

DIFLUOROMETIL ORNITINA Y EL EXTRACTO ACUOSO DE *Bursera fagaroides* EN EL MODELO DE LINFOMA MURINO L5178Y EN RATONES BALB/C: COMPARACIÓN DE SU EFECTO EN EL METABOLISMO DE LAS POLIAMINAS

R. Reynoso-Orozco*, J.I. Delgado-Saucedo*, A.M. Puebla-Pérez**, C. Calvo-Méndez***, D. Carr*, S. Velázquez-Magaña* y A. Santerre*

*Universidad de Guadalajara; **Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara; ***Universidad de Guanajuato, Guanajuato

RESUMEN: El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del extracto acuoso de *Bursera fagaroides* y Difluorometilornitina (DFMO), aplicados de forma individual y combinados, sobre los tejidos sanos en el modelo de linfoma murino L5178Y y específicamente sobre el metabolismo de las poliaminas (PAs), Putresina (Pu), Espermidina (Spd) y Espermina (Spm). Mediante cromatografía de intercambio iónico se determinaron los niveles de Pu en orina como indicadores de la evolución del tumor, mientras por radioinmunoensayo se cuantificó la actividad de la ODC renal. Los resultados obtenidos sugieren que no se combine la ingestión de algún tipo de té o brebaje preparado con dicha planta cuando se administre DFMO, dado su efecto estimulador del desarrollo tumoral, contrario al efecto anticáncer del extracto hidroalcohólico de la misma planta.

(Palabras clave: Linfoma murino L5178Y; Poliaminas; actividad de la ODC; biomarcadores; *Bursera fagaroides*)

DIFLUOROMETHYLORNITHINE AND *Bursera fagaroides* AQUEOUS EXTRACT ON MURINE LYMPHOMA L5178Y MODEL IN BALB/C RATS: COMPARISON OF ITS EFFECT ON THE METABOLISM OF POLYAMINES

ABSTRACT: The aim of present work was to study *Bursera fagaroides* watery extract effect and Difluoromethylornithine (DFMO), applied individually or combined on healthy tissues and specifically on Polyamines (PAs) Putrescine (Pu), Spermidine (Spd) and Spermine (Spm) metabolism in murine lymphoma L5178Y model. By means of ionic exchange chromatography, Pu levels in urine were determined as tumor evolution indicators, while renal ODC activity was quantified using radioimmunoassay. The results obtained suggest that the aqueous extract from *Bursera fagaroides* is a tumor stimulator, showing the opposite effect of the hidroalcoholic extract.

(Key words: Murine Lymphoma L5178Y; Polyamines; ODC activity; biomarkers; *Bursera fagaroides*)

INTRODUCCIÓN

Las poliaminas (PAs), Putresina (Pu), Espermidina (Spd) y Espermina (Spm) son moléculas básicas en condiciones fisiológicas (15) con múltiples funciones para las células sanas y cancerosas. Son consideradas esenciales para la diferenciación y multiplicación celular por su capacidad para estabilizar a los ácidos nucleicos, entre otras funciones (9). También se utilizan como biomarcadores de estrés (17) y del éxito del tratamiento de enfermedades neoplásicas (6). En

el metabolismo de las PAs la enzima Ornitina descarboxilasa (ODC) es la primera enzima de la síntesis de estos policationes y es limitante para su biosíntesis (8) y su actividad también permite dar seguimiento en los distintos tipos de cáncer (5) y (7). Los niveles de PAs en fluidos y tejidos, así como la actividad de la ODC son excelentes bioindicadores del desarrollo tumoral, pero se ha estudiado poco el efecto sobre las células sanas, cuando se aplican distintos tratamientos contra el cáncer (14).

El inhibidor sintético difluorometilornitina (DFMO) es específico de la ODC, ha mostrado eficiencia en el tratamiento del cáncer a bajas dosis, sin efectos secundarios indeseables (10). Dicho efecto involucra la inhibición de la proliferación celular acelerada, en distintos modelos (4). Sin embargo, existen resultados contradictorios en la posible explicación de los mismos (12).

Tradicionalmente los tratamientos del cáncer disminuyen considerablemente la calidad de vida de los pacientes, lo cual ha provocado el incremento del estudio de estrategias alternativas como el uso de los mismos productos naturales (13), que utilizaban los grupos étnicos de antes de la colonia para tratar distintas enfermedades. Un extracto hidroalcohólico de corteza, del árbol de distribución nor-occidental de México *Bursera fagaroides* (familia Burceraceae) presentó actividad antitumoral e inmunomoduladora en el modelo de linfoma murino L5178Y (12), por lo que se propuso como candidato para estudiar los mecanismos de acción y una estrategia antitumoral. Se conoce que diferentes extractos que contienen saponinas y flavonoides presentan actividad antitumoral (13), pero hasta el momento apenas se están realizando los estudios de caracterización molecular para identificar las sustancias activas de dicho árbol (Instituto de Botánica, 1998). El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del extracto acuoso de *Bursera fagaroides* y DFMO, individuales y en combinación, sobre los tejidos sanos en el modelo de linfoma murino L5178Y y específicamente sobre el metabolismo de las PAs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Biomodelo: Linfoma murino L5178Y, tumor de estirpe tímica (haplotipo H^{2d}) originado por tratamiento con metilcolantreno, que se mantiene por trasplante intraperitoneal semanalmente en ratones BALB/c. El tumor es de alta malignidad ya que 2×10^7 células L5178Y inoculadas por vía i.p. mata a los ratones en 15 ± 2 días.

Animales: Ratones BALB/c (haplotipo H^{2d}) singénicos machos, de 6 a 8 semanas de edad y 20-24 g de peso, alojados en jaulas de policarbonato, mantenidos a temperatura controlada de 22°C y ciclos alternos de iluminación-oscuridad de 12 h, alimentados con una dieta balanceada especial para roedores (PURINA-México) y agua purificada a consumo voluntario.

El extracto acuoso utilizado se obtuvo de la corteza del árbol de *Bursera fagaroides*, fue hervida du-

rante 30 min, concentrada en rotovapor al vacío y posteriormente liofilizado (Labconco). El polvo resultante se reconstituyó en solución salina fisiológica a concentración de 100 mg en 0.1 mL.

Se formaron aleatoriamente 8 grupos de 5 ratones BALB/c/ grupo: Los ratones con tumor se inocularon con 2×10^4 células L5178Y por vía i.p. y se sacrificaron por dislocación cervical los días 10, 17 y 24 de crecimiento tumoral.

Se formaron 8 grupos de 5 ratones BALB/c cada uno:

Grupo 1. Ratones sin tratamiento.

Grupo 2. Ratones sanos tratados con 1.5 mg/Kg/día de DFMO, durante 15 días por vía oral.

Grupo 3. Ratones sanos tratados con 1.5 mg/Kg/día de DFMO durante 15 días por vía oral, más 100 mg/Kg/día de *Bursera fagaroides* por vía i.p.

Grupo 4. Ratones sanos tratados con 100 mg/Kg/día de *Bursera fagaroides* durante 15 días por vía i.p.

Grupo 5. Ratones inoculados con 2×10^4 células del linfoma L5178Y.

Grupo 6. Ratones inoculados con 2×10^4 células del linfoma L5178Y y tratados con 1.5 mg/Kg/día de DFMO, durante 15 días por vía oral.

Grupo 7. Ratones inoculados con 2×10^4 células del linfoma L5178Y y tratados con 100 mg/Kg/día de *Bursera fagaroides* durante 15 días por vía i.p.

Grupo 8. Ratones inoculados con 2×10^4 células del linfoma L5178Y y tratados con 1.5 mg/Kg/día de DFMO durante 15 días por vía oral más 100 mg/Kg/día de *Bursera fagaroides* durante 15 días por vía i.p.

El análisis de PAs en orina se realizó por cromatografía de intercambio iónico a base de solución de citrato de litio pH 6.1, 30 min. pH 8.5, 40 mins. en la fase móvil y LiOH 2M para lavar la columna y detección postcolumna con ortoformaldehído (OPA). La resina de intercambio catiónico (BC X-12, marca Benson, Reno, Nevada, USA), empacada en columna de vidrio 0.4 cms de diámetro y 9 cms. de alto. Se utilizó un analizador automático con dos bombas de flujo continuo y controlado, detector de fluorescencia (Shimatzu) 355 nm de longitud de excitación 455 nm de emisión y muestreador automático con bucle de 100 ml de volumen (Spectra physics).

La actividad de ODC renal como indicador del desarrollo neoplásico se realizó mediante radioinmunoensayo, midiendo la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de L-[1- ^{14}C] ornitina (Amersham, actividad

específica) esencialmente como lo describe Calvo-Méndez et al 1993 (1), modificada por incubación de la muestra de reacción a 42°C durante 90 min, el homogenizado de riñón se preparó por maceración en mortero.

La proteínas totales presentes en el riñón se cuantificaron por el método de Bradford (Murakami, 1992 (7), con albúmina sérica bovina como patrón, los datos se expresaron como mg de proteína/mL de homogenizado.

Análisis estadístico: Para los niveles de PAs y la actividad de la ODC se utilizó el paquete SigmaStat, aplicando ANOVA de una vía y la prueba de Student-Newman-Keuls para comparación de las medias. Para el análisis de sobrepeso de ratones se utilizó Análisis de una vía de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración de PAs en fluidos corporales como la orina representa un parámetro útil para estudiar el desarrollo del tumor en el modelo de linfoma murino L5178Y *in vivo*. Sin embargo en las condiciones en que se desarrolló el presente trabajo sólo fue posible cuantificar la concentración de Pu, dada la cantidad de muestra obtenida. En animales sanos, los valores basales no presentan cambios estadísticamente significativos después de 10 días y

no así a los 17 días de estudio, donde se duplica el promedio. En cambio, cuando se inocula por vía i.p. las células tumorales el incremento en la concentración de Pu se incrementa de 6 a 37 nmoles/mL de orina al día 10 de estudio y disminuye a 26 nmoles/mL al día 17, lo cual es estadísticamente importante $p < 0.05$ (Fig. 1).

El desarrollo tumoral se puede identificar visualmente y considerarlo en relación directa con el peso corporal total durante el desarrollo del experimento. En este caso se pesó a los individuos al día cero, 10 y 14 del estudio. En la Tabla 1 se presentan los datos de aumento promedio del peso que ganaron los ratones al día 14 y se puede observar un aumento considerable en los animales inoculados con 20,000 células del linfoma L5178Y cuadro 1 ($P = 0.000172$), pero de manera más importante en el caso de ratones con tumor y tratados con DFMO más *Bursera fagaroides* ($P < 0.05$).

La actividad de la ODC en el riñón puede medirse para relacionar el efecto de los distintos tratamiento aplicados independientes o en combinación, además de indicador del desarrollo neoplásico. En el presente trabajo se detectó menor actividad de la ODC renal en los individuos sin tumor e independientemente del tratamiento que se aplicó. La actividad se exacerbó en el grupo de individuos que presentan tumor más el fármaco DFMO (grupo 8), así como el extracto acuoso de *Bursera fagaroides*, Figura 2 ($P < 0.05$).

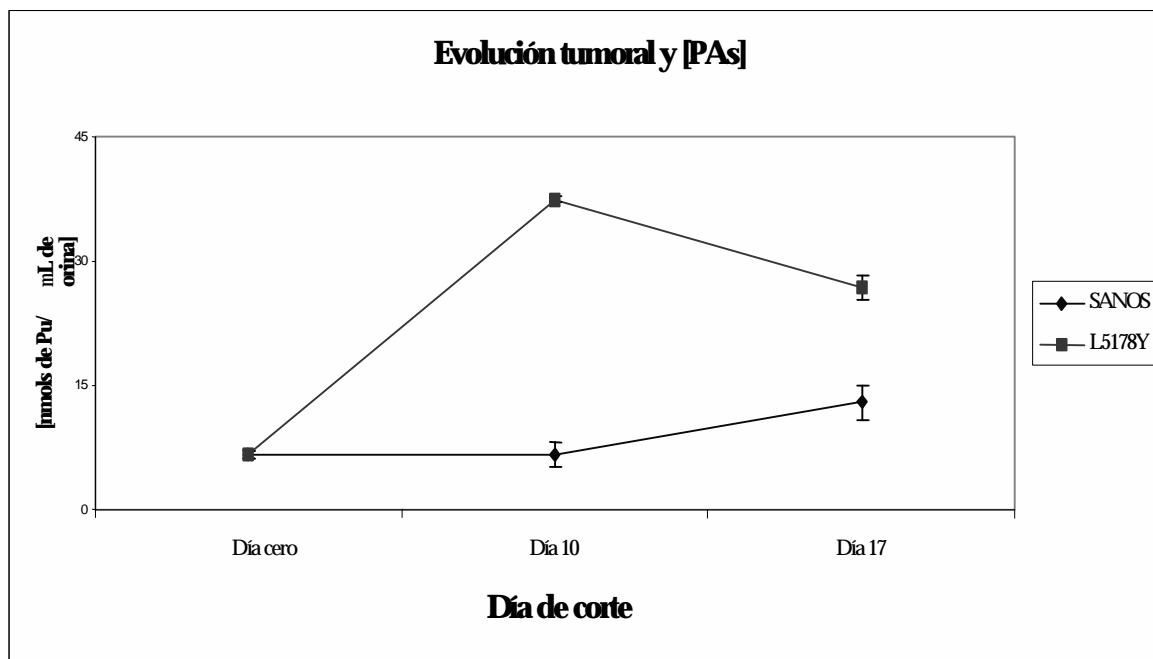


FIGURA 1. Niveles de Pu en la orina de ratones con tumor y sin tratamiento alguno. ANOVA de dos vías ($p < 0.05$)./ *PAs levels in urine of mice with tumor and without any treatment.*

TABLA 1. Sobre peso de ratones BALB/c, 14 días después de ser inoculados con 2×10^4 células de linfoma L5178Y por vía i.p. Análisis de una vía de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). / *Overweight of BALB/c mice, 14 days after being inoculated with 2×10^4 cells of L5178Y lymphoma by i.p. route. Analysis of a route of Kruskal-Wallis ($p < 0.05$)*

Grupo	Aumento promedio (%)
Sin tratamiento	0.41
Sanos + DFMO	-1.07
Sanos + <i>Bursera fagaroides</i>	-0.28
DFMO + <i>Bursera fagaroides</i>	-0.28
Tumor	8.18
Tumor + DFMO	18.92
Tumor + <i>Bursera fagaroides</i>	8.52
Tumor + DFMO+ <i>Bursera fagaroides</i> .	48.53

El uso de las PAs urinarias como bioindicadores de desarrollo tumoral se propuso desde los años 70, dada la necesidad de estas biomoléculas por parte de las células tumorales (4). En el modelo de nuestro interés presentan una correlación directa con respecto a la evolución del linfoma L5178Y, aunque nuestro sistema sólo nos permite determinar el contenido de

Pu (Fig. 1). Nuestros resultados sugieren que el incremento más importante del Pu sucede a los 10 días y disminuye ligeramente al día 14 de evolución del tumor, sin regresar a los valores basales totalmente. Esta es la primera ocasión que se utiliza a las PAs como indicadores del desarrollo neoplásico en el presente modelo y su aplicación al estudio de probabilidades de éxito son bastantes en las estrategias de tratamiento de linfoma.

El extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* ha mostrado actividad antitumoral e inmunomoduladora (12), pero no se había reportado cualquier efecto de sus componentes solubles en agua. Nuestro resultados exponen una asociación directa entre aumento de peso corporal (Tabla 1), actividad enzimática de la ODC renal (Fig. 2) y desarrollo tumoral. También el uso del inhibidor específico de la enzima ODC presenta este comportamiento que se exagera en combinación con el extracto de la planta de nuestro interés (Fig. 2). Estos resultados están en concordancia con otros autores (Puebla-Pérez, 1998), que trabajan con dosis pequeñas de DFMO y que muestran su corta vida media en el organismo, lo que hace una dosis insuficiente para lograr su efecto antitumoral en los individuos Fabian *et al.* (2002). En

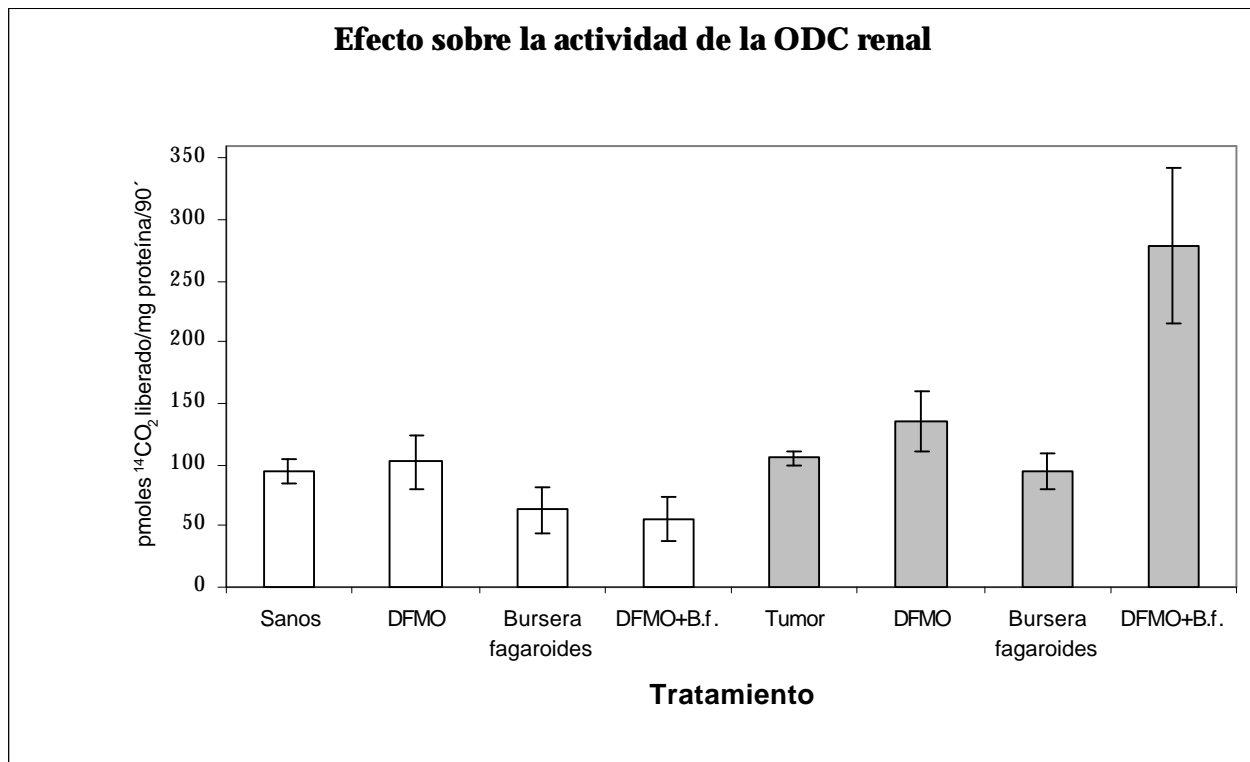


FIGURA 2. Actividad de la ODC renal de ratones BALB/c con tumor y tratados con extracto acuoso de *Bursera fagaroides* y/o DFMO. ANOVA de una vía ($p < 0.05$). / *ODC activity in kidney of BALB/c mice with tumor and treated with *Bursera fagaroides* and/or DFMO.*

el caso del extracto acuoso de *Bursera fagaroides* probablemente las sustancias naturales con las actividades mencionadas aquí requieren ser extraídas con soluciones hidroalcohólicas, lo cual propone a sustancias como los polifenoles y a los flavonoides (3), (13), además de las saponinas por su naturaleza altamente detergente, pero es interesante como la combinación del DFMO con las sustancias naturales incrementa la actividad de la ODC en el riñón de los ratones con tumor. Este resultado sugiere que no se combine la ingestión de algún tipo de té o brebaje preparado con dicha planta cuando se administre DFMO, dado que este procedimiento podría favorecer el desarrollo neoplásico, en lugar de deprimirlo.

REFERENCIAS

1. Calvo-Méndez, C., Villagómez-Castro, y López-Romero, E. (1993): Rapid loss of ornithine decarboxylase activity during encystation of *Entamoeba invadens*. *FEMS Microbiol Letters*. 112: 131-134.
2. Fabian, C.J.; Kimler, B.F.; Brady, D.A.; Mayo, M.S.; Chang, C.H.J.; Ferraro, J.A.; Zalles, C.M.; Stanton, A.L.; Masood, S.; Grizzle, W.E.; Boyd, N.F.; Arneson, D.W. y Johnson, K.A. (2002): A phase II breast cancer chemoprevention trial of oral a-Difluoromethylornithine: breast tissue, imaging, serum and urine biomarkers. *Clin. Cancer Res*. 8: 3105-3117.
3. George, S.; Brat, P.; Alter, P. y Amiot, M.J. (2005): Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J. Agricult Food Chem*. 53: 1370-1373.
4. Gerner, E.W. y Meyskens, F.L. (2004): Polyamines and cancer. Old molecules, new understanding. *Nature Reviews*. 4: 781-792.
5. Jeevanandam, M. y Petersen, S.R. (2001): Clinical role of polyamine analysis: problem and promise. *Curr Opin Clin Nutr*. 4(5): 385-396.
6. Khuhawar, M.Y. y Qureshi, G.A. (2001): Polyamines as cancer markers: applicable separation methods. *J. Chrom. B*. 764: 385-407.
7. Linsalata, M.; Giannini, R.; Notarnicola, M. y Cavallini (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and spermidine/spermine N1-acetyltransferase gene expression are significantly correlated in human colorectal cancer. *BMC Cancer*, 6: 191.
8. Martínez, M. (2003): Pronounced reduction in adenoma recurrence associated with aspirin use and a polymorphism in the ornithine decarboxylase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100: 7859-7864.
9. Murakami, Y.; Matsufuji, S.; Hayashi, S.; Tanahashi, N.; Tanaka, K. (2000): Degradation of Ornithine decarboxylase by the 26S proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Co*. 267: 1-6.
10. Pegg, A.E. (2006): Regulation of ornithine decarboxylase. *J. Biolog. Chem*. 281: 14529-14532.
11. Petros, L.; Howard, M.T.; Gesteland, R.F. y Atkins, J.F. (2005): Polyamine sensing during antizyme mRNA programmed frameshifting. *Biochem Biophys Res Co*. 338: 1478-1489.
12. Pryme, I. F. y Bardocz, S. (2001): Anti-cancer therapy: diversion of polyamines in the gut. *Eur. J. Gastroen. Hepatol*. 13(9): 1041-1046.
13. Puebla-Pérez, A.M.; Huacuja-Ruiz, L.; Rodríguez-Orozco, G.; Villaseñor-García, M.M.; Miranda-Beltrán, M. de la L.; Celis, A. and Sandoval-Ramírez, L. (1998): Citotoxic and antitumour activity from *Bursera fagaroides* ethanol extract in mice with L5178Y lymphoma. *Phytotherapy Res*. 12: 545-548.
14. Puebla-Pérez, A.M. Immunomodulatory effect of ethanol extract from *Bursera fagaroides* in mice with L5178Y. Datos no publicados.
15. Ramirez-Mares, M.V.; Chandra, S. y Gonzalez de Mejia, E. (2004): *In vitro* chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutat Res*. 554: 53-65.
16. Thomas, T. y Thomas, T.J. (2001): Polyamines in cell growth and cell death: mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol. Life Sci*. 58: 244-258.
17. Urdiales, J.L.; Medina, M.A. y Sánchez-Jiménez (2001): Polyamine metabolism revisited. *Eur J Gastroen Hepat* 13: 1015-1019.
18. Villanueva, V. y Adlakha, R. (1978): Automated analysis of common basic amino acid, mono-di- and polyamines, phenolicamines, and indoleamines in crude biological samples. *Anal. Biochem*. 91: 264-275.
19. Wallace, H. y Caslake, R. (2001): Polyamines and colon cancer. *Eur J. Gastroen Hepat*. 13: 1033-1039.

(Recibido 9-7-2007; Aceptado 14-9-2007)