

EFFECTO DE LA CARRAGENINA E INDOMETACINA SOBRE EL CRECIMIENTO DE UN FIBROSARCOMA MURINO

HECTOR H. VITALONE, GEORGINA N. TORRES NIETO de MERCAU,
JUAN CARLOS VALDEZ, SUSI DAVOLIO, GUILLERMO MERCAU

Departamento Biomédico, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Tucumán

Resumen Los tumores sólidos para crecer más de 2 mm, necesitan desarrollar nuevos vasos sanguíneos. Las células neoplásicas secretan factores de crecimiento que estimulan la angiogénesis y el crecimiento tumoral. La Carragenina bloquea *in vitro* la unión de los factores de crecimiento a sus receptores. Ensayamos *in vivo* su acción con el objeto de analizar si inhibe el desarrollo de un fibrosarcoma murino. Para neutralizar la acción inflamatoria de la Carragenina usamos la Indometacina, que es un antiinflamatorio no esteroide. El tumor usado fue un fibrosarcoma inducido con metilcolantreno en ratones Balb/c y mantenido por pasaje seriado de células tumorales, en ratones de la misma cepa. El volumen de los tumores fue evaluado midiendo dos dimensiones y aplicando la fórmula $V = 0.4 \times d^2 \times D$. Los ratones con tumores fueron separados en grupos, uno de los cuales se usó como testigo y los otros tratados en forma separada con Indometacina, Carragenina y Carragenina-Indometacina. Se comparó el volumen de los tumores de los ratones tratados con respecto al testigo y el de los tratados entre sí, utilizando el Test t de Student. Se demostró que la Carragenina y la Indometacina, inhiben el desarrollo del fibrosarcoma. La acción inhibitoria de la Carragenina sobre el crecimiento tumoral es significativamente mayor que el efecto antitumoral de la Indometacina y el de la Carragenina-Indometacina.

Abstract *Effect of carrageenan and indomethacin on the growth of a murine fibrosarcoma.* In order to grow, solid tumors need to develop new blood vessels. Neoplastic cells secrete growth factors that stimulate angiogenesis and tumor growth. Since Carrageenan acts as *in vitro* blocking agent which interferes with growth factor-receptor binding, we tested its action *in vivo* in order to analyze its growth inhibition capability in an experimental murine fibrosarcoma model. Indomethacin was used as a non-steroidal anti-inflammatory agent to neutralize the inflammatory action of Carrageenan. A murine fibrosarcoma was induced with methylcholanthrene in Balb/c mice and maintained by serial passage of tumor cells in mice of the same strain. Tumor volume was evaluated measuring two dimensions and applying the formula $V = 0.4 \times d^2 \times D$. The mice with tumors were separated into groups; one of them was used as control and the other ones were treated with Indomethacin, Carrageenan and Carrageenan-Indomethacin. Tumor volume was compared between groups using the Student t Test. We demonstrated that Carrageenan and Indomethacin inhibit tumor growth. The inhibitory action of Carrageenan is significantly higher than the antitumoral effect of either Indomethacin or Carrageenan-Indomethacin.

Key words: Carrageenan, Indomethacin, growth factor, tumor growth, angiogenesis, inhibitors

Los factores de crecimiento son polipéptidos que modulan una amplia variedad de funciones celulares, por lo que representan un atractivo blanco para el desarrollo de drogas antagonistas.

Un importante grupo de antagonistas de factores de crecimiento es el de los polisacáridos polisulfatados¹ como la Heparina, que modula la actividad del factor de crecimiento fibroblástico ácido (FGFa) y básico (FGFb)^{2, 3, 4}; el Dextrán-Sulfato, que modula las actividades del factor de crecimiento fibroblástico soluble (FGFs)⁵ y el Suramin⁶, que inhibe la unión a sus receptores de un

importante grupo de factores de crecimiento. Finalmente, la Carragenina representa una familia de polisacáridos polisulfatados, cuyos efectos fisiológicos incluyen la modulación de la función inmune inflamatoria^{7, 8, 9} y actividad antimetastásica¹⁰. Recientemente se demostró que la Carragenina inhibe la unión del FGFb, del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), del factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF), del factor de crecimiento insulínico-1 (IGF₁) y del factor de crecimiento transformante- α (TGF α) a sus receptores¹.

La producción de FGFb está implicada en la proliferación y neovascularización de tumores¹¹, por lo que la Carragenina podría ensayarse como agente anticanceroso. Como la Carragenina es un agente inflamatorio^{7, 8, 9}, su posible actividad anticancerígena puede ser evaluada experimentalmente con y sin el componente inflamatorio.

Recibido: 22-XII-1998

Aceptado: 10-XI-1999

Dirección postal: Dr. Héctor H. Vitalone, España 1857, 4000 San Miguel de Tucumán, Argentina
Fax: (54-0381) 4236466

e-mail: gmercau@unt.edu.ar

La inflamación producida por la Carragenina se debe fundamentalmente a que esta sustancia estimula la producción de prostaglandinas^{7, 8, 9}, las cuales derivan del metabolismo del ácido araquidónico¹² y promueven los procesos inflamatorios-inmunológicos y angiogénicos^{13, 14, 15}. Para anular la inflamación producida por la Carragenina puede usarse la Indometacina¹⁶, un antiinflamatorio no esteroide que bloquea la síntesis de prostaglandinas⁸.

Dado que las prostaglandinas producidas por las células tumorales¹² inducen angiogénesis en tumores sólidos¹⁷, el uso experimental de la Indometacina potenciaría la acción anticancerígena de la Carragenina. Es conocido que la Indometacina inhibe la respuesta vascular tumoral estimulada por linfocitos y macrófagos^{18, 19}, así como también inhibe el crecimiento del tumor desmoide²⁰ y del carcinoma hepatocelular con hipercalcemia²¹.

En el presente trabajo se analiza la acción de la Carragenina y la Indometacina sobre el crecimiento de un fibrosarcoma murino.

Materiales y métodos

Animales: Se utilizaron 200 ratones Balb/c endocriados, de 4 meses de vida, machos y hembras, de 25 gramos de peso corporal, mantenidos a 24°C y 50% de humedad, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Fueron alimentados con una dieta balanceada (NUTRIC, Córdoba) y agua potable a discreción.

Inducción del tumor: El tumor usado fue un fibrosarcoma inducido inicialmente en ratones Balb/c, por el implante subcutáneo de cristales de metilcolantreno en el flanco lateral derecho y mantenido por pasaje seriado *in vivo* mediante la inoculación de 5×10^5 células tumorales viables, en ratones de la misma cepa. La viabilidad de las células tumorales fue determinada por el método de exclusión con azul tripán.

La suspensión de las células tumorales fue obtenida por digestión enzimática del tumor con solución salina balanceada de Hank (HBSS) conteniendo 0.05% de proteasa tipo XXV y 0.001% de deoxirribonucleasa tipo I (todas las enzimas usadas fueron de Laboratorio SIGMA).

Medición del volumen tumoral: El volumen tumoral fue evaluado midiendo con calibre Vernier dos dimensiones: Diámetro mayor y Diámetro menor (incluyendo la piel).

El volumen fue calculado usando la fórmula: $V = 0.4 \times d^2 \times D$. Donde V es el volumen tumoral en cm^3 , D y d corresponden al diámetro mayor y menor respectivamente.

Tratamiento con Indometacina y Carragenina: Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 0.05 cm^3 , se separaron los ratones en 4 grupos de 50 animales cada uno. A cada ratón del Grupo 1 se le inyectó 100 μg de Indometacina (IM 75 Laboratorio Montpellier); el Grupo 2 recibió 50 μg de lambda Carragenina, tipo IV (Laboratorio SIGMA, lote 15H0281); el Grupo 3 100 μg de Indometacina y 50 μg de Carragenina, y el Grupo 4 fue usado como control, inyectándosele 0.1 ml de solución fisiológica salina.

Todas las inoculaciones se hicieron diariamente durante 20 días, por vía intraperitoneal en un volumen de 0.1 ml de solución fisiológica salina.

A todos los grupos se les realizó una evaluación del volumen tumoral a los 3, 6, 9 y 20 días de desarrollo.

Análisis estadístico: Los volúmenes de los tumores de los ratones testigos a los 3, 6, 9 y 20 días fueron comparados con el volumen de los tumores de los ratones tratados en los mismos tiempos, mediante el test t de Student para muestras no pareadas.

Así mismo, el análisis del volumen de los tumores de los ratones tratados fueron comparados entre sí, usando el mismo test.

El volumen de los tumores del grupo testigo fue comparado en sus diferentes tiempos de desarrollo tumoral (3, 6, 9 y 20 días) mediante el análisis estadístico del test T de Student para muestras pareadas. Del mismo modo, el volumen de los tumores de los ratones tratados de cada tratamiento se comparó en los mismos tiempos de desarrollo por el mismo test.

Los resultados (media-error estándar) fueron representados por gráficas en curva.

Resultados

Los tumores de los ratones tratados con Indometacina alcanzaron un volumen menor que el de los tumores de los ratones testigo, a los 6 ($p < 0.001$), 9 ($p < 0.001$) y 20 días de tratamiento ($p < 0.001$), no así a los 3 días, tiempo en el cual no hubo diferencias significativas, (Tabla 1, Fig. 1). El volumen de los tumores de ratones tratados con Carragenina fue menor que el de los testigos a los 3 ($p < 0.001$), 6 ($p < 0.001$), 9 ($p < 0.001$) y 20 días (Tabla 1, Fig. 1). Del mismo modo, el volumen de los tumores de los ratones tratados con Carragenina-Indometacina fue menor que el volumen del grupo testigo a los 3 ($p < 0.001$), 6 ($p < 0.001$), 9 ($p < 0.001$) y 20 días de tratamiento ($p < 0.001$) (Tabla 1, Fig. 1).

El análisis comparativo de los volúmenes de los tumores de los ratones tratados entre sí mostró que el volumen tumoral del grupo Carragenina fue menor a los 3 ($p < 0.001$), 6 ($p < 0.02$) y 20 días ($p < 0.05$) en relación

TABLA 1.— Volumen tumoral de diferentes grupos en relación al tiempo (cm^3)

Tratamientos	3 días	6 días	9 días	N	20 días	Muertos
Testigo	0.4 ± 7.9	0.8 ± 0.03	2.2 ± 0.1	50	8.1 ± 0.6	37
Carragenina	0.2 ± 0.01	0.4 ± 0.03	0.9 ± 0.1	50	2.8 ± 0.2	8
Indometacina	0.4 ± 8.9	0.5 ± 0.02	1.4 ± 0.1	50	4.8 ± 0.3	16
Carragenina Indometacina	0.3 ± 0.01	0.5 ± 0.04	0.9 ± 0.1	50	3.5 ± 0.2	13

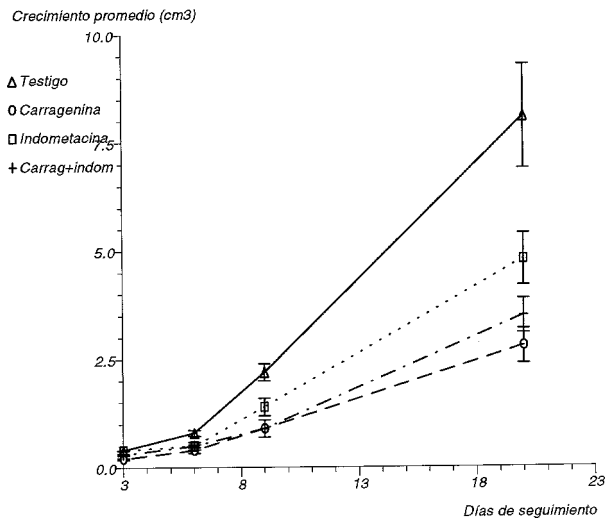


Fig. 1.— Relación del crecimiento tumoral con respecto a los días de tratamiento

con el grupo Carragenina-Indometacina, sin diferencia significativa a los 9 días (Fig. 1). El análisis comparativo del volumen tumoral del grupo Indometacina en relación al grupo Carragenina-Indometacina evidenció que el volumen del grupo Indometacina fue menor a los 3 ($p < 0.001$), 9 ($p < 0.001$) y 20 días ($p < 0.02$), y no así a los 6 días (p NS). (Fig. 1). El volumen tumoral del grupo testigo fue en aumento en relación con el tiempo considerado, alcanzando una media de 0.4 cm^3 a los 3 días, 0.8 cm^3 a los 6 días, 2.2 cm^3 a los 9 días y 8.1 a los 20 días (Tabla I), con diferencias significativas en sus volúmenes entre los 3 y 6 días ($p < 0.001$), 3 y 9 días ($p < 0.001$), 6 y 9 días ($p < 0.001$) y 9 y 20 días ($p < 0.001$), (Fig. 1).

De igual forma el volumen tumoral de los grupos tratados (Carragenina y Carragenina-Indometacina), se incrementó en relación con el tiempo considerado. En el grupo Indometacina, el volumen tumoral a los 3 días alcanzó una media de 0.4 cm^3 , a los 6 días 0.5 cm^3 , a los 9 días 1.4 cm^3 y a los 20 días 4.8 cm^3 (Tabla 1), con diferencias significativas entre 3 y 6 días ($p < 0.001$), 3 y 9 días ($p < 0.001$), 6 y 9 días ($p < 0.001$) y 9 y 20 días de tratamiento ($p < 0.001$), (Fig. 1).

El grupo Carragenina tuvo igualmente un crecimiento sostenido, con una media de 0.2 cm^3 a los 3 días, 0.4 cm^3 a los 6 días, 0.9 cm^3 a los 9 días y 2.8 cm^3 a los 20 días (Tabla 1), con diferencias significativas entre los 3 y 6 días ($p < 0.001$), 3 y 9 días ($p < 0.001$), 6 y 9 días ($p < 0.001$) y 9 y 20 días de tratamiento ($p < 0.001$), (Fig. 1).

El volumen tumoral del grupo Carragenina-Indometacina alcanzó a los 3 días una media de 0.3 cm^3 , a los 6 días 0.5 cm^3 , a los 9 días 0.9 cm^3 y a los 20 días de 3.5 cm^3 (Tabla I), arrojando diferencias significativas entre los 3 y 6 días ($p < 0.001$), 3 y 9 días ($p < 0.001$), 6 y 9

días ($p < 0.001$) y 9 y 20 días de tratamiento ($p < 0.001$), (Fig. 1).

Durante el tiempo de tratamiento considerado no se evidenciaron regresiones en ninguno de los tumores.

Discusión

El presente estudio demuestra que la Carragenina y la Indometacina inhiben el crecimiento del fibrosarcoma.

Se sabe que los inhibidores de las prostaglandinas, y en particular la Indometacina, inhiben el desarrollo tumoral²⁰. La Indometacina inhibe la síntesis de prostaglandinas, especialmente la PgE_2 que es un efector celular de muchas citoquinas en el proceso de la regulación inmune-inflamatoria²³. Los tumores sólidos producen altos niveles de prostaglandinas²⁴, las cuales regulan la síntesis de Interleuquina-1²³, que tiene un efecto supresor sobre la respuesta inmune-antitumoral²⁵.

Por otra parte, se ha demostrado que la Indometacina inhibe la angiogénesis tumoral la que está directamente relacionada con el crecimiento de los tumores sólidos. Las prostaglandinas producidas por las células tumorales o linfocitos y macrófagos asociados al tumor, inducen angiogénesis, por lo que son consideradas un importante componente de las reacciones neovasculares²⁶. La angiogénesis, a su vez, está directamente relacionada con el crecimiento de tumores sólidos²⁷, por lo que éstos, son angiogénico-dependientes para su crecimiento.

En nuestros estudios, el efecto de la Indometacina en la determinación del volumen del fibrosarcoma a los 3 días de tratamiento, no arrojó diferencias significativas respecto del volumen de los tumores del grupo tratado, lo que indica que la Indometacina ejerce un efecto inhibitorio tardío sobre el crecimiento tumoral, por lo que es probable que las prostaglandinas no tengan una acción directa e inmediata sobre el desarrollo tumoral, sino por medio de otros efectores.

Así mismo, demostramos que la Carragenina tiene un efecto inhibitorio sobre el desarrollo del fibrosarcoma. Siendo la Carragenina un antagonista de factores de crecimiento *in vitro*¹, es probable que lo sea también *in vivo*; esta sería la razón por la cual la Carragenina ejercería un efecto inhibitorio sobre el crecimiento tumoral. La Carragenina, por otra parte, es una sustancia inflamatoria⁷ y la inflamación producida por la misma puede acentuar la acción antitumoral por incremento de la síntesis de factor de necrosis tumoral, gamma interferón y otras sustancias. Esto es probable, ya que si bien los tratamientos combinados con Carragenina-Indometacina frenan el desarrollo del fibrosarcoma, el crecimiento es levemente mayor que en los tratados con Carragenina sola, que conlleva un proceso inflamatorio. Razonablemente pensamos que en los tratamientos combinados, la acción antitumoral debería potenciarse. Sin

embargo, demostramos que la asociación Carragenina-Indometacina no intensifica la inhibición del crecimiento del fibrosarcoma, con respecto al tratamiento con Carragenina sola.

Por ser la Carragenina un polisacárido polisulfatado es posible que comparta la propiedad antiangiogénica que tienen otros polisacáridos polisulfatados como el Suramin⁶ y acentuar de este modo su actividad antitumoral.

En los tratamientos combinados el volumen de los tumores a los 3 y 6 días fue mayor que en los tratados con Carragenina sola, lo que acentúa la posibilidad de que la inflamación producida por la Carragenina intensifique su acción antitumoral.

Si comparamos el efecto del tratamiento con Indometacina con el tratamiento combinado con Indometacina-Carragenina, vemos que se produce una sumatoria leve de la actividad antitumoral de ambas sustancias; pero es menor que el efecto antitumoral de la Carragenina sola por lo que demostramos que prevalece la acción antitumoral de la Carragenina sobre la Indometacina y sobre la combinación Indometacina-Carragenina. La actividad antitumoral de la Carragenina e Indometacina se potencia con respecto al tratamiento con Indometacina, pero no con respecto al tratamiento con Carragenina.

Por otra parte ni la Carragenina ni la Indometacina provocan regresiones de los tumores, siendo el crecimiento tumoral continuo en el lapso de los 20 días de tratamiento, lo que implica que estas sustancias ejercen un efecto antitumoral moderado.

Los resultados obtenidos parecen indicar que la Indometacina y la Carragenina son dos sustancias que potencialmente podrían ser usadas como adyuvantes en el tratamiento de tumores sólidos y sus metástasis.

Agradecimientos: Agradecemos a Sergio Gómez por su colaboración en técnicas histológicas, al Dr. Sebastián Seeligman y a la Dra. Mirta Santana por sus aportes en análisis estadístico.

Bibliografía

- Hoffman R. Carrageenan inhibits growth factor binding. *Biochem J* 1993; 289: 331-4.
- Gospodarowicz D, Cheng S. Heparin protects basic and acid FGF from inactivation. *J Cell Physiol* 1986; 128: 475-84.
- Rosengart TK, Johnson WV, Friesel R, Clark R, Masiag T. Heparin protects heparin-binding growth factor-1 from proteolytic inactivation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 152: 432-40.
- Barzut T, Lorneau JC, Petitou M, Michelson S, Choay S. Heparin-derived oligosaccharides affinity for acid fibroblast growth factor and effects on its growth promoting activity for human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1989; 140: 538-48.
- Tardieu M, Gamby C, Auramoglou T, Jozefonvicz J, Barritault D. Derivatized dextrans mimic heparin as stabilizers, potentiators and protectors of acid or basic FGF. *J Cell Physiol* 1992; 150: 194-203.
- Coffey RJ, Leof EB, Shipley GD, Harold LM. Suramin inhibition of growth factor receptor binding and mitogenicity in AKR-2 B cells. *J Physiol* 1987; 132: 143-8.
- Hambleton P, Miller P. Studies on carrageenan air pouch inflammation in the rat. *Br J Exp Path* 1989; 70: 425-33.
- Sato H, Hashimoto M, Sugio K, Ohuchi K, Tsurufuji S. Comparative study between steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs on the mode of their action on vascular permeability in rat carrageenan air pouch inflammation. *J Pharmacobiodyn* 1980; 3: 345-52.
- Sedgwick AD, Lees P. A comparison of air pouch sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. *Agents Actions* 1986; 18: 439-46.
- Coombe DR, Parish CR, Ramshaw IA, Snowden JM. Analysis of the inhibition of tumor metastasis by sulfated polysaccharides. *Int J Cancer* 1987; 39: 82-8.
- Chistofori G. The role of fibroblast growth factors in tumor progression and angiogenesis. In: R. Bicknell et al (eds). *Tumor Angiogenesis*. Oxford: Oxford University Press 1996.
- Fischer SM. Arachidonic acid metabolism and tumor promotion. In: S.M. Fischer, T.J. Slage (eds). *Arachidonic Acid Metabolism and Tumor Promotion*. Boston Nijhoff, Martinus 1985; p 169.
- Vane J. Prostaglandin as mediators of inflammation. *Arch. Prostaglandin Tromboxane Res* 1986; 2: 791-6.
- Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic Factors. *Science* 1987; 235: 442-7.
- Form D, Auerback R. PGE2 and angiogenesis. *Proc Soc Exp Biol* 1987; 172: 214-8.
- Tsuru Fuji, Sato H, Min KR, Ohuchi K. Difference in the anti-inflammatory effect of indomethacin between acute and chronic stages of carrageenan-induced inflammation. *J Pharm* 1978; 1: 814-7.
- Ziche M, Jones S, Gullino P. Role of prostaglandin E and cooper in angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69: 475-9.
- Davel EL, Minguez MM, Lustig SE. Evidence that indomethacin inhibits lymphocyte induced angiogenesis. *Transplantation* 1984; 39, 5: 564-5.
- Polverini P, Cotran R, Gimbrone MA, Unanue ER. Activated macrophages induced vascular proliferation. *Nature* 1977; 269: 804-5.
- Klein WA, Miller HH, Anderson M, De Cosse JJ. The use of indomethacin, sulindac and tamoxifen for treatment of desmoid tumors associated with familial polyposis. *Cancer* 1987; 60: 2863-9.
- Ikeda T, Tozuda S, Hasumura Y, Takeuchi J. Prostaglandin E producing hepatocellular carcinoma with hypercalcemia. *Cancer* 1988; 61: 1813-6.
- Lynch UR, Castes M, Astoin M, Salomón JC. Mechanism of inhibition of tumor growth by aspirin and indomethacin. *Br J Cancer* 1978; 38: 503-12.
- Kun Kel SL, Chensue SW, Phan SH. Prostaglandin as endogenous mediator of interleukin-1 production; *J Immunol* 1986; 13: 186-9.
- Lau SS, McMahon SB, MacMenamin MG, Schuller HM, Boyd MR. Metabolism of arachidonic acid in human lung cancer cell line. *Cancer Res* 1987; 47: 3757-3760.
- Parhar RS, Peeyush KL. Prostaglandin E2-mediated inactivation of various, killer lineage cells by tumor-bearing host macrophages. *J Leukocyte Biol* 1988; 44: 474-7.
- Peterson HI. Effects of prostaglandin synthesis inhibitors on tumor growth and vascularization. *Invasion Metastasis* 1983; 3: 151-9.
- Folkman J. Fighting cancer by attacking its blood supply. *Scientific American* 1996; 117-9.