

Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR). Departamento de Estudios Preclínicos, Unidad de Evaluación e Investigación de Productos Antitumorales

## Actividad antitumoral de una mezcla de polisacáridos obtenida de la especie *Argemone mexicana* L.

Lic. Rita M. Pérez Gil,<sup>1</sup> Lic. Ana D. Ávila Cabrera,<sup>2</sup> Lic. Rebeca Edgill Laborí,<sup>3</sup> Dra. Yamila Colon Loo,<sup>4</sup> MSc. Waldo Quesada Cepero,<sup>5</sup> Dr. José Luis Bello Garciga<sup>6</sup> y Dra. Cristina Panfet<sup>7</sup>

### Resumen

En la actualidad, las plantas constituyen la principal fuente de obtención de la mayoría de los fármacos que pueden ser útiles para el tratamiento del cáncer. Se realizó la extracción de una mezcla de polisacáridos a partir de hojas de la planta *Argemone mexicana* L., conocida como Cardo Santo, colectada en el período de floración. Se empleó el método de incorporación de Timidina tritiada para determinar el efecto de la mezcla sobre la proliferación celular en líneas celulares humanas (H125 y U1906). La actividad antitumoral de este crudo de polisacáridos, administrado solo o combinado con 2 citostáticos conocidos, se evaluó en ratones inoculados con células tumorales de Leucemia Linfocítica P-388 y Sarcoma 37 y su actividad antitumoral indirecta se valoró en el tumor ascítico de Ehrlich. En todos los casos se calculó el aumento del tiempo de sobrevida respecto al patrón de comparación positivo o negativo. La mezcla de polisacáridos provocó rechazo a la implantación del tumor de Ehrlich y su administración conjunta con el citostático 5 Fluoracilo produjo un incremento moderado de la actividad antitumoral en los ratones portadores del tumor Sarcoma 37. Estos resultados pudieran estar relacionados con el posible efecto estimulador de esta mezcla sobre el sistema inmune de los animales con tumor. Es necesario estudiar el efecto sobre el sistema inmune de la mezcla de polisacáridos obtenidos de la especie *A. mexicana* y la efectividad de su combinación con otros citostáticos, para determinar su posible uso como adyuvante de la quimioterapia para el tratamiento del cáncer.

**Palabras clave:** *Argemone mexicana* L., polisacáridos, proliferación celular, actividad antitumoral.

La mayoría de los agentes quimioterapéuticos clínicamente efectivos en el tratamiento del cáncer tienen una mayor actividad frente a los tumores que proliferan rápidamente como son las leucemias y los linfomas, pero su acción es menos efectiva en los tumores sólidos. Esto aparejado a la resistencia de muchos tumores al tratamiento con citostáticos conocidos, hace necesario continuar la búsqueda de nuevos productos que puedan ser utilizados en el tratamiento del cáncer.

En el periodo comprendido entre los años 1985 a 1990 el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos desarrolló un estudio donde se emplearon diversas líneas tumorales humanas con el objetivo de incrementar el número de fármacos utilizables en la terapia contra el cáncer, con una mayor eficacia en los tumores sólidos.<sup>1</sup> De este estudio surge el Paclitaxel aislado de la corteza del *Taxus brevifolia*,<sup>2</sup> el que muestra una potente actividad frente a los tumores sólidos.

En la actualidad, las plantas continúan representando el recurso natural más explorado en la búsqueda de

anticancerígenos, en estudio se encuentra una amplia variedad de familias como fuentes de estos productos, un ejemplo de esto son las familias Umbelliferae, Euphobeaceae Papaveraceae y Annonaceae.<sup>3-6</sup>

El cáncer en Cuba representa la segunda causa de muerte, de ahí la importancia de las investigaciones encaminadas a ampliar el conocimiento sobre esta enfermedad o en la búsqueda de nuevos tratamientos para combatirla. Dentro de esta temática se encuentran las investigaciones relacionadas con la obtención de nuevos medicamentos ya sea para el tratamiento o para mejorar la calidad de vida de los pacientes con cáncer. Con este objetivo se realizó el aislamiento de polisacáridos de la especie *Argemone mexicana* L. perteneciente a la familia Papaveraceae, conocida comúnmente como Cardo Santo, y la evaluación de su posible actividad antitumoral. De esta especie se informa la presencia de derivados de alcaloides, a los cuales se les atribuye actividad antitumoral.<sup>7</sup>

## Métodos

### Extracción del crudo de polisacáridos y procedimiento analítico

Se tomaron 265g de hojas de la planta *A. mexicana*, colectada en el período de floración en una zona del municipio Plaza de La Revolución, en horas de la mañana e identificada por la DraC. *Cristina Panfet*.

A las hojas cortadas finamente se le añadió agua destilada en una relación 1:10 (p/v). La extracción fue realizada mediante agitación en zaranda a temperatura ambiente durante 24 h. El extracto obtenido se filtró a vacío por un embudo Büchner y se centrifugó a 3 000 rpm durante 30 min. Al filtrado se le añadió etanol al 95 %, en una relación 3:1 (v/v). El precipitado obtenido se redisolvió y se liofilizó. Se determinó el contenido de proteínas,<sup>8</sup> de carbohidratos<sup>9</sup> y de ácidos urónicos.<sup>10</sup>

El extracto liofilizado (25 mg) se disolvió en 1 mL de solución de NaCl 0,1 M y se aplicó en una columna de Sephacryl S-300 (filtración en gel), previamente calibrada con Azul dextrana y Rojo fenol, para su fraccionamiento. Se colectaron fracciones de 1 mL con una velocidad de flujo de 10 mL/h, después de eluir la columna con NaCl 0,1M. El perfil cromatográfico fue realizado mediante el análisis de las fracciones por el método de *Dubois*.<sup>9</sup>

### Determinación de la inhibición de la proliferación celular

Esta determinación fue realizada por el método de incorporación de Timidina tritiada (<sup>3</sup>H-Timidina). Se utilizaron las líneas celulares humanas de pulmón H125 y la U1906, provenientes de un adenocarcinoma de células no pequeñas de pulmón y de otro de células pequeñas de pulmón, respectivamente.

El crudo de polisacárido se diluyó en medio RPMI con 8 % de suero fetal bovino en concentraciones de 500, 250, 125, 62,5 µg /mL.

Se sembraron 1x10<sup>4</sup> células por pozo en placas de 96 pozos y se incubó toda la noche en atmósfera de CO<sub>2</sub> (g) 5% a 37<sup>0</sup> C. Se lavó con PBS. En la placa se añadieron alícuotas de 100 µL de cada una de las concentraciones. Se incubó nuevamente en atmósfera de CO<sub>2</sub> (g) a 37<sup>0</sup> C durante 48 h, antes de adicionar 1µCi de <sup>3</sup>H- Timidina. Al cabo de 7 h de incubación a 37<sup>0</sup> C se congeló la placa a -20<sup>0</sup> C. Como último paso experimental, se cosecharon las células y se procedió a contar la radioactividad en un contador β.

## Evaluación de la actividad antitumoral en líneas tumorales de ratón

Se emplearon en todos los ensayos ratones de ambos sexos, con peso corporal en un rango entre 18 y 22 g y de las líneas BDF<sub>1</sub> o NMRI, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura entre 21 y 25° C. La humedad, entre un 50 y 70 % con 10 cambios de aire por h. Los ciclos de luz fueron de 12 h/día

Para evaluar la actividad antitumoral del extracto en animales portadores de tumores, se seleccionaron 3 líneas de tumores murinos, mantenidas en el banco de células de tumores trasplantables del Laboratorio de Oncofarmacología. Se utilizaron las líneas de células tumorales: Leucemia Linfocítica P-388, Sarcoma 37 en forma ascítica y el carcinoma ascítico de Ehrlich (TAE).

El tumor Leucemia P-388 se inoculó en animales BDF<sub>1</sub> a razón de  $1 \times 10^6$  células tumorales por ratón, por vía intraperitoneal. El tumor Sarcoma 37 fue inoculado en ratones NMRI a razón de  $2 \times 10^6$  células por ratón.

A las 24 h de inoculadas las células tumorales se conformaron, de forma aleatoria, los grupos experimentales. Cada grupo quedó constituido por 10 animales, los cuales fueron tratados por vía intraperitoneal durante 9 días con los 2 niveles de dosis (50 y 100 mg de extracto/kg de peso del ratón). Se empleó 5 Fluoracilo (5FU) como patrón de comparación positivo administrado por vía intraperitoneal a la dosis de 20 mg/kg. Como patrón negativo se empleó solución salina fisiológica 0,9 % a un grupo de 20 animales. Los animales se mantuvieron en observación durante 30 días, se controló el estado de salud y la mortalidad. La evaluación estadística de los resultados se realizó por el método estadístico de *Kaplan-Meier* con un intervalo de confianza ( $p < 0,05$ ).

Se determinó la supervivencia promedio (S) para cada grupo en estudio. La evaluación de la actividad antitumoral, se calculó mediante la expresión  $AS \% = (S_t - S_c / S_c) \times 100$ , donde  $S_t$  es el promedio de la supervivencia de los animales tratados con el producto,  $S_c$  es el promedio de la supervivencia de los animales tratados con solución salina y (AS %) es el aumento de la supervivencia expresado en porcentaje.<sup>11</sup>

Se consideró ausencia de actividad antitumoral cuando el valor de AS fue menor de 25 %, según el sistema de evaluación de productos antitumorales del INOR.<sup>12</sup>

Para la evaluación de la actividad antitumoral (actividad indirecta) del extracto estudiado en los animales portadores del tumor ascítico de Ehrlich, se tomaron 50 ratones de la línea NMRI y se dividieron de forma aleatoria en 4 grupos de 10 animales. Todos los animales se trataron con el crudo de polisacáridos en las dosis de 25, 12,5 y 6,25 mg/kg de peso del ratón, durante 5 días. A las 48 h se inocularon en cada animal  $2 \times 10^6$  células tumorales utilizando la vía intraperitoneal.

Con el grupo control de 20 animales se procedió de forma similar pero tratando los animales previo a la inoculación del tumor con solución salina fisiológica 0,9 %. Los animales se mantuvieron en observación durante 30 días.

La actividad indirecta se determinó por rechazo al implante del tumor (TAE) de los animales tratados con el producto a evaluar en presencia de un grupo control tratado con solución salina fisiológica 0,9 % e inoculado con el tumor (TAE) en las mismas condiciones.<sup>13</sup> Se consideró que el producto es activo si provoca un

rechazo a la implantación del tumor mayor o igual al 50 % de los animales tratados con el producto.

### Influencia del tratamiento combinado con los citostáticos: Ciclofosfamida y 5-FU

Se evaluó la influencia del tratamiento combinado del extracto y los citostáticos Ciclofosfamida y 5-FU, por comparación de la actividad antitumoral (AS %) obtenida para el grupo que recibió el tratamiento combinado y el grupo que recibió como tratamiento el citostático solo.

Se diseñó un experimento con 2 grupos de ratones BDF<sub>1</sub> inoculados a razón de  $1 \times 10^6$  células tumorales de la Leucemia P-388 por ratón, por vía intraperitoneal. A cada animal se le administró, también por vía intraperitoneal, una dosis única de Ciclofosfamida 50m/kg; en el otro grupo se realizó también una administración única por la misma vía, combinando el producto a la dosis de 100 mg/kg conjuntamente con la Ciclofosfamida a la dosis de 50m/kg .

El tumor Sarcoma 37 fue inoculado en ratones NMRI a razón de  $2 \times 10^6$  células por ratón, el citostático utilizado fue el 5-FU en una dosis de 20 mg/kg, el esquema de tratamiento consistió en 5 administraciones sucesivas por vía intraperitoneal del citostático, y después la inoculación del producto por la misma vía en una dosis de 100 mg/kg también por 5 días.

En ambos experimentos se utilizó un grupo control con animales tratados con solución salina fisiológica 0,9% (control negativo). El período de observación en ambos casos fue de 30 días.

La evaluación de la actividad antitumoral se realizó mediante el cálculo de (AS%) como se describió anteriormente.

### Resultados

A partir de la planta *A. mexicana* se obtuvo por precipitación con etanol un crudo de polisacáridos (CS) en forma de un polvo fino de color carmelita claro, insoluble en éter etílico, acetona y cloroformo que contiene el 69 % de carbohidratos y el 2,5 % de proteínas. Se determinó la presencia del 3 % de ácidos urónicos.

En el perfil cromatográfico obtenido en la separación utilizando la matriz de Sephacryl S-300 (figura 1), se aprecia que 2 tipos de fracciones polisacáridicas están presentes en el crudo en estudio.

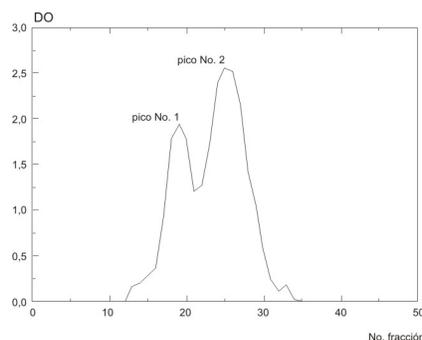


Fig.1. Cromatografía de gel filtración del crudo de polisacáridos CS Sephacryl S-300, eluido con NaCl 0,1 M . Carbohidratos 490nm.

En la figura 2 se observa que el crudo de polisacáridos inhibió de forma dosis dependiente la proliferación celular (citotoxicidad) en la línea celular H125. La dosis efectiva media se encuentra entre 12,5 y 25  $\mu\text{g}$  del crudo. La línea celular U1906 no mostró ser muy sensible al crudo (figura 3), sólo se observó un incremento en la dosis de 25  $\mu\text{g}$ . Fue imposible determinar la dosis efectiva media pues los resultados obtenidos para la dosis mayor, 50  $\mu\text{g}$  y menor, 6,25  $\mu\text{g}$  son perfectamente comparables.

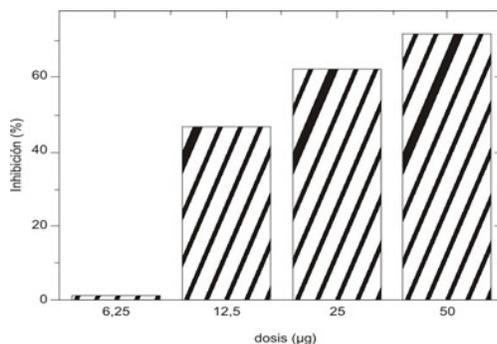


Fig. 2. Influencia del crudo de polisacáridos sobre la proliferación de las células H125.

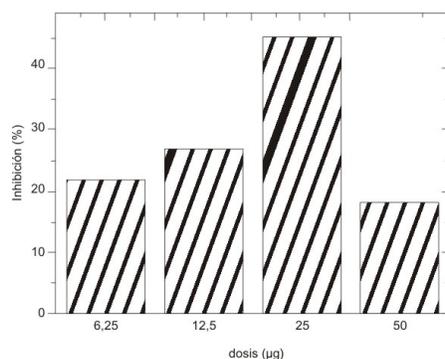


Fig. 3. Influencia del crudo de polisacáridos sobre la proliferación de las células U1906.

Al determinar el efecto antitumoral *in vivo* en los ratones trasplantados con el tumor Leucemia Linfocítica P-388 (tabla 1) se observó que la administración del producto a las dosis estudiadas no produjo un incremento de la supervivencia promedio respecto al control negativo. El producto probado tampoco produjo en los ratones portadores del tumor Sarcoma 37 a las dosis estudiadas, incremento de la supervivencia promedio respecto al control negativo (tabla 2).

Tabla 1. Efecto en la supervivencia promedio del tratamiento del extracto CS en ratones BDF1 inoculados con el tumor Leucemia P388.

Producto	Dosis-día del producto (mg/kg)	n	Supervivencia promedio
CS	50	10	8,2 $\pm$ 0,2
CS	100	10	11,13 $\pm$ 0,66
5-FU	20	10	30
Control	SSFT	20	12,88 $\pm$ 0,68

CS: crudo de polisacáridos.

Tabla 2. Efecto de la supervivencia promedio del tratamiento del extracto CS en ratones NMRI inoculados con el tumor Sarcoma 37

Producto	Dosis-día del producto (mg/kg)	n	Supervivencia promedio
CS	50	10	18.7±1.41
CS	100	10	18.8±0.66
5FU	20	10	27.9±1.6
Control	SSFT	20	21.7±0.72

CS: crudo de polisacáridos.

El extracto en las dosis ensayadas no presentó actividad antitumoral en los tumores experimentales Leucemia Linfocítica P-388 y Sarcoma-37, en su forma ascítica.

En la evaluación antitumoral indirecta (tabla 3), se ve que la administración del crudo de polisacáridos, previa a la inoculación con el tumor ascítico de Ehrlich, en la dosis de 6,25 mg/kg produjo en 5 animales la no aparición de tumores al final del período de observación o sea, un rechazo a la implantación o prendimiento del tumor de un 50 % de los animales tratados con el producto, por lo cual puede considerarse el producto activo a esa dosis, mientras que los animales del grupo control todos presentaron tumor.

Tabla 3. Actividad antitumoral de CS en el tumor ascítico de Ehrlich (TAE)

Producto	Dosis-día del producto (mg/kg)	n	No. de animales sin tumor al final de la observación	Porcentaje de prendimiento
CS	25	10	3	30
CS	12,5	10	3	30
CS	6,25	10	5	50
Control	SSFT	10	0	0

CS: crudo de polisacáridos.

El tratamiento combinado con Ciclofosfamida en las dosis de 50 mg/kg con el crudo de polisacáridos, en dosis de 100 mg/kg, no provocó aumento en la supervivencia con respecto al tratamiento Ciclofosfamida en los ratones inoculados con la Leucemia Linfocítica P-388.

La combinación del citostático 5-FU en la dosis de 20 mg/kg y el crudo que se evalúa, en la dosis de 100mg/kg, en ratones portadores del Sarcoma 37 (tabla 4) produjo, al concluir el período de observación, un incremento de la supervivencia promedio en los animales tratados con el crudo y el citostático 5-FU respecto a los animales tratados con el citostático solo. Estos resultados indican un aumento de la actividad antitumoral de esta combinación, dada por un incremento de la supervivencia del 8 %.

Tabla 4. Incremento de la actividad antitumoral del tratamiento combinado del extracto CS y el 5-FU en ratones NMRI portadores del Sarcoma 37

Producto	Dosis- mg/kg	n	Supervivencia promedio	Actividad antitumoral (AS %)
CS + 5 FU	100	10	29,6 ± 0,29	36,4
5FU	20	10	27,9 ± 1,6	28,5
Control	SSFT	20	21,7 ± 0,72	-

CS: crudo de polisacáridos.

## Discusión

En la literatura revisada, no se encontraron resultados que muestren la presencia de polisacáridos en esta especie. La amplitud de los máximos de absorción que se observan en el perfil cromatográfico, indica la polidispersión de los pesos moleculares, por lo que se puede afirmar que el crudo estudiado está constituido por una mezcla de polisacáridos, donde están presente polisacáridos ácidos dada la presencia de ácidos urónicos.

El análisis de los resultados obtenidos de la evaluación biológica del extracto del crudo de polisacáridos, indican que tiene actividad citotóxica en las 3 dosis evaluadas, en la línea H125 de adenocarcinoma de pulmón, de lento crecimiento y muy resistente al tratamiento con citostáticos. El no encontrar una citotoxicidad notable en las células de la línea U1906, línea de crecimiento rápido, tratadas con el crudo, concuerda con los resultados obtenidos de no encontrar actividad antitumoral en los tumores murinos de crecimiento rápido, Leucemia Linfocítica P-388 y Sarcoma 37, en su forma ascítica.

El discreto aumento de la actividad antitumoral que se observa en el tratamiento combinado de este crudo y el citostático 5 FU en los ratones portadores del tumor Sarcoma 37 resultó similar a lo descrito para otros polisacáridos que incrementan la respuesta a la quimioterapia,<sup>14</sup> esto unido a que la actividad antitumoral indirecta de este crudo expresada como rechazo a la implantación del tumor de Ehrlich en los ratones tratados con el crudo, previo a la inoculación del tumor, pudiera atribuirse a un posible efecto del mismo sobre el sistema inmune de los animales, aunque esta hipótesis debe ser confirmada.

Finalmente puede concluirse que es necesario estudiar el efecto sobre el sistema inmune de la mezcla de polisacáridos obtenidos de la especie *A. mexicana* y la efectividad de su combinación con otros citostáticos para determinar su posible uso como adyuvante de la quimioterapia para el tratamiento del cáncer

## Agradecimientos

Los autores agradecen la participación en este trabajo de los técnicos del Dpto. de Investigaciones Preclínicas de la Unidad de Evaluación e Investigación de Productos Antitumorales del INOR, *María L. Acevedo, Mylene Ramírez y Concepción Brito*.

## Summary

### Antitumoral activity of a mixture of polysaccharides obtained from *Argemone mexicana* L. species

At present, plants are the main source of obtention of most of the drugs that may be useful for treating cancer. A mixture of polysaccharides was extracted from the leaves of *Argemone mexicana* L. plant, also known as *Cardo Santo*, collected in the flowering period. The method of incorporation of tritiated Thymidine was used to determine the effect of the mixture on the cellular proliferation in human cellular lines (H125 and U1906). The antitumoral activity of this crude of polysaccharides administered alone or combined with 2 known cytostatic agents was evaluated in mice inoculated with tumoral cells of lymphocytic leukemia P-388 and sarcoma 37 and their indirect antitumoral activity was assessed in Ehrlich's ascitic tumor. In all the cases, it was calculated the increase of survival time in relation to the positive or negative pattern of comparison. The mixture of polysaccharides caused a rejection to Elrich's tumor implantation, and its administration together with 5-Fluoracyl produced a moderate increase of the antitumoral activity in the mice carriers of the Sarcoma 37 tumor. These results may be related to the possible stimulating effect of this mixture on the immune system of the animals with tumor. It is necessary to study the effect of the mixture of polysaccharides obtained from *A. Mexicana* species on the immune system, and the effectivity of its mixture with other cytostatic agents to determine its possible use as a chemotherapy adjuvant for the treatment of cancer.

**Key words:** *Argemone mexicana* L. polysaccharides, cellular proliferation, antitumoral activity.

### Referencias bibliográficas

1. Cragg GM, Newman DJ, Weiss RB. Coral reefs, forests and thermal vents: the worldwide exploration of nature for novel antitumor agents. *Seminars in Oncology*. 1997; (24):156-63.
2. Cragg GM, Shepartz SA, Suffness M, Grever MR. The Taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti HIV agents. *J Nat Prod*. 1997;(56):1675-68.
3. Wu FE, Zeng L, Gu ZM, Zhao GX. New bioactive monotetrahydrofuran anohaceous acetogenins, annomuricin C and muricatocin C, from the leaves of *Annona muricata*. *J Nat Prod*. 1997; (58):909-15.
4. Grynberg NF, Echevarria A, Lima JE, Pamplona SS, Pinto AC, Maciel MA. Anti-tumour activity of two 19-nor-clerodane diterpenes, trans-dehydrocrotonin and trans-crotonin, from *Croton cajucara*. *Planta Med*. 1999; (65): 687-9.
5. Roublevskaia IN, Haake AR, Polevoda BV. Bcl-2 overexpression protects human keratinocyte cells from Ukrain-induced apoptosis but not from G2/M arrest. *Drugs Experimental Clin Res*. 2000;26:149-56.
6. Ram VJ, Kumari S. Natural products of plant origin as anticancer agents. *Drug News Perspective*. 2001;14:465-82.
7. Chang YC, Chang FR, Khalil AT, Hsieh PW, Wu YC. Cytotoxic benzophenanthridine and

- benzylisoquinoline alkaloids from *Argemone mexicana*. Z Naturforsch [C]. 2003; 58:521-6.
8. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 2001; 183:265-75.
  9. Dubois IL, Guilles K, Hamilton JK, Robers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugar a related sustances. Anal Chem.1956;28:350-56.
  10. Blumenkrantz N, Asboe Hausen G. New method for quantitative determination of uronic acid. Anal Chem. 1973;54: 484-89.
  11. Geran RI, Greenberg NH, MacDonald MM, Shumacher AM, Abbott BJ. Protocols for screening chemicals agents and natural products against animal tumors and other biological systems. Cancer Chemother Rep. 1972;3: (2) ( part 3) .
  12. Mainardi JV, Bello JL. Nuevas drogas antitumorales: un sistema experimental para el tamizaje inicial. Rev Cubana Farm. 1983;12:174-81.
  13. Bello JL, Pereda CM, Silva JP, Mainardi JV, Fernández LE. Influencia del tratamiento con polisacáridos de origen marino sobre el prendimiento del tumor ascítico de Ehrlich. Rev Cubana Oncol. 1985;1:200-7.
  14. Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Applied Microbiol Biotechnol. 2002;60: 258-74.

Recibido: 25 de enero de 2005. Aprobado: 5 de diciembre de 2005.

Lic. *Rita M. Pérez Gil*. Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR). Departamento de Estudios Preclínicos, Unidad de Evaluación e Investigación de Productos Antitumorales. 29 y E, Vedado, Plaza de la Revolución. La Habana, Cuba. e-mail: [rpgil@infomed.sld.cu](mailto:rpgil@infomed.sld.cu)

cu

- 1 **Licenciada en Química. Investigadora Auxiliar.**
- 2 **Licenciada en Química. Investigadora Agregado.**
- 3 **Licenciada en Bioquímica.**
- 4 **Médico Veterinaria. Investigadora Aspirante.**
- 5 **Máster en Radioquímica. Investigador Aspirante.**
- 6 **Doctor en Ciencias Biológicas. Investigador Titular.**
- 7 **Doctora en Ciencias Biológicas.**