linfocítica P-388 bajo el efecto del tratamiento con el extracto QT2B30

Extracto/Dosis (mg/kg)	Promedio de supervivencia (Ps)	Aumento del índice de supervivencia (%)
QT2B30 (25)	14,90 ± 1,43	35,4 *
QT2B30 (50)	11,40 ± 1,11	< 25
QT2B30 (100)	10,30 ± 1,40	< 25
5FU (20 mg/kg)	18,90 ± 0,84	71,80
Control (NaCl 0,9 %)	11 ± 0,40	—

Las curvas de supervivencia representadas en la figura 2 muestran que a los 20 días de observación habían animales vivos en el grupo tratado con la dosis menor (25 mg/kg), sin embargo en el resto de los grupos tratados y en el grupo control negativo, los animales murieron alrededor de los 10 días. Estos resultados indican que el extracto QT2B30 puede mostrar actividad frente a este tipo de leucemia específica, pero en dosis bajas.

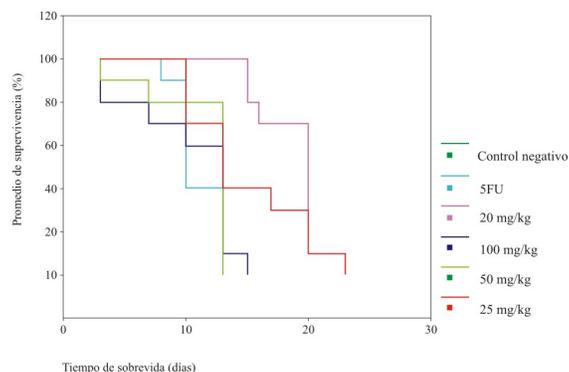


Fig. 2. Actividad antitumoral del extracto QT2B30 en ratones B₂D₆F₁ inoculados con la Leucemia Linfocítica P-388.

Discusión

El resultado de actividad antitumoral observada en el extracto de APM codificado como QT2B18, obtenido a partir de una especie de la familia Polipodeaceae, no se correspondió con lo encontrado en la literatura revisada por los autores.

En especies de esta familia se informa actividad citotóxica y antitumoral solamente en compuestos de BPM, diterpenos y sulfolípidos,¹⁰ Sin embargo, un estudio etnobotánico realizado en Honduras en el año 1987, refiere los beneficios contra el cáncer de la decocción de la especie *Polypodium leucotomos* perteneciente a esta familia, utilizado por las comunidades indígenas de este país, aunque estudios realizados posteriormente en el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América (EUA), con extractos obtenidos a partir del rizoma de esta especie no revelaron actividad antitumoral en células cancerosas. (Mahabir P Gupta, editor. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED). Sub Programa de Química-Fina Farmacéutica. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. SECAB – CYTED.1995:452-3.)

El resultado obtenido con el extracto de BPM de una especie de la familia Euphorbiaceae codificado como QT2B30, si se correspondió con lo referido para esta familia, de la cual se han aislado compuestos como las lactonas diterpenos que pueden estar presentes en este extracto de bajo peso molecular, y para los que se informa actividad antitumoral frente a una línea de leucemia humana.¹¹

Se puede concluir que la evaluación de la actividad antitumoral de extractos de plantas de la flora cubana logró 2 especies con tal actividad en la Leucemia Linfocítica P-388, lo que las hace candidatas a ser estudiadas química y farmacológicamente con amplias perspectivas de convertirse en posibles productos para el tratamiento del cáncer. Se recomienda realizar estudios para determinar la acción de estos extractos en otros modelos de tumores trasplantables.

Agradecimientos

Deseamos agradecer a los técnicos, *Melba Betancourt, Julio Carvajal, Lissbet Pimienta, Concepción Brito y María Luisa Acevedo* del Laboratorio de Oncofarmacología y del Laboratorio de Química y Toxicología, de la Unidad de Evaluación de Productos Antitumorales, su participación en este trabajo.

Summary

Anti-tumor action of Cuban plant extracts against lymphocytic leukemia P-388

The search for natural compounds having anti-neoplastic action is one of the present priorities in the struggle against cancer all over the world. The increasing use of herb medicine in preventing and curing several diseases has led to the evaluation of the anti-tumor properties of new plant extracts, mainly from the indigenous flora of each country. The present paper assessed the anti-tumor action of 27 extracts from Cuban plants on murine signal tumor lymphocytic leukemia P-388 transplanted into B₂D₆F₁ mice that were treated intraperitoneally for 9 days. The rise in survival time compared to the negative control group after 30 day-observation period was determined in all the cases. Of the studied products, anti-tumor action against lymphocytic leukemia P-388 was detected in two extracts, which will probably be studied from the chemical and pharmacological viewpoints, with great possibilities of becoming would-be products for the treatment of cancer.

Key words: Anti-tumor activity, cancer, plant extracts, murine signal tumor P-388.

Referencias bibliográficas

1. Mans Dennis, Da Rocha AB, Schwartzmann G. Anticancer Drug Discovery and Development in Brasil: Target Plant Collection as rational strategy to acquire candidate anticancer compounds. *The Oncologist*. 2000;5:85-198.
2. Hartewell JL. Types of anticancer agents isolated from plants. *Cancer Treat Rep*. 1976;60:1031-67.
3. Pettit GR, Ducki S, Tan R, Gardella RS, Mc Mahon NE, Boyd MR, et al. Isolation and structure of pedilstatin from a republic of maldives *Pedilanthus* sp. *J Nat Prod*. 2002;65(9):1262-5.
4. Grynberg NF, Echevarria A, Lima JE, Pamplona SS, Pinto AC, Maciel MA. Anti-tumour activity of two 19-nor-clerodane diterpenes, transdehydrocrotonin and trans-crotonin, from *Croton cajucara*. *Planta Med*. 1999;65(8):687-9.
5. Carvalho JC, Silva MF, Maciel MA, Pinto AC, Nunes DC, Lima RM, et al. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of trans-dehydrocrotonin a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. Part 1. *Planta Med*. 1996;62(5):401-4.
6. Valente C, Ferreira MJ, Abreu PM, Gyemant N, Ugocsai K, Hohmann J, et al. Pubescenes, jatrophone diterpenes, from *Euphorbia pubescens*, with multidrug resistance reversing activity on

- mouse lymphoma cells. *Planta Med.* 2004;70(1):81-4.
7. Rajeshkuman NV, Joy KL, Kuttan G, Ramsewak RS, Nair MR, Kuttan R, et al. Antitumour and anticarcinogenic activity of *Phyllanthus amarus* extract. *J Ethnopharmacol.* 2000;72(1-2):317-22.
 8. Alfonso L. 5FU; droga antitumoral empleada en la clínica oncológica. La quimioterapia de las enfermedades malignas. La Habana: Editorial Científico Técnica; 1976.
 9. Corbett T. Is the P-388 murine no longer adequate as a drug model? *Investigational New Drugs.* 1987;5:3-20.
 10. Hanashima S, Mizushina Y, Ohta K, Yamazaki T, Sugawara F, Sakaguchi K. Structure-activity relationship of a novel group of mammalian DNA polymerase inhibitors, synthetic sulfoquinovosylacylglycerols. *J Cancer Res.* 2000;91(10):1073-83.
 11. Freine AC, da Silva Melo P, Aoyama H, Haun M, Duran N, Ferreira CV. Cytotoxic effect of the diterpene lactones dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on human promyelocytic leukaemia cells. *Planta Med.* 2003;69(1):67-9.

Recibido: 30 de noviembre de 2004. Aprobado: 22 de julio de 2005.

Dra. *Yamila Colom Loo*. Instituto de Oncología y Radiobiología (INOR). Unidad de Evaluación e Investigación de Productos Antitumorales. Departamento de Ensayos Preclínicos. Calle 29 y E, Vedado, Plaza de La Revolución. La Habana, Cuba.

Telef.-55-25-89 e-mail: yamilacolom@yahoo.es

¹ Médico Veterinaria. Aspirante a Investigadora.

² Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Aspirante a Investigadora.

³ Licenciada en Química. Investigadora Auxiliar.

⁴ Médico Veterinaria.

⁵ Especialista de I Grado en Microbiología. Investigador Auxiliar.

⁶ Máster en Radioquímica. Aspirante a Investigador.