

Efecto antitumoral del extracto acuoso de *Bomarea cornigera* (Alstroemeriaceae) en sarcomas inducidos en ratones

Antitumoral effect of the aqueous extracts of *Bomarea cornigera* (Alstroemeriaceae) on the sarcoma induced in mice

José Suárez^{1,2*}, Christian Villanueva^{1,2}, Claudia Rodríguez^{1,2}, Karol Lavado¹, Melissa Barbieri², Luis Guzmán^{1,2}, Ricardo Alfaro^{1,2} y José Pino¹

* Dirección para correspondencias

1 Laboratorio de Reproducción y Biología de Desarrollo. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Ciudad Universitaria, Av. Venezuela s/n. Apartado postal 11-058, Lima 11.

2 Asociación Presservaris. Calle Felix Tello Mz K lot 2 Urb. Honor y Lealtad, Surco. Lima, Perú. Teléfono. 51 1 2577556. Email José Suáres: jsuarez@presservaris.org

Resumen

Se investigó el efecto antitumoral del extracto acuoso del bejuco *Bomarea cornigera*. Ratones de la cepa Swiss albina fueron inoculados con la línea tumoral TG-180 por 15 días; luego del cual se separaron en 5 grupos (n=5 por grupo). Se administró intraperitonealmente ciclofosfamida (control positivo), agua destilada (control negativo) y el extracto en concentraciones de 1X, 2X y 4X; se evaluó la morbilidad, mortalidad, el peso y la longitud del sarcoma. Se encontró un efecto inhibitorio del extracto de *B. cornigera* en el desarrollo del tumor sólido en ratones en los cuales se les transplanto el sarcoma TG-180. Las tasas de inhibición fueron 87,44 y 8,52% después de 17 días de tratamiento considerando la dosis 1X (más baja) y 2X (intermedia), respectivamente. Estos resultados sugieren que la administración de extracto acuoso de *B. cornigera* vía intraperitoneal puede ser útil como inhibidor del cáncer.

Palabras clave: *Bomarea cornigera*, antitumor, planta medicinal, TG-180, cáncer.

Abstract

We investigated antitumor effect of aqueous extract of *Bomarea cornigera*. Swiss albino mice strain were inoculated with tumor cell line TG-180 for 15 days, after which they were separated into 5 groups (n= 5 per group). Cyclophosphamide was administered intraperitoneally (positive control), distilled water (negative control) and the aqueous extract at concentrations of 1X, 2X and 4X; the morbidity, mortality, weight and length of the sarcoma were assessed. We found an inhibitory effect of extract of *B. cornigera* in the development of solid tumor in mice where the TG-180 sarcoma was transplanted. The inhibition rates were 87.44 and 8.52% after 17 days of treatment, considering 1X dose (lowest) and 2X (intermediate), respectively. These results suggest that administration of aqueous extract of *B. cornigera* intraperitoneally may be useful as a cancer inhibitor.

Keywords: *Bomarea cornigera*, antitumor, medicinal plant, TG-180, cancer.

Presentado: 05/07/2010
Aceptado: 22/11/2010
Publicado online: 21/01/2011

Introducción

Desde hace 3500 años el hombre ha empleado las plantas para el tratamiento del cáncer y son más de 3000 especies de plantas las que se han reportado para el tratamiento de esta enfermedad, las cuales inhiben, revierten o retardan la carcinogénesis multiestadio (Young-Joon et al. 2001). El periodo de investigación científica al respecto es mucho más reciente, ya que es en 1958 cuando se aisló la vinblastina, y como resultado de ello, el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América (NCI) inició diversas investigaciones acerca de las plantas con actividad anticancerosa, lo que condujo al aislamiento y conocimiento del mecanismo de acción de sustancias como las podofitoxinas, taxanos y camptotecinas. Posteriormente se han aislado de plantas compuestos que se encuentran en fase clínica como es el caso de la combretastatina A-4. (Vega-Avila et al. 2006).

La medicina tradicional es una actividad mundialmente reconocida y tiene una importancia económica creciente. Solamente en el año 2007 se gastaron en todo el mundo 4 billones de dólares por la venta de drogas anti cáncer de origen vegetal y es significativo que de los 141 medicamentos contra el cáncer que existen en el mercado de Estados Unidos de América, aproximadamente el 67% de éstos son de origen natural (Vega-Avila et al. 2006).

En los países en desarrollo, la medicina tradicional es a menudo el único y válido tratamiento accesible (Bussmann &

Sharon 2006). Las investigaciones para encontrar una droga anticáncer efectiva han motivado a los científicos para investigar la eficacia de los productos naturales en el tratamiento del cáncer, teniendo en cuenta que la literatura indica que mucha gente se cura del cáncer usando solo productos naturales las cuales en su mayoría tienen efecto antiproliferativos y mejorador de la respuesta inmune entre otros. Según Fabricant y Farnsworth (2001), el 80% de 122 drogas derivadas de plantas estaban relacionadas a su propósito etnofarmacológico original, dichas plantas eran originarias de los países tropicales.

La familia Alstroemeriaceae está distribuida desde Venezuela hasta Argentina especialmente en hábitats secos. En el Perú, son reconocidos dos géneros, *Alstroemeria* y *Bomarea*, y 85 especies básicamente hierbas y enredaderas. El género *Bomarea* se distribuye desde México hasta el norte de Argentina y Chile, esta restringido a la cordillera (hasta los 5200 m de altitud). El centro de diversidad es Ecuador y Perú (Hofreiter & Rodríguez 2006) y la mayoría de ellas son ornamentales. Bussmann & Sharon (2006) publicaron un compendio de plantas medicinales utilizadas en el norte del Perú y señalaron a *Bomarea dulcis* (Hook.) Beauv. como una planta usada para proteger y prevenir enfermedades. *Bomarea cornigera* Herb. es un bejuco, endémico del Perú, conocido solo en el centro del país, en unas pocas localidades, en la cuenca del Tulumayo. Si bien el valle de Chanchamayo ha sido extensamente alterado ecológicamente, esta especie ha sido registrada en diferentes años desde el siglo XIX. (León & Salinas 2006).

La ciclofosfamida es una droga alquilante antineoplásica, utilizada para desacelerar o detener el crecimiento de células cancerosas (linfomas, mielomas múltiples, leucemias, neuroblastoma, carcinoma ovárico, retinoblastoma, cáncer del seno, etc.) (Pino et al. 2009).

Material y métodos

Se utilizaron ratones machos (*Mus musculus*) de la cepa albina Swiss de 6 a 8 semanas de edad y de 20 – 30 g de peso fueron obtenidos del Bioterio del laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Todos los ratones fueron mantenidos bajo un régimen de 14 horas luz y 10 horas oscuridad, 22 – 24 °C, 75 – 85 % HR y alimentados con alimento balanceado para animales (Purina, Perú), y agua *ad libitum*.

Bejuco de *Bomarea cornigera* Herb. fueron obtenidos de las comunidades indígenas Ashaninka de la provincia de Chanchamayo, departamento de Junín, en el mes de noviembre de 2005. En el laboratorio, fueron identificados por las claves vigentes (Hofreiter & Rodríguez 2006).

Se utilizaron una solución R10 (RPMI 1640 Sigma-Aldrich), suplementado con suero bovino fetal inactivado (Gibco), solución hepes 1M (Sigma) y L-Glutamine-Pe-Streptomycin (Sigma), ciclofosfamida (CP) [N, N - bis (2 - cloroetil) tetrahidro - 2H -1, 3, 2 -oxazafosforin - 2 - amino 2 - oxido] - Endoxan 200 mg, agua destilada, y Azul de Trypan.

Para la preparación del extracto acuoso, se hirvieron nudos (8 – 10 g) del tronco del bejuco en agua destilada por cada dosis, durante 30 min hasta obtener una infusión en recipientes conteniendo: 2 nudos en 1000mL (1X), 2 nudos en 500 mL (2X) y 2 nudos en 250 mL (4X) mL de agua, las dosis se mantuvieron a una temperatura de -20 °C en condiciones de esterilidad para su uso diario.

Para formar los tumores sólidos se trabajo con células de la línea TG180. Las células fueron descongeladas a baño maría durante 1 minuto, luego se añadió al vial 1mL de solución R10 (RPMI 1640 - Sigma-Aldrich suplementado con Suero Bovino Fetal inactivado – Gibco, Solución Hepes 1M Sigma y L-Glutamine-Pe-Streptomycin Sigma) y se traslado todo el contenido a un tubo Falcon de 15 mL con 8 mL de R10 a 4 °C. Las células de sarcoma fueron lavadas 3 veces centrifugándolas a 500 g por 10 min a 5 °C. Las células fueron estabilizadas en R10 (37 °C, 5% de CO₂) durante 4 h.

Para determinar la viabilidad y recuperación, se determinó la concentración células de sarcoma mediante el conteo de células viables y no viables teñidas con un colorante vital (Azul de Trypan) y con ayuda de un microscopio compuesto. Con esos datos se calculo la viabilidad con la formula (Células vivas/células totales x100).

Cada ratón fue inyectado subcutáneamente (dorso) con 105 células/100 µL. Luego de la inoculación los ratones fueron observados (comportamiento, respiración e irritabilidad) a los 30, 60, 120, 360 y 720 minutos posteriores al inoculo y luego cada 24 h, a fin de evaluar cualquier cambio que nos indique alguna reacción secundaria durante el proceso de colonización del de las células tumorales. Se espero 15 días para que el sarcoma se desarrollara, luego de lo cual se inicio la fase del tratamiento.

Diseño experimental.- Los ratones fueron distribuidos al azar en cinco grupos (n= 5, cada grupo) de tratamiento: Al grupo control positivo (TI), se le inyectó intraperitonealmente (i.p.) Ciclofosfamida (0,3 mg/mL), a los Grupo TII (1X), Grupo TIII (2X), Grupo TIV (4X) se les inyectó vía i.p. las dosis preparadas y guardadas; y al control negativo (TV), se le inyectó i.p. agua destilada (Grochow & Ames 1997); Los tratamientos fueron aplicados una vez al día, a la misma hora (12:00 m) durante 17 días.

Evaluación de los ratones.- Al finalizar el periodo de tratamiento los animales fueron eutanizados por dislocación cervical y se procedió a realizar la extracción de los tumores (Bezerra et al. 2006). Para ello se realizó una disección alrededor del tumor, teniendo mucho cuidado de no comprometer la integridad de este. Luego el tumor fue limpiado de grasa y piel. Los parámetros evaluados en los tumores fueron: peso y diámetro (balanza analítica y vernier, respectivamente). La tasa de inhibición (%) fue calculada por la siguiente formula:

$$\text{Tasa de inhibición (\%)} = [(A - B)/A] \times 100$$

Donde A es el peso promedio del tumor del control negativo, y B es el peso del tumor en el grupo tratado. Se reviso, además otros órganos como hígado, riñones, pulmón, estomago, páncreas, intestinos y corazón en busca de alguna anomalía morfológica con ayuda de un microscopio de disección.

Análisis estadísticos.- Los resultados fueron expresados como medias ± D.S. y analizados por la prueba de ANOVA para un factor y el Test de Tukey (SPSS 15), $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

El extracto acuoso de *B. cornigera* inhibió al sarcoma 180 (TG 180) en el ensayo in vivo en ratones (Tabla 1). El tamaño del tumor decreció y la tasa de inhibición aumento con el tiempo en el grupo tratamiento II (1X) comparado con el control, esto fue más evidente en los últimos días de observación.

Viabilidad de la línea celular TG 180

El número de células TG180 iniciales en el vial fue $12,3 \times 10^6$; luego de realizar el primer recuento se obtuvo $9,5 \times 10^6$ células vivas y $1,75 \times 10^6$ células muertas lo que significa una viabilidad del 84,49% y una recuperación del 91,46%, mientras que luego del establecimiento de las células en el segundo recuento se consiguió una viabilidad del 82,95% y una recuperación del 82,95%.

Estos resultados demuestran que las células se encontraban en óptimas condiciones para ser inoculadas en los ratones. Se logro formar tumores sólidos a partir de células TG180 en el 100% de los ratones inoculados.

Peso y longitud del tumor

Al evaluar los datos de peso y longitud del tumor entre los diferentes tratamientos se observó que el tratamiento II (1X) tuvo efectos similares a los observados al grupo tratado con ciclofosfamida. Sin embargo, al evaluar las otras dosis de Bejuco se observo que éstas no tuvieron efecto alguno sobre los tumores tratados, siendo la respuesta similar a la del control negativo. Al evaluar los órganos de los ratones no se observaron alteraciones morfológicas visibles.

Tabla 1. Efecto (en porcentaje) de la infusión de extracto acuoso de *Bomarea cornigera* sobre la inhibición de tumores inducidos por células de Sarcoma TG180 en ratones.

Tratamiento		Peso (g)	Longitud (mm)	Eliminación tumor
Control Negativo	Tumor	0,92806 ^a	14,26 ^a	0/5
	Inhibición %	-	-	
Control Positivo	Tumor	0,1752 ^b	5,28 ^b	3/5
	Inhibición %	81,12	62,97	
Tratamiento 1X	Tumor	0,11652 ^b	3,98 ^b	3/5
	Inhibición %	87,44	72,09	
Tratamiento 2X	Tumor	0,849 ^a	10,64 ^a	1/5
	Inhibición %	8,52	25,39	
Tratamiento 4X	Tumor	0,77136 ^a	11,93 ^a	1/5
	Inhibición %	16,88	16,34	

a y b indican diferencias estadísticamente significativas $P < 0,05$.

Discusión

El presente trabajo reporta la actividad antitumoral del extracto acuoso de *Bomarea cornigera* en ratones a los cuales se les transplantó subcutáneamente células de Sarcoma 180. El Sarcoma 180 es un tumor originario de ratones y uno de las mas frecuentes líneas celulares utilizados en investigaciones *in vivo* relacionados a los agentes antitumorales (Bezerra et al. 2006). Los resultados obtenidos muestran que la infusión de *B. cornigera* a la concentración 1X posee un efecto antitumoral, tanto en términos de peso como en longitud, similar al de la Ciclofosfamida (Tabla 1), sin embargo la Ciclofosfamida posee un índice terapéutico muy bajo y es frecuente encontrar efectos tóxicos especialmente en pacientes que han recibido tratamiento inmunosupresor, además de ser potencialmente teratogénico. Dentro de las principales reacciones adversas de la ciclofosfamida tenemos toxicidad hematología, astenia, malestar general, infertilidad y alopecia (Grochow & Ames 1998; Sallan et al. 2006). Es por ello la importancia de encontrar tratamientos alternativos con plantas medicinales que muestren una eficacia similar pero sin presentar efectos adversos, lo que repercutiría directamente en mejorar la calidad de vida de los enfermos de cáncer que actualmente están bajo tratamiento quimioterapéutico (Natesan et al. 2007, Xie et al. 2008, Xue et al. 2009).

Aunque se podría esperar una mayor eficacia como efecto antitumoral a mayor concentración de la infusión, esto no fue así ya que se encontró a 1X la mayor reducción y eliminación del tumor, debido a una sobresaturación de los componentes activos sobre el sustrato. Nuestras observaciones de los órganos como hígado, estomago, riñón, pulmones y cerebro no encontraron daños. Sin embargo es necesario realizar estudios sobre los posibles efectos tóxicos de la infusión de *B. cornigera* en los sistemas biológicos. Según Rao et al. (2008) cuando se ha utilizado Withaferina -A (obtenida de la solanacea *Withania somnifera*) en ratones inoculados con sarcoma 180, se observó un retardo significativo del crecimiento tumoral en dosis de 10, 12, 15 mg/kg de peso corporal, sin evidenciar ninguna toxicidad sistémica notable.

En la mayoría de los casos, los fitoquímicos contra el cáncer, aislados de plantas medicinales, actúan como potentes antioxidantes o antagonistas de los radicales libres y de esta manera minimizan el daño al DNA previniendo el cáncer (Madhuri & Pandey 2009). Otros fotoquímicos son inhibidores de la lipoxigenasa y de la urokinasa (Rao et al. 2008). Igualmente, los flavonoides tienen un rol quimo preventivo en el cáncer a través

de sus efectos en la transducción de señales en la proliferación celular (Raj Kapoor et al. 2004).

El mecanismo de acción responsable de la actividad antitumoral de la infusión de *B. cornigera* aun no está elucidado, sin embargo actualmente se está estudiando a nivel mundial el rol que tienen las sustancias naturales de diferentes plantas con propiedades medicinales sobre los diferentes sistemas biológicos del organismo para demostrar su efecto antitumoral, entre ellos tenemos los que buscan factores de inhibición de la mitosis (Bezerra et al. 2006), aquellos que estimulan al sistema inmune (Malik et al. 1991, Ismaili et al. 2009) o los que actuarían sobre el material genético (Hu et al. 2007), es por ello la importancia de diseñar pruebas posteriores como el ELISPOT con la cual podríamos medir el grado de expresión del INF- γ por parte de los linfocitos T (Alzamora et al. 2007) y que permitirían esclarecer a qué nivel estaría actuando la infusión de *B. cornigera*; además de análisis que permitan determinar la composición química de la infusión y establecer las fracciones que contienen los principios activos.

El presente estudio *in vivo* puntualiza la potencial actividad antitumoral de *B. cornigera*, sin embargo es importante señalar que se requieren estudios posteriores a fin de caracterizar los principios activos y elucidar los mecanismos biológicos por los cuales la infusión estaría teniendo este efecto.

Literatura citada

- Alzamora L., E. Álvarez, D. Torres, H. Solís, Colona E. et al. 2007. Efecto de cuatro ecotipos de *Lepidium peruvianum* Chacón sobre la producción de óxido nítrico *in vitro*. Rev. peru. biol. número especial 13(3): 215 – 217.
- Bezerra D., F. Castro, A. Alves, et al. 2006. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by piperazine and piperine, two alkaloid amides from Piper. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 39:801 – 807.
- Bussmann R. & D. Sharon. 2006. Traditional medicinal plant use in Northern Peru: tracking two thousand years of healing culture. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine 2:47 [http://www.ethnobiomed.com/content/2/1/47].
- Fabricant D.S., & N. R. Farnsworth. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. Environ Health Perspect 109: 69-75.
- Grochow L. & M. Ames. (Eds.). 1998. A Clinician's Guide to Chemotherapy Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. Lippincott Williams & Wilkins Publishers.
- Hofreiter A. & E. Rodriguez. 2006. The Alstroemeriaceae in Peru and neighbouring areas. Rev. peru. biol. 13(1): 5 – 69.

- Hu S., S. Chen, X. Li, R. Qin, & Z. Mei. 2007. Antitumor effects of Chi-Shen extract from *Salvia miltiorrhiza* and *Paeoniae radix* on human hepatocellular carcinoma cells. *Acta Pharmacologica Sinica* 28 (8): 1215–1223.
- Ismaili N. Y. Bensouda, N. Mellas & H. Errihani. 2009. Role of chemotherapy in the management of primary rectal lymphoma: a case report and review of the literatura. *Cases Journal* 2:9373
- León B. & N. Salinas. 2006 Alstroemeriaceae endémicas del Perú. *Rev. peru. biol.* Número especial 13(2): 685 – 689.
- Madhuri S. & G. Pandey. 2009. Some anticancer medicinal plants of foreign origin. *Current Science* 96 (6): 779-783.
- Malik S., R. Knowles, N. East, et al. 1991. Antitumor Activity of γ -Interferon in Ascitic and Solid Tumor Models of Human Ovarian Cancer. *Cancer Research* 51: 6643-6649.
- Natesan S., S. Badami, S. Dongre & A. Godavarthi. 2007. Antitumor Activity and Antioxidant Status of the Methanol Extract of *Careya arborea* Bark Against Dalton's Lymphoma Ascites-Induced Ascitic and Solid Tumor in Mice. *Journal of Pharmacology Science* 103:12 – 23.
- Patel B., D. Sattwik, R. Prakash & M. Yasir. 2010. Natural Bioactive Compound with Anticancer Potential. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences* 1:32-41.
- Pino J., M. Noblecilla, P. Díaz, et al. 2009. Efecto del extracto acuoso de *Uncaria Tomentosa* Wiild D.C. sobre la calidad espermática de ratones tratados con Ciclofosfamida. *Revista Científica* 6(3):244 - 249.
- Raj Kapoor B., B. Jayakar, & N. Muruges. 2004. Antitumor activity of *Indigofera aspalathoides* on Ehrlich Ascites carcinoma on mice. *Indian Journal of Pharmacology* 36(1): 38-40.
- Rao G., S. Kumar, M. Islamand & S. Mansour. 2008. Folk medicines for anticancer therapy-a current Status. *Cancer Therapy* 6: 913-922.
- Sallan S., B. Camitta, D. Chan, D. Traggis, & N. Jaffe. 2006. Chemotherapy with cyclophosphamide, vincristine, cytosine arabinoside, and prednisone (COAP) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Medical and Pediatric Oncology* 3 (4): 359 – 364.
- Vega-Ávila E., R. Velasco-Lezama & M. Jiménez-Estrada. 2006. Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. *Revisión. Bioquímica* 31(3): 97-111.
- Xie Y., T. Morikawa, K. Nimomiya, et al. 2008. Medicinal Flowers, XXIII. New Taraxastane-Type Triterpene, Punicanolic Acid, with Tumor Necrosis Factor α Inhibitor Activity from the Flowers of *Punica granatum*. *Chemical Pharmacy Bulletin* 56(11):1628-1631.
- Xue Z., W. Yu, M. Wu, & J. Wang. 2009. In Vivo Antitumor and Antioxidative Effects of a Rapeseed Meal Protein Hydrolysate on an S180 Tumor-Bearing Murine Model. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 73 (11):2412-2415.
- Young-Joon S., Hye-Kyung N., Ji-Yoon L. & Y. Sam Keum. 2001. Molecular Mechanisms Underlying Anti-Tumor Promoting Activities of Heat-Processed *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Journal of Korean Medicine Science* 16 (Suppl): S38-41.