

Efectos de las hojas de *Erythrina cristagalli* Linne (ceibo) sobre adenocarcinomas inducidos en ratas F344

Ciró, R.O.; Millen, N.; Haye de Cura, C.; Belart, M.; Bear, D.; Piva, J.; Ciró, G.; Contini, L.

Cátedra de Fisiología Humana. Escuela Superior de Sanidad "Ramón Carrillo" Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

RESUMEN: Se estudió el efecto cancerígeno de la nitroso – metil – urea (N. M. U) en ratas Fischer 344 comprobándose que en un alto porcentaje produjo adenocarcinomas mamarios, corroborado con punción biopsia diagnóstica y estudio Histopatológico con tinción de Hematoxilina – Eosina e Impregnación Argéntica. Luego se realizó el tratamiento con el macerado de las hojas de E. C. y el estudio estadístico de los resultados expresa que hay diferencias significativas tanto en lo que respecta a la sobrevida, necrosis y crecimiento tumoral comparado con el grupo control, por lo que se infiere que la acción individual o combinada de los componentes de las hojas de Erythrina Cristagalli Linné (Ceibo) podrían poseer efectos beneficiosos sobre el adenocarcinoma inducido de mama.

Palabras clave: Nitrosometilurea (N. M. U.) - Adenocarcinoma - Erythrina Cristagalli (E. C.)

SUMMARY: *Erythrina cristagalli* linne (ceibo) leaves effects over adenocarcinomes induced in rats F 344. Ciró, R. O. ; Millen, N.; Haye de Cura, C.; Belart, M.; Bear, D.;Piva, J.; Ciró, G.; Contini, L.. The cancerous effect of the N. M. U. in Fischer 344 rats was studied, veryfing that in a high porcentage it produced mammary adenocarcinomes, wich was corroborated with diagnostic Biopsia puncture and histopathologic study with hetoxilina-eosine and silver impregnation. The treatment ??? on E.C. macerated leaves was them performed, the stastical treatment of the results showing significant differences between not only ???the overlife compared to the control group, Therefore it can be imferred that either the individual or combined action of the components of the Erythrina cristagalli linne leaves (Ceibo) would have possess beneficial effects over the induced mammary adenocarcinoma.

Key words: Nitrosomethylurea (N. M. U.) - Adenocarcinome - Erythrina cristagalli (E.C.)

*** Correspondencia:**

Dr. Rolando O. Ciró. Laprida 5598. CP. 3.000
Santa Fe. Tel 0342-4600176
e-mail: rolandociro@arnet.com.ar

Introducción

El adenocarcinoma mamario posee muchas variables terapéuticas, en base a técnicas quirúrgicas, tratamientos radiantes y quimioterápicos. Teniendo como referencias a dichos de antiguos pobladores de las islas de la costa del río Paraná ya que por tradición oral se sabe de aborígenes de la zona que empleaban al ceibo como tratamiento de distintas afecciones, fundamentalmente locales, ha sido nuestro propósito verificar estas posibles propiedades respecto al cáncer, como terapéutica alternativa, tratando de mejorar las expectativas de sobrevida en las ratas F 344 con adenocarcinomas inducidos de mama. (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (17) (18) (21) (23) (24)

Material y métodos

1- Animales: Se utilizaron ratas hembras (1) (14) Fischer 344 (Colonias creadas a partir de animales provistos por la C. N. E. A. (Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires) alimentadas ad libitum con alimentos balanceados (marca Cooperativa) y agua, mantenidas a una temperatura que osciló entre los 22 y 25 grados centígrados y con un período de luz / oscuridad de 12 / 12 horas.

2- Inducción del tumor: A los 50 días de vida fueron pesadas con una balanza marca C. A. M. III (sensibilidad de un gramo), para el cálculo de la dosis de N. M. U. (Nitrosometilurea marca Sigma) (12) (15) (22) y se utilizaron tres inyecciones intraperitoneales a los 50, 80 y 110 días de vida en dosis de 50 mg / Kg de peso cada una (13). Estas inyecciones siempre se efectuaron a las 17 horas.

3- Detección del tumor: A todas las ratas inyectadas se las examinó por palpación a partir de la segunda dosis de N. M. U., es decir desde los 80 días de vida, día por medio.

4- Medición del tumor: el tamaño del tumor fue medido en dos diámetros con calibre Vernier con sensibilidad de 1 / 10 de mm y se tomó como período de latencia a la cantidad de días transcurridos desde la primera dosis de N. M. U. (50 días de vida) hasta la aparición del primer tumor y también se controló el número de tumores por animal.

5- Diagnóstico histológico: Una vez detectado el tumor por palpación se efectuó punción biopsia y se realizó una impronta sobre portaobjeto y al resto del material se lo colocó en una solución de formol al

10 % para posterior tinción con Hematoxilina – Eosina e impregnación argéntica para el estudio de las regiones organizadoras nucleolares argirófilas (R. O. N. A. Gs) Método de J. Piva (16) (19) (20).

6- Preparación de la solución de E. C. (Eritrina Cristagalli): Se preparó un macerado de las hojas secadas a 40 ° centígrados y trituradas en una procesadora, en agua esterilizada y fría, a razón de 200 gramos por litro de solución de Nipagin al 1 % como conservante, durante más de 48 horas, con un pH de 7. Se la conservó siempre en heladera.

7- Obtención de la dosis letal 50: Se trabajó con cinco soluciones de macerado de E. C. de 10, 20, 40 y 120 mg de residuo seco por ml y con solución de nipagin en agua al 1 % inyectando en dosis de 1ml por vía intraperitoneal en forma diaria, a ratas sanas. Dentro de los 14 días murió el 50 % de las ratas inyectadas con la concentración de 40 y de 120 mg / ml, por lo que se infirió que la dosis letal 50 es la de 40 mg / ml y se resolvió realizar el tratamiento con 20 mg / ml.

8- Parámetros de crecimiento: Se tuvo en cuenta el período de latencia, la incidencia tumoral y el número de tumores por animal.

9- Tratamiento Se comenzó al ser detectado el tumor y realizada la punción biopsia, con 0,5 ml por vía intraperitoneal, día por medio, a las 17 horas, con 20 mg/ml de residuo seco y también a la misma hora, a un lote control con tumores, se le inyectó 0.5 ml de solución de nipagin al 1 % día por medio por la misma vía.

10- Parámetros de evolución: Se tuvo en cuenta el tiempo de sobrevida, la necrosis y el crecimiento tumoral.

Resultados

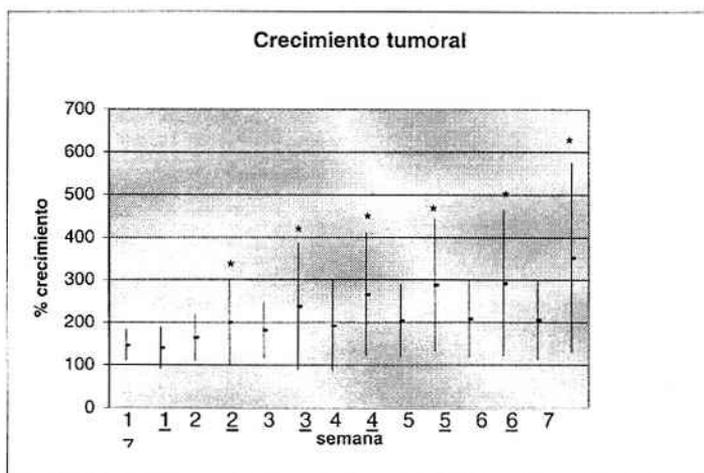
1- Diagnóstico histológico. Coloración hematoxilina – eosina e impregnación argéntica para regiones organizadoras nucleolares (19) (20). El número de regiones organizadoras nucleolares argirófilas en el núcleo en interfase, reflejó la actividad sintetizadora de A. R. N. ribosómico y el estado proliferativo. Se observaron carcinomas mamarios ductales con sectores cribiformes y el recuento de las regiones organizadoras nucleolares argirófilas dio una media de 4,71 con un mínimo de 3,17, un máximo de 6,60 y un desvío standard de 1,19. El

grado nuclear fue I o II de la clasificación de Black hasta III (el grado III es el más indiferenciado), los grados histológicos oscilaron entre I (bien diferenciado) y el II (intermedio), utilizando los criterios del Royal County Hospital, Guild Ford, que considera las agrupaciones celulares, el tamaño nuclear, la uniformidad celular, los nucléolos, el margen nuclear y las características de la cromatina. Las proliferaciones correspondieron al grado 2, y las mitosis variaron entre un índice bajo a uno alto, considerando grado mitótico uno, es decir bajo, cuando aparecen menos de 10 mitosis / 10 campos de gran aumento, grados dos entre 11 a 20 y grado tres más de 21 mitosis / 10 campos de gran aumento. Desde el punto de vista

citopatológico en general, las improntas mostraron celularidad abundante con agrupaciones moruliformes irregulares (en asta de ciervo o anguladas) o con células dispuestas individualmente. Tamaño celular mediano o grande, habitualmente telón de fondo hemorrágico, necrosis y presencia de frecuentes grumos de calcio, predominio de los polimorfocelulares neutrófilos sobre las células linfoplasmocitarias y del sistema fagocítico mononuclear.

2- Evolución:

a- Parámetros de crecimiento: De 75 ratas, 62 desarrollaron tumor, lo que representa el 82,7 %. El intervalo de confianza para $1 - \alpha = 0,95$ es $74,1 < p < 91,2$ %



El gráfico 1 representa el crecimiento tumoral semanal del grupo control (1, 2, ...) y del grupo tratado con EC (1, 2, 3, ...). * diferencias significativas por semana, $\alpha = 0.05$. (n grupo control = 30; n grupo tratado = 32)

b- Período de latencia: $n = 62$. Desde la primera dosis de N. M. U. hasta la aparición del tumor fue de 117,8 días, intervalo de confianza $1 - \alpha = 0,95$ fue de $108,7 < p < 126$ días.

c- Número de tumores: Se desarrollaron 82 tumores en las 62 ratas, 37 lo hicieron con uno solo 59,7 % y 25 desarrollaron más de uno, 40,3 %. Se destinan 32 ratas para tratamiento con E. C. y 30 para control.

d- Con respecto al crecimiento tumoral, acorde al gráfico 1, a partir de la segunda semana se notan diferencias significativas con respecto al tamaño tumoral entre los tratados con E. C. y el grupo con-

trol, siendo significativamente mayor en las ratas tratadas con respecto a las ratas control y dicho efecto continua en las semanas siguiente.

Aparición de necrosis, en las 32 ratas con tumor tratadas con E. C. aparecieron 20 tumores necrosados, lo que hace un 62,5 % y no lo hicieron 12 tumores, lo que hace un 37,5 % y el tiempo de aparición de estas necrosis osciló entre los 32 y los 143 días con un promedio de 64,45 días desde la aparición del tumor y en las 30 ratas control, aparecieron 3 necrosis, es decir un 10 % y el tiempo de aparición osciló entre los 55 y los 60 días, con un promedio de 57 días.

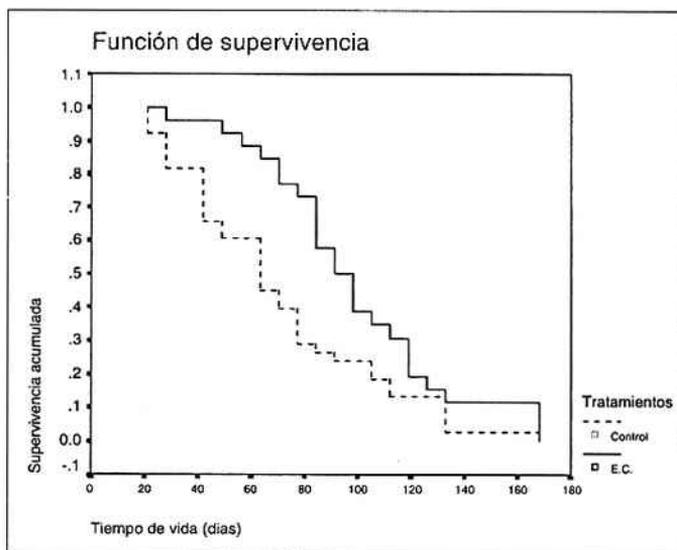


Gráfico de sobrevida, para ratas controles (discontinua) y con tratamiento (llena)

e- En cuanto a la sobrevida, acorde al gráfico, al cabo del estudio de veinticuatro semanas (168 días) se encontró que la distribución de la función de supervivencia de las ratas tratadas con E. C. es significativamente diferente a la correspondiente de las ratas control ($p = 0,0212$, prueba de Mantel Cox). Kaplan Meier. (2).-(4).-(6.)

El valor del chi cuadrado (χ^2) obtenido es de 6,63 y para un grado de libertad de 0,10, el χ^2 es de 2,706 por lo que el χ^2 de 6,63 al ser mayor a 2,706, se puede inferir que existen diferencias significativas entre ambos grupos, este método sugiere que las ratas tratadas tienen una mayor probabilidad de sobrevida que las no tratadas.

Se pudo establecer con un 95 % de confianza que las ratas tratadas con E. C. tuvieron una vida media de $98,54 \pm 13,99$ días, en cambio para las del grupo control fue de $70 \pm 11,97$ días, además, con la misma confianza se espera que muera al menos el 50 % de las ratas tratadas con E. C. al cabo de $91 \pm 13,99$ días y que las del grupo control lo hagan al cabo de $63 \pm 14,01$ días.

Discusión y Conclusiones

Se ha demostrado, acorde con numerosos autores que la N. M. U es cancerígena, produciendo

adenocarcinomas de mama en ratas susceptibles en un 82,7 % (13), (14)

Con los resultados obtenidos podemos sacar tres conclusiones, la primera es que en las ratas tratadas con E. C., los tumores crecieron más en tamaño que en las ratas control, la segunda es que las ratas con tumores tratadas con E. C. presentaron necrosis con más frecuencia que las ratas control y la otra conclusión es que la sobrevida fue significativamente mayor en las ratas tratadas, acorde a los estudios estadísticos.

Bibliografía

- 1- Adamson, R. H. y col. 1977. Carcinogenicity of l-methyl - 1 - nitrosourea in no human primates. J. Natl Cancer Inst. **59**, 475 - 482
- 2- Altman, Douglas. 1997. Practical statistics for medical research. Chapman and Hall. London 7º reimpresión.
- 3- Arafah, B. M. y col. 1982. Hormone dependence in N - nitrosomethyl - urea - induced rat mammary tumors. Endocrinology **III** - 584 - 588
- 4- Armitage, P; Berry, G. 1997. Estadística para la investigación biomédica Harcourt. Barc de España S. A.
- 5- Burgstaller, J. A. 1994. Hierbas medicinales indígenas guaraníes 3º Ed. Edicial. S.A. Buenos Aires Argentina.

- 6- Collet, D. 1999. Modelling survival data in medical research. Chapman & Hall C.R.C: Boca Ratón London.
- 7- Chifa, Carlos; Ricciardi, Armando. 2001 Plantas de uso en medicina vernácula. Miscelánea 117. Fundación Miguel Lillo Tucumán Argentina
- 8- Dimitri, M. 1977. El Libro del árbol, vol I, II, y III Ed Celulosa Argentina Buenos Aires.
- 9- Domínguez, J. A. Contribuciones a la Materia Médica Argentina. Trabajos del Instituto de Botánica y Farmacología Nº 44 Facultad de Ciencias Médicas Jacobo Peuser Argentina.
- 10- Gupta, Mahabir. 1995. Plantas Medicinales Iberoamericanas; Convenio Andrés Bello CYTED Bogotá Colombia.
- 11- Jozami, J. M.; Muñoz, D. 1984 Árboles y arbustos indígenas de la provincia de Entre Ríos 3º ed. IPNAYS (CONICET – U:N:L.) Santa Fe Argentina
- 12- Moon, R. C. y col. 1977. Retinylacetate inhibits mammary carcinogenesis induced by N – nitrosourea. Nature 267, 620 – 621.
- 13- Martín, G. y col. 1996. Receptors characterization of intraperitoneally N – nitroso – N – methylurea – induced mammary tumors in rats. Cancer Letters.
- 14- Martín, G. y col. 1997. Hormone dependence of mammary tumors induced in rats by intraperitoneal N:M:U: injection. Cancer Investigation.
- 15- Martín, G. y col. 1996. Effect of tamoxifen on intraperitoneal N – nitroso – methylurea induced tumors. Cancer Letters.
- 16- Mc Kee, G. T. 1997. Cytopathology. Ed. Mosby – Wolfe. London. Pp. 179 – 80.
- 17- Muñoz, J. 2000. Flora Fanerogámica Argentina 65; 21 – 22 CONICET.
- 18- Pío Font Quer. 1993. Diccionario de Botánica Ed Labor S. A.
- 19- Piva, J. R. Y col. 2002. Regiones organizadoras nucleolares en "Atlas de Diagnóstico Rápido en Patología Humana y Veterinaria" Universidad Nacional del Litoral. Centro de Publicaciones. T.1 Ed en C. D.
- 20- Piva, J. R. ; Piva, C.E. y col. 1999. "Microwave – Enhances of silver impregnation applied in Dermatohistopathology" Biocell, 23 (2); 143 – 47.
- 21- Ratera, E. I. 1980. Plantas de la Flora Argentina empleadas en medicina popular 1º ed Hemisferio Sur S. A. Buenos Aires Argentina.
- 22- Rivera, E. S. y col. 1994. Induction of mammary tumors in rat by intraperitoneal injection of NMU: histopathology and estral cycle influence. Cancer Letters.
- 23- Rondina, R.; Coussio, J.D. 1981. Ensayo fitoquímico orientativo de plantas con actividad farmacológica potencial, departamento de farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Buenos Aires Argentina.
- 24- Toursarkissian, M. 1980. Plantas medicinales de la Argentina. 1ºed Editorial Hemisferio Sur S. A. Buenos Aires Argentina.