

Resultados enviados desde CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)

Otros involucrados

Pasteur, Curie, Fundacion Leloir y Bayer

A través del proceso de desarrollo del producto se fueron sorteando diferentes etapas de investigación de campo concomitantemente con pruebas de laboratorio.

En esta oportunidad se eligen para su presentación los datos obtenidos en ensayos de investigación en laboratorio en relación a las propiedades antitumorales de GREEN SAP debido a que esta es su principal acción terapéutica.

Los estudios científicos fueron realizados en Argentina en el marco de diferentes STAN (Servicios Técnicos de Alto Nivel) en el CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) <http://www.conicet.gov.ar>, a través de su unidad ejecutora CEFYBO (Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos) <http://www.conicet.gov.ar/php/datosue.php?n=02669>. En los mismos Green Sap demostró poseer efecto citotóxico, citostático "in vitro".

Posteriores estudios "in vivo" en la misma institución demostrarían entre otras cosas que en individuos tumorinducidos la mortalidad del total de los controles se concretaría 40 días post inoculación de un tumor (linfoma ascítico) mientras que en los grupos tratados vía oral con Green Sap, 260 días post inoculación permanecían ejemplares vivos.

Sobre estos estudios protocolizados se profundizará en este apéndice.

Estudio In vivo

INFORME SOBRE LA EVALUACION DEL EXTRACTO DENOMINADO GREEN SAP Y DE SUS COMPONENTES INDIVIDUALES SOBRE LA PROLIFERACION DE CELULAS BW5147

I. DESCRIPCIÓN:

La acción anti-proliferativa del producto Green Sap fue evaluada sobre células del linfoma murino BW5147 i mediante curvas dosis-respuesta y a distintos tiempos de exposición a dichos productos, en cultivos de las mismas en presencia y ausencia de dicho extracto vegetal, de sus componentes individuales o del vehículo. La respuesta proliferativa fue determinada mediante la técnica de incorporación de [3H]-timidina ([3H]-TdR) al ADN celular y posterior evaluación de la radioactividad nuclear por espectrometría de centelleo líquido.

II. ESPECIFICACIÓN DE LA METODOLOGÍA:

1- Extractos Vegetales:

Los extractos vegetales evaluados corresponden a la siguiente descripción:

Tintura Madre (TM): Corresponde a una tintura constituida por la mezcla de tres tinturas individuales, a saber: tintura de *Baccharis articulata* 40 % v/v; tintura de *Rosmarinus officinalis* 40 % v/v y tintura de *Plantago major* 20 % v/v. El contenido alcohólico de la tintura madre es de 50 %.

Producto final 1 (PF1) u Green Sap: Corresponde a una dilución 1/10 de la tintura madre en agua (tintura de *Baccharis articulata* 4 % v/v; tintura de *Rosmarinus officinalis* 4 % v/v , tintura de *Plantago major* 2 % v/v y contenido alcohólico de 5 % v/v).

Producto final 3 (PF3): Corresponde a una dilución 1/10 de la tintura madre, con un agregado de alcohol hasta una concentración final de 15 % v/v.

2- Línea de linfoma murino:

La línea empleada corresponde a un linfoma T murino, denominado BW5147, proveniente de un tumor espontáneo de ratones AKR/J adaptado a cultivo, originado en los Laboratorios Jackson, USA. El mismo es sensible a cortisol (10^{-6} M) y expresa el haplotipo H-2k y los siguientes marcadores: CD3+, receptor T ab y Thy 1.1, los que son rutinariamente chequeados por citometría de flujo con anticuerpos monoclonales específicos.

3- Condiciones de cultivo y evaluación de la proliferación celular:

Las células BW5147 ($3-5 \times 10^5$ cel/ml) se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino y 2 mM de glutamina en presencia de los antibióticos penicilina (100U/ml) y estreptomina (100 μ g/ml), en placas de 96 pocillos (volumen final 0.2 ml), en condiciones de esterilidad (flujo laminar, Steril Guard Hood class II, Type a/B3; marca: Baker Company, modelo: SG-400m), y en ambiente gaseado con 5% de CO₂ (estufa gaseada de CO₂; marca: Forma Scientific; modelo: 3111). Se realizaron cultivos con concentraciones crecientes de los extractos vegetales ya mencionados durante 24, 48 y 72 hs de incubación. Las células fueron pulsadas con 0.75 μ Ci/pocillo de [³H]TdR (S = 25 Ci/mmol) 16 hs antes del sacrificio de los cultivos (por congelación a -20 °C).

Los cultivos fueron posteriormente descongelados y filtrados por filtros de fibra de vidrio, Whatmann GF/A. La [3H]-TdR incorporada al ADN nuclear y retenida en dichos filtros se cuantificó por espectrometría de centelleo líquido empleando cocktails de centelleo comerciales. Los resultados (obtenidos en dpm) se expresaron como Porcentaje de Inhibición (% Inhib) considerando como 100% a las dpm obtenidas en ausencia de extracto y/o en presencia del vehículo.

4 Determinación de la viabilidad celular:

La viabilidad celular a distintos tiempos en presencia o ausencia de TM y PF fue evaluada mediante conteo celular microscópico en cámara de Neubauer, empleando un colorante de exclusión, el Azul Tripán. Los % de Viabilidad correspondientes se calcularon teniendo en cuenta la cantidad de células vivas (que no incluyen el colorante de exclusión) con respecto al total de células (Vivas + Muertas, es decir aquellas células que incorporan el colorante y se ven de color azul a la observación microscópica).

5- Análisis estadístico de los resultados:

Los resultados fueron analizados mediante el Test de Student y Análisis de Varianza seguida del test de Dunnet para determinar las diferencias significativas entre grupos. Los valores se consideraron estadísticamente significativos cuando $p \leq 0.05$.

III. RESULTADOS

Acción anti-proliferativa dosis-respuesta de los extractos vegetales sobre las células BW5147 a las 24 hs de cultivo:

TABLA 1: Porcentaje de inhibición de la proliferación de células de linfoma T inducida por concentraciones crecientes de Green Sap, de su tintura madre y de PF3, a las 24 hs de cultivo.

	DILUCIÓN _a
TM	
DILUCIÓN _a	
PF 1	
PF 3	

% Inhibb

% Inhibb

%Inhibb

1/25

93.3 ± 2.9*

1/2.5

N.D.

N.D.

1/100

79.5 ± 5.9 *

1/10

84.7 ± 3.6 *

85.3 ± 3.9 *

1/250

60.3 ± 2.5 *

1/25

71.4 ± 3.1 *

71.1 ± 7.7 *

1/500

51.5 ± 3.4 *

1/50

44.4 ± 5.2 *

45.0 ± 4.0 *

1/1000

30.8 ± 3.5 *

1/100

23.7 ± 5.1 *

49.0 ± 2.5 *

1/2000

22.2 ± #3.7

1/200

17.0 ± 2.5 #

28.7 ± 2.4 *

1/4000

10.7 ± 1.1

1/400

5.1 ± 0.9

22.7 ± 2.6 #

1/8000

6.0 ± 0.7

1/800

1.1 ± 0.8

5.2 ± 0.5

aSe emplearon diluciones correlativas de TM y PF de acuerdo a su proporción en la TM. El volumen total de la dilución de productos vegetales agregados fue de 0.02 ml, máximo volumen que puede ser agregado sin que diluya el aporte de nutrientes en el medio de cultivo. Cabe señalar que por este motivo no se pudo evaluar (N.D. = no determinado) la dilución

de PF1 y PF3 (1/2.5) equivalente a la dilución 1/25 de TM.

b Los porcentajes de inhibición fueron calculados considerando como 100% la radiactividad de [3H]-TdR incorporada en los cultivos basales (es decir, en ausencia de producto vegetal): 24024 ± 1206 dpm. Cabe señalar que la presencia de 1.5 y 2 % del vehículo alcohólico (contenido alcohólico de la dilución 1/25 del PF3 y de la TM respectivamente) estimula la proliferación celular en un 25 % aproximadamente. Todas las otras diluciones de extractos vegetales fueron realizadas manteniendo una concentración final constante de alcohol del 0.5% que no afectó la proliferación basal. Los resultados mostrados son el promedio \pm E.S. de n=5 experimentos realizados por triplicado.

* Difiere significativamente del basal con $p \leq 0.01$

Difiere significativamente del basal con $p \leq 0.05$

Acción dosis-respuesta de las tinturas individuales sobre la proliferación de las células BW5147 a las 24 hs de cultivo:

TABLA 2: Efecto de concentraciones crecientes de las tinturas individuales sobre la proliferación de células BW5147

DILUCIÓN A:

PLANTAGO (P)
CARQUEJA (C)
ROMERO (R)

%Inhibb

%Inhibb

%Inhibb

1/25

26.0 ± 0.8#

$56.8 \pm 6.5^*$

$92.0 \pm 2.8^*$

1/50

13.8 ± 8.6

$38.5 \pm 2.5^*$

$85.8 \pm 5.1^*$

1/100

1.5 ± 0.3

24.8 ± 7.2

70.0 ± 8.5 *

1/500

1.4 ± 0.1

1.6 ± 0.1

1.6 ± 0.1

a Cada extracto de tintura individual se diluyó en medio de cultivo conteniendo una concentración final de alcohol del 50% y en las mismas proporciones que las contenidas en la TM. En cada placa se realizó un control positivo correspondiente a la dilución 1/25 de TM con la que se obtuvo en todos los casos un % Inhib ³ 94%.

b Los porcentajes de inhibición mostrados son la media \pm ES de n=2 determinaciones realizadas por triplicado y fueron calculados como se explicó anteriormente.

* Difiere significativamente del basal con $p \leq 0.01$

Difiere significativamente del basal con $p \leq 0.05$

Acción anti-proliferativa dosis-respuesta de los extractos vegetales sobre las células BW5147 a las 48 hs de cultivo:

TABLA 3: Porcentaje de inhibición de la proliferación de células de linfoma T inducida por concentraciones crecientes de Green Sap, de su tintura madre y de PF3, a las 48 hs de cultivo

DILUCIÓN a

TM
DILUCIÓN a
PF 1
PF 3

% Inhibb

% Inhibb

% Inhibb

1/25

99.4 ± *0.1

1/2.5

N.D.

N.D.

1/100

99.4 ± *0.4

1/10

98.8 ± 0.9 *

99.5 ± 8.0 *

1/250

91.2 ± *0.8

1/25

97.4 ± 6.4 *

98.8 ± 7.0 *

1/500

80.0 ± 0.5 *

1 / 50

86.4 ± 2.7 *

87.5 ± 6.0 *

1 / 1000

38.8 ± *0.9

1 / 100

31.0 ± 0.4 *

73.7 ± 1.2 *

1/2000

25.1 ± *1.1

1/200

13.8 ± 1.1 #

30.6 ± 2.0 *

1/4000

9.7 ± 0.2

1/400

11.5 ± 3.8

24.0 ± 2.1*

a Se emplearon las diluciones correlativas de TM y PF tal como se describió en la Tabla 1.

b Los porcentajes de inhibición fueron calculados tomando como 100% la radiactividad de [3H]-TdR incorporada en los cultivos basales: 32360 ± 1165 dpm. A las 48 hs de cultivo no se observaron diferencias significativas con 1.5% y 2 % del vehículo alcohólico (dilución 1/25 de PF3 y TM, respectivamente) respecto de la proliferación basal. Todas las

otras diluciones de extractos vegetales fueron realizadas manteniendo una concentración final constante de alcohol del 0.5% que tampoco afectaron la proliferación basal. Los resultados mostrados son el promedio \pm E.S. de n=5 experimentos realizados por triplicado.

* Difiere significativamente del basal con $p \leq 0.01$

Difiere significativamente del basal con $p \leq 0.05$

Acción anti-proliferativa dosis-respuesta de los extractos vegetales sobre las células BW5147 a las 72 hs de cultivo:

TABLA 4: Porcentaje de inhibición dosis-respuesta inducida por Green Sap, su tintura madre y PF3 sobre la proliferación de células de linfoma T a las 72 hs de cultivo.

TM

DILUCIÓN_a

DILUCIÓN a
PF 1
PF 3

% Inhibb

% Inhibb

% Inhibb

1/500

54.1 ± 6.8*

1/50

61.2 ± 6.8 *

64.5 ± 5.1 *

1/1000

49.0 ± 4.0 *

1/100

40.1 ± 2.8 *

46.0 ± 4.6 *

1/2000

39.3 ± 3.1 *

1/200

20.6 ± 1.1 #

26.1 ± 3.0 *

1/4000

29.0 ± 4.8 #

1/400

19.4 ± 1.7

28.8 ± 1.7*

a. Se emplearon las diluciones correlativas de TM y PF tal como se describió anteriormente.

b. Los porcentajes de inhibición fueron calculados tomando como 100% la radiactividad de [3H]-TdR incorporada en los cultivos basales: (16781 ± 1188) dpm. En todas las diluciones se mantuvo un 0.5% de contenido alcohólico que no modificó la proliferación basal.

Los resultados mostrados son el promedio ± E.S. de n=5 experimentos realizados por triplicado.* Difiere

significativamente del basal con $p \leq 0.01$ #. Difiere significativamente del basal con $p \leq 0.05$

Acción de los extractos vegetales sobre la viabilidad de células BW5147 a distintos tiempos de cultivo:

TABLA 5: Efecto de TM y PF3 sobre la viabilidad de células en cultivos a los distintos tiempos de estudio

TIEMPO

(horas)

% VIABILIDAD_a

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 ± 9.8 *

77.0 ± 3.3

76.7 ± 2.9

72

34.3 ± 1.0 *

76.7 ± 1.9 *

84.3 ± 2.8 #

$24.3 \pm 1.2^*$ $60.4 \pm 2.3^*$ $80.6 \pm 2.8^*$

a. Los % de Viabilidad a cada tiempo (promedio \pm ES de n=3 experimentos) se calcularon teniendo en cuenta la cantidad de células vivas (que no incluyen el colorante de exclusión Azul Tripán) con respecto al total de células (Vivas + muertas: células que incorporan el colorante y se ven de color azul a la observación microscópica). Los resultados se compararon con los valores promedios correspondientes a los basales y a las células incubadas por los mismos tiempos en medio con 0.5% de alcohol, los que se detallan a continuación: $(95.3 \pm 1.2) \%$, $(94.0 \pm 1.4) \%$ y $(94.3 \pm 1.0) \%$ a las 24, 48 y 72 hs, respectivamente.

* Difieren significativamente de los valores basales con p \leq

0.01

Difieren significativamente de los valores basales con $p \leq 0.05$

CONCLUSIONES:

Se observa un efecto inhibitorio (Fig. 1-3, Tablas 1, 3 y 4) de la proliferación de células del linfoma T murino BW5147 inducido por los productos vegetales TM, PF1 y PF3. Dicho efecto es concentración dependiente. Se observa en los tres tiempos estudiados, 24, 48 y 72 hs de cultivo. Es máximo a las 48 hs de cultivo para las dosis más altas y se ve una potenciación a las 72 hs de cultivo de los efectos inducidos por las diluciones mayores. En este tiempo hay que considerar sin embargo la posible contribución de mecanismos de inhibición por contacto entre las células en cultivo las que se duplican cada 12-14 hs (Cremaschi et al, J. Neuroimmunol, 2000, 110: 57).

Se ha encontrado concordancia entre los efectos ejercidos por los PF y la TM, en los tres tiempos estudiados.

La evaluación de los efectos de los extractos de las tintura individuales diluidas y ensayadas en las mismas proporciones que las contenidas en la TM, permite verificar un efecto sinérgico de los tres componentes (Tabla 2, Fig. 4).

La observación microscópica con un colorante de exclusión permite inferir que tanto PF como TM tienen un efecto citostático a las 24 hs ya que no modificaron significativamente la viabilidad celular, sin embargo con el tiempo parecería darse también un efecto citotóxico en el que no se puede descartar la participación de otros factores inherentes al cultivo celular (Tabla 5, Fig. 5 y 6).

Conclusión Final: tanto las TM como sus PF ejercen un efecto anti-proliferativo contundente sobre el linfoma T BW5147 que justifica proseguir con la evaluación de la acción de los mismos sobre el comportamiento biológico del linfoma in vivo

Informe preliminar Estudio 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 ($\{ [\text{peso promedio antes del tratamiento} - \text{peso promedio después del tratamiento}] / \text{peso promedio antes del tratamiento} \} \times 100$ (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 sobrevivencia 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

desobrevivida. 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.

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 producen tiempos mas prolongados, indicando un mayor porcentaje de sobrevivencia 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 sobrevivencia 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 (X

± ESM)

39,2 ± 13,3

47,5 ± 17,9

34,3 ± 13,4

19 ± 0,61

23 ± 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).