

INFORME SOBRE LA EVALUACION DE UNA HIDROALCOHOLATURA DE HIERBAS MEDICINALES Y DE SUS COMPONENTES INDIVIDUALES SOBRE LA PROLIFERACION DE CELULAS BW5147

I. DESCRIPCIÓN:

La acción anti-proliferativa de una hidroalcoholatura de hierbas medicinales fue evaluada sobre células del linfoma murino BW5147 *in vitro* 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:

- 1- 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 %.
- 2- Producto final 1 (PF1) o hidroalcoholatura: 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).
- 3- 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-2^k y los

siguientes marcadores: CD3⁺, receptor T $\alpha\beta$ 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 estreptomycin (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

1. 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 la hidroalcoholatura, de su tintura madre y de PF3, a las 24 hs de cultivo.

DILUCIÓN ^a	TM	DILUCIÓN ^a	PF1	PF3
	% Inhib ^b		% Inhib ^b	% Inhib ^b
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

^a Se 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 ± E.S. de n=5 experimentos realizados por triplicado.

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

[#] Difiere significativamente del basal con $p \leq 0.05$

Ministerio de Educación
Secretaría para la Tecnología, la Ciencia y la Innovación Productiva
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
CENTRO DE ESTUDIOS FARMACOLOGICOS Y BOTANICOS (CEFYO)

2. 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)
	% Inhib ^b	% Inhib ^b	% Inhib ^b
1/25	26.0 ± 0.8 [#]	56.8 ± 6.5*	92.0 ± 2.8*
1/50	13.8 ± 8.6	38.5 ± 2.5*	85.8 ± 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 ≥ 94%.

^b Los porcentajes de inhibición mostrados son la media ± 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 $p \leq 0.05$

3. 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 la hidroalcoholatura, de su tintura madre y de PF3, a las 48 hs de cultivo

DILUCIÓN ^a	TM	DILUCIÓN ^a	PF1	PF3
	% Inhib ^b		% Inhib ^b	% Inhib ^b
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 ± E.S. de n=5 experimentos realizados por triplicado.

* Difiere significativamente del basal con p ≤ 0.01

[#] Difiere significativamente del basal con p ≤ 0.05

Ministerio de Educación
Secretaría para la Tecnología, la Ciencia y la Innovación Productiva
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
 CENTRO DE ESTUDIOS FARMACOLOGICOS Y BOTANICOS (CEFYO)

4. 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 la hidroalcoholatura, su tintura madre y PF3 sobre la proliferación de células de linfoma T a las 72 hs de cultivo.

DILUCIÓN ^a	TM	DILUCIÓN ^a	PF1	PF3
	% Inhib ^b		% Inhib ^b	% Inhib ^b
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 $p \leq 0.05$

5. 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 ± 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 ± 1.2*	60.4 ± 2.3*	80.6 ± 2.8*

^a Los % de Viabilidad a cada tiempo (promedio ± 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 ± 1.2) %, (94.0 ± 1.4) % y (94.3 ± 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 $p \leq 0.05$

Ministerio de Educación
Secretaría para la Tecnología, la Ciencia y la Innovación Productiva
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
CENTRO DE ESTUDIOS FARMACOLOGICOS Y BOTANICOS (CEFyBO)

CONCLUSIONES:

- 1- 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).
- 2- Se ha encontrado concordancia entre los efectos ejercidos por los PF y la TM, en los tres tiempos estudiados.
- 3- 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).
- 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*.


DRA. GRACIELA CREMASCHI
INVESTIGADOR INDEPENDIENTE
CEFyBO - CONICET

Dra. GRACIELA A. CREMASCHI
VICEDIRECTORA
CEFyBO - CONICET



INVESTIGADOR ADJUNTO
CONICET.



Figura 1: Porcentaje de inhibición de la proliferación de células de linfoma T dosis-respuesta inducida por la tintura madre a diferentes tiempos de cultivo.

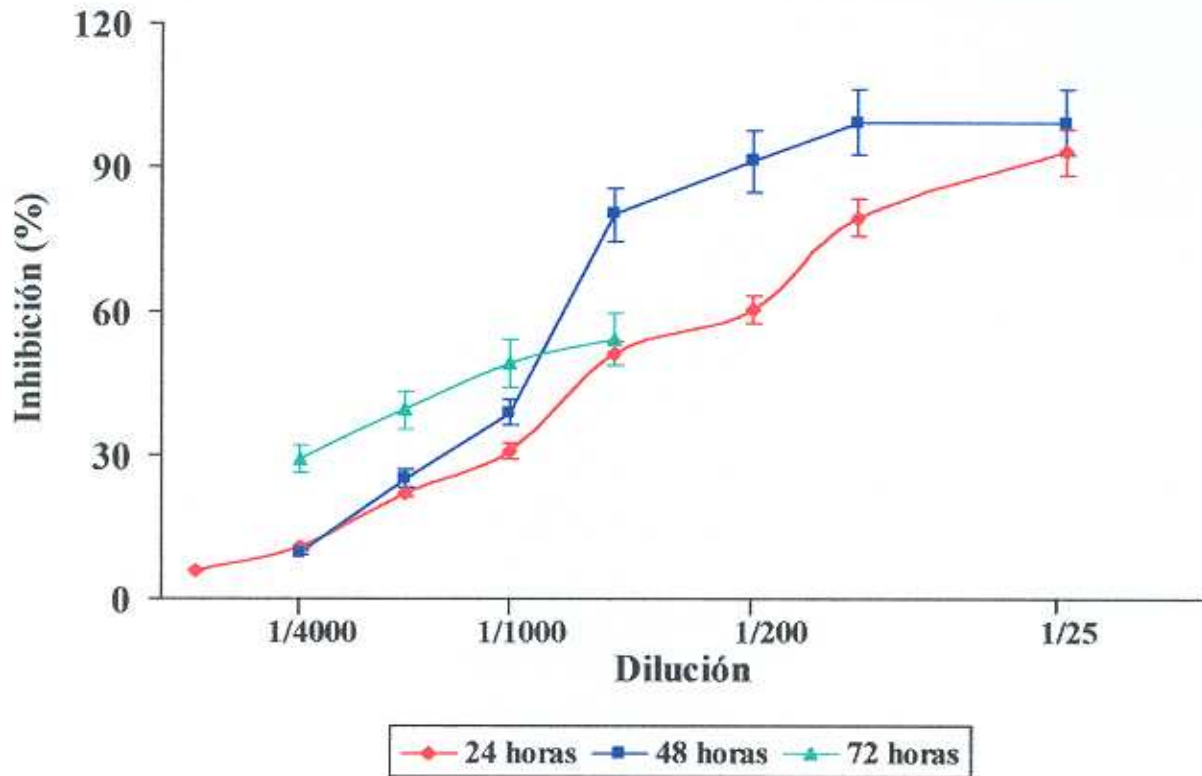


Figura 2: Porcentaje de inhibición de la proliferación de células de linfoma T dosis-respuesta inducida por el producto final 1 (PF1) a diferentes tiempos de cultivo.

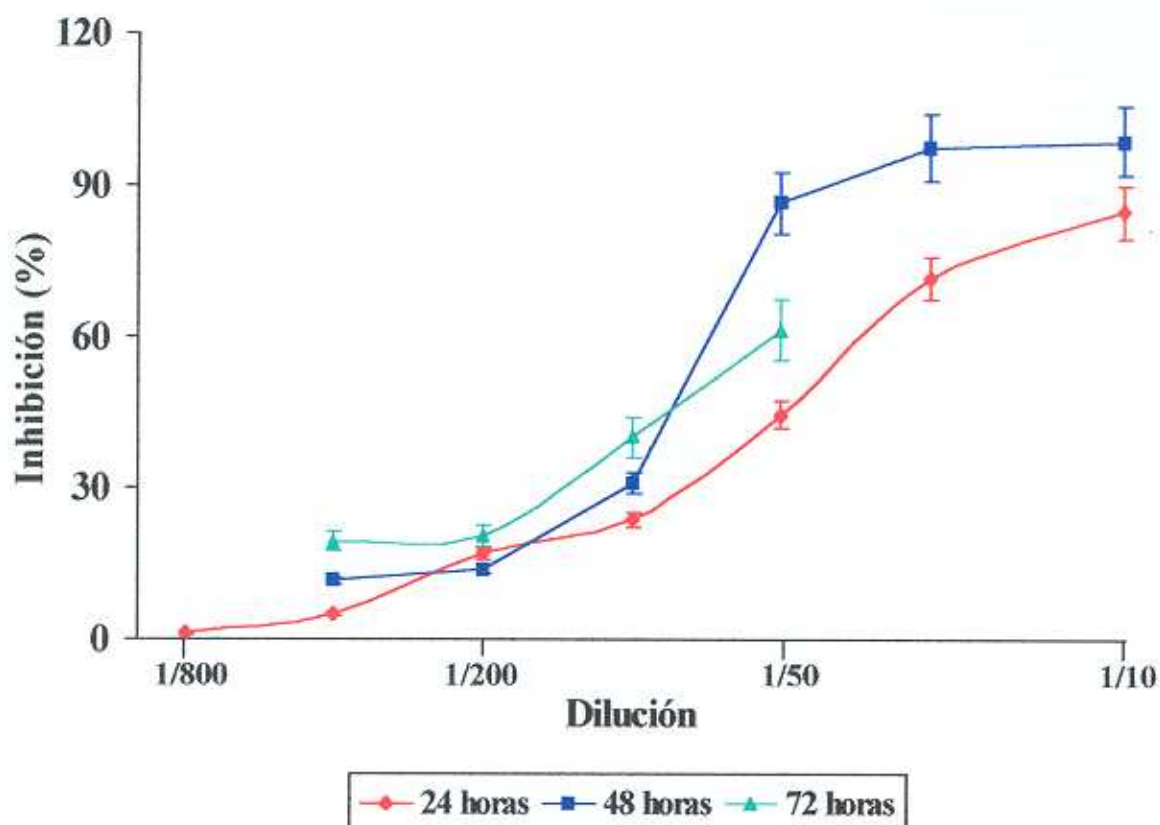


Figura 3: Porcentaje de inhibición de la proliferación de células de linfoma T dosis-respuesta inducida por el producto final 3 (PF3) a diferentes tiempos de cultivo.

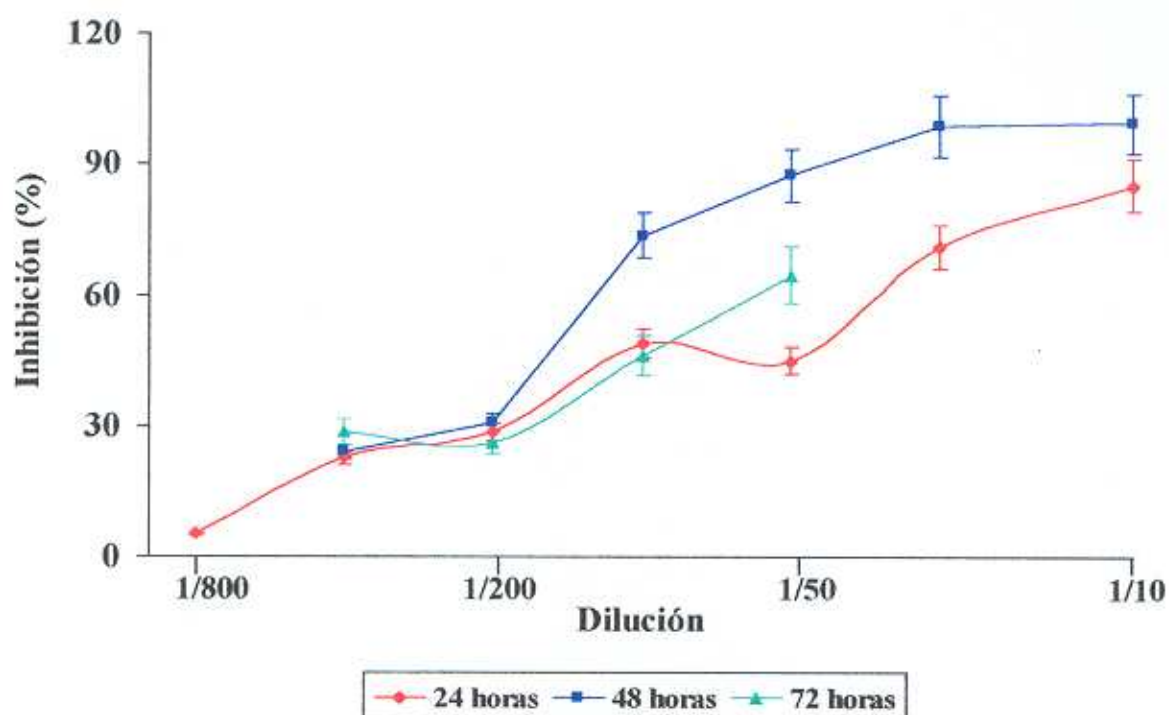


Figura 4: Porcentajes de inhibición de la proliferación de células BW5147 inducida por las tinturas individuales.

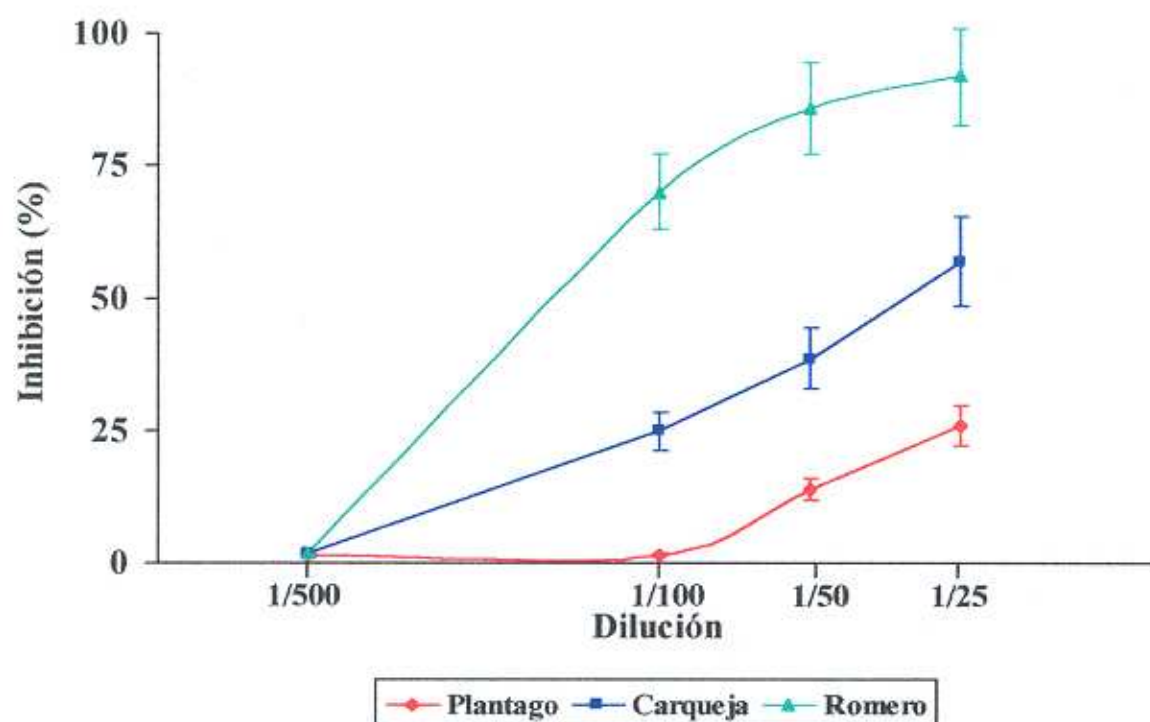


Figura 5: Efecto de la tintura madre sobre la viabilidad de células BW5147 a diferentes tiempos de cultivo.

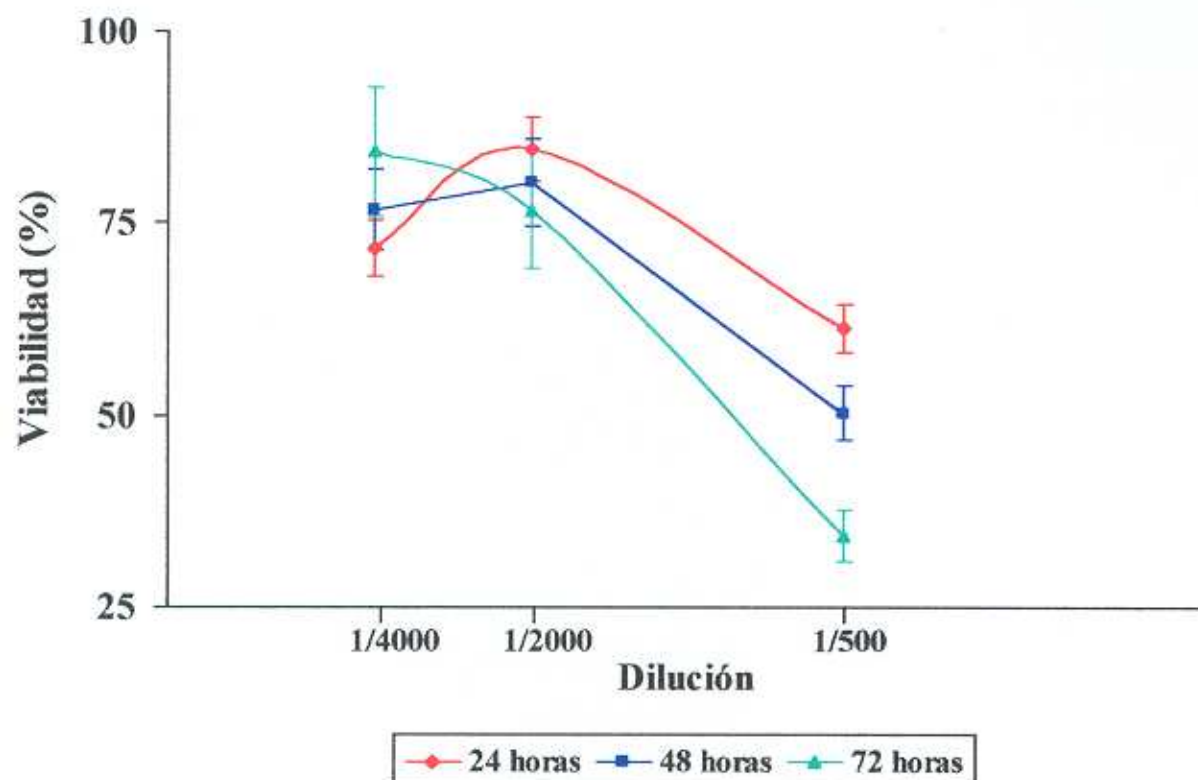


Figura 6: Efecto del producto final 3 (PF3) sobre la viabilidad de células BW5147 a diferentes tiempos de cultivo.

