

Ruta 6 induce selectivamente la muerte celular en células de cáncer en el cerebro, excepto la proliferación de linfocitos de sangre periférica normales: nuevo tratamiento para el cáncer de cerebro humano

SEN PATHAK, ASHA S. MULTANI, PRATIP BANERJI and PRASANTA BANERJI

Departamentos de Biología del cáncer y Medicina de Laboratorio. La Universidad de Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX 77030, EE.UU.; Fundación de investigación, 10/3/1 Elgin Road, Kolkata 700020, West Bengal, India.

Resumen.

Aunque las quimioterapias convencionales se utilizan para el tratamiento de pacientes con tumores malignos, los daños a las células normales es un problema. La sangre formada en las células de la médula ósea las afecta desfavorablemente. Por lo tanto, es necesario encontrar agentes alternativos que puedan destruir las células cancerosas pero que tengan efectos mínimos sobre las células normales. Se investigó en células muertas cancerosas del cerebro la actividad de una medicina homeopática, Ruta, aislada de la planta, Ruta Graveolens. Hemos tratado células cancerosas de cerebro humano y células HL - 60 con leucemia, células normales B linfoides, y células de melanoma in vitro, con diferentes concentraciones de Ruta en combinación con fosfato de calcio, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

15 pacientes diagnosticados con tumores intracraneales fueron tratados con Ruta 6 y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. De estos 15 pacientes, 6 de los 7 pacientes con glioma mostraron regresión completa de los tumores. Linfocitos normales en la sangre humana, las células B linfoides, y células cancerosas del cerebro tratadas con Ruta in vitro, fueron examinadas por dinámica de los telómeros, catástrofe mitótica y apoptosis hasta entender el posible mecanismo de la muerte celular, utilizando la técnica convencional y molecular de citogenética. Tanto in vivo como in vitro los resultados mostraron la inducción de señales de supervivencia en linfocitos normales y la inducción de señales de muerte en las células del cerebro. La muerte de las células cancerosas fue iniciada por la erosión de los telómeros

y finalizando con eventos de catástrofe mitótica. Nosotros proponemos que la Ruta en combinación con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ podría ser utilizada para el tratamiento eficaz de los casos de cáncer del cerebro, en particular de glioma.

Introducción

Las numerosas modalidades de los tratamientos contra el cáncer, incluida la cirugía, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, y la terapia génica, están todas dirigidas a eliminar las células tumorales o la prevención de la

proliferación celular. Aunque las quimioterapias convencionales tradicionalmente se han utilizado para tratar a pacientes con diversos tipos de cáncer, sus efectos secundarios y daños a las células normales han sido de gran preocupación.

La sangre formada en las células de la médula ósea son las primeras células que se ven afectados por quimioterapia, dando lugar a un descenso en el número de células sanguíneas periféricas.

Por lo tanto, es muy conveniente buscar otros agentes químicos que pueden destruir eficazmente las células con cáncer teniendo un mínimo o ningún efecto secundario sobre las células normales.

Extractos de la planta perenne Ruta Graveolens Linn (Familia Rutaceae) se han utilizado en la homeopatía tradicional (1). Los constituyentes de la planta incluyen aceites volátiles, cumarina, glucósido amarillo, alcaloides, y rutina. La rutina ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), el principal compuesto activo (Fig. 1), y su glicona, los primeros en ser aislados, de las hojas de R. Graveolens, son bien conocidas como protectores contra exposiciones nucleares y hemorragias capilares. (2,3). Rutina se utiliza comúnmente en el tratamiento de las lesiones óseas, infección bacteriana, mala visión, gota, reumatismo, e histeria. Un extracto de R. Graveolens también ha mostrado actividad mutagénica cuando se probó en la Salmonella (4). En la medicina antigua de Grecia y Roma, también se emplea como un abortivo

(5). Los estudios de laboratorio en ratones albinos adultos han demostrado que la Ruta proporciona protección contra los efectos clastogénicos inducidos por radiación X (6). Ruta 6 (concentración 10^{-12}), la cual es una potencia diluida de la tintura madre (Ruta Q), un medicamento homeopático del extracto vegetal (ver Materiales y métodos), también ha sido efectiva en el tratamiento de la cisticercosis (7).

Además, Ruta 6, en combinación con fosfato de calcio [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] 3×10^{-3} concentración), ha demostrado potente

actividad antitumoral en pacientes con cáncer en el cerebro (datos actuales). Aunque los mecanismos moleculares y/o las metas por las que la Ruta 6 produce sus efectos biológicos siguen siendo desconocidos, es evidente que destruye a las células del cáncer, en particular células con cáncer del cerebro humano, protege a las células B linfoides de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) - inducida por el daño, y muestra efectos mitogénicos en linfocitos normales de sangre periférica (PBLs) en cultivo (datos actuales).

Telómeros, los cuales se repiten en las secuencias de ADN (T2AG3)n presentes en ambos extremos de los cromosomas, actúan como 'guardianes' del genoma (8). Los telómeros sirven también como factores supervivencia en tumores humanos sólidos de varios orígenes histopatológicos por amplificación del ADN telomérico (9). Por otra parte el desgaste de los telómeros inducida por medicinas quimioterapéuticas y diferentes productos vegetales y animales o también presentes en melanomas de cerdo ha mostrado la causa de catástrofe mitótica y la inducción de apoptosis. (JAIME)

Dos de nosotros (Pratip Banerji y Prasanta Banerji) hemos usado la terapia de Ruta 6 combinada con $Ca_3(PO_4)_2$ para tratar a 15 pacientes con cáncer intracraneal avanzado en la Fundación de Investigación PHB (Kolkata, India). Los otros dos autores desarrollaron experimentos in vitro para estudiar los efectos de la ruta 6 y $Ca_3(PO_4)_2$ en células cancerígenas y linfocitos de sangre periférica de humanos normales en la Universidad de Texas, Centro de Cáncer Anderson.

El propósito de nuestros estudios in vivo e in vitro es:

- a. Demostrar que la Ruta 6 + $Ca_3(PO_4)_2$ como terapia combinada puede eliminar células de cáncer intracraneal, induciendo la muerte celular o previniendo su futura proliferación.
- b. Explorar el mecanismo molecular de la muerte celular por el tratamiento de la ruta 6 + $Ca_3(PO_4)_2$ para el cáncer de cerebro, in vitro.
- c. Demostrar los efectos protectores, si los hay, en cultivos de linfocitos en sangre periférica de humanos normales.

Nuestros resultados in vivo muestran la eliminación exitosa de las células cancerosas en cerebro de aquellos pacientes que recibieron la

terapia combinada de Ruta 6 + $Ca_3(PO_4)_2$ para enfermedades avanzadas. La inducción de muerte de las células cancerígenas in vitro fue a través de la erosión telomérica. La protección de linfocitos normales en cultivos celulares se debió a la inducción de actividad mitogénica.

Materiales y Métodos

Preparación de Ruta. El extracto alcohólico de la planta Ruta graveolans, Ruta 6 (Concentración 10^{-6}), se preparó a partir de tintura madre Ruta Q como se describe anteriormente, y la Calcarea phosphorica (Fosfato de Calcio) 3x (Concentración 10^{-3}) que fue prescrita para pacientes con cáncer cerebral para consumo oral y empleada en todos los experimentos in vitro, esta fue obtenida de Mumbai, India (Holistic Remedies Pvt. Ltd) en colaboración con Bioforce A.G. Suiza.

Ruta Q, la tintura madre extraída de R. graveolans de acuerdo a la farmacopea homeopática, fue diluida a Ruta 1 adicionando 1 mL de Ruta Q a 99 mL de Etanol absoluto. Un mililitro de Ruta 1 se adiciono a 99 mL de alcohol para preparar Ruta 2. De manera similar, Ruta 6 fue preparada desarrollando más diluciones seriadas.

Para tratar las diferentes líneas celulares, se prepararon dosis de Ruta de la siguiente manera:

- a. Ruta 6: 70 mL de Ruta 6 fueron evaporados a 100 μ L en una caja de petri en una incubadora a 37°C. Posteriormente fueron adicionados 10 mL de medio RPMI y se incubó nuevamente a 37°C para evaporar el alcohol remanente.
Dosis baja, 2 mL del medio descrito arriba conteniendo Ruta 6 + 35 mg de $Ca_3(PO_4)_2$ fueron usados para tratar células en 10 mL de medio.
Dosis alta, 3 mL del medio descrito arriba conteniendo Ruta 6 + 35 mg de $Ca_3(PO_4)_2$ fueron usados para tratar células en 10 mL de medio.
- b. Ruta 1: 20 mL de Ruta 1 fueron evaporados a aproximadamente 100 μ L, y 2 mL de medio RPMI fueron adicionados posteriormente, luego la placa se incubó para eliminar el alcohol remanente.
De este medio, 1 mL que contiene Ruta 1 + 35 mg de $Ca_3(PO_4)_2$ fueron usados para tratar células en 10 mL de medio.

c. Ruta Q: 2 mL de Ruta Q fueron evaporados según lo descrito y 2 mL de medio RPMI fueron adicionados posteriormente. De este medio, 1 mL que contiene Ruta Q + 35 mg de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ fueron usados para tratar células en 10 mL de medio.

La dosificación de Ruta 6 prescrita para nuestros pacientes fue de dos gotas (100 μL aproximadamente) en una cucharita (5 mL aproximadamente) en agua para beber tomada dos veces al día. La dosis normal de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ fue 5 granos (~ 0.324 g) tomados oralmente dos veces al día.

Características clínicas de pacientes con cáncer cerebral intracraneal. Los 15 pacientes (9 hombres, 6 mujeres) con cáncer cerebral que fueron tratados con Ruta 6 + $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en la fundación de Investigación PHB, fueron diagnosticados con Glioma (9 pacientes), meningioma (3 pacientes), Craneoparingioma (1 paciente), neurinoma (1 paciente) y tumores pituitarios (1 paciente). Los diagnósticos se basaron en radiología y/o histopatología. La mayoría de estos casos estaban en fases avanzadas de la enfermedad cuando el tratamiento homeopático empezó en Kolkata, India. Los pacientes mejoraron gradualmente, como indican las tomografías seriadas y las exámenes clínicos. Las principales quejas antes del tratamiento eran dolor de cabeza, problemas con la visión, parálisis, ataques convulsivos, vomito, temblor en las extremidades, pérdida de memoria, entumecimiento, insomnio y pérdida del sentido del gusto. La edad promedio estuvo entre 10 y 65 años, y el tiempo requerido para una condición estable sin síntomas estuvo entre 3 meses y 7 años.

Líneas celulares empleadas. La línea celular maligna de glioma humano MGR1 (Amablemente donado por Dr. F. Ali-Osman), la línea celular leucémica promielomonocítica HL-60, el clone X-21 de melanoma metastático Murino K1735 (Amablemente donado por Dr. I.J. Fidler), dos líneas celulares humanas de linfocitos B normales (2164P y 3590P) y dos muestras de sangre periférica normal (Proveniente de un hombre y una mujer sanos) fueron empleados en este estudio. Aproximadamente $3\text{-}5 \times 10^{-6}$ células de cada una de estas líneas fueron sembradas en frascos plásticos de cultivo T-75 en 10 mL de medio RPMI-1640 enriquecido con

10% de suero fetal bovino (Gibco BRL, NY) e incubado a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5% y 95% de aire. Toda la sangre (1 mL) fue cultivada en 9 mL de RPMI-1640 con o sin fitohemaglutinina (PHA) y Ruta 6 + $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ por 72 horas a 37°C .
(CAROLINA)

En el tratamiento de B-linfoides normal y cáncer del cerebro MGR1 células con Ruta y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). para examinar si la Ruta indujo la citotoxicidad sinérgica en MGR1, el cáncer del cerebro y protección de células normales expuestas a H_2O_2 , se trataron células de ambas líneas con las varias dosis de Ruta solo con (Ruta 6-baja y alta dosis, Ruta 1, y Ruta Q), H_2O_2 solo con (0.2 iM), o una combinación de Ruta y H_2O_2 por 24 h. Peróxido de hidrógeno, diluido con el agua destilada estéril, se usó como un potente clastógeno para tratar cáncer del cerebro y las células B-linfoides en humano normal. Los cultivos de control no recibieron ninguna droga o H_2O_2 . Los cultivos se cosechan como se describe más adelante.

Pre tratamiento de linfocitos de sangre periférica (PBLs) con Ruta.

Para examinar si la Ruta actúa como un mitógeno y un no-clastógeno en las células normales, PBL cultivos de dos donantes saludables normales fueron colocados en RPMI-1640 complementado con 10% de suero bovino fetal. En el primer cultivo el tubo recibió la concentración usual de PHA (~ 1 ml del mg/10). El segundo tubo no recibió ningún PHA. El tercero, cuarto y quinto de los tubos recibieron dosis de Ruta 6-bajo, Ruta 6-alto y Ruta Q. El sexto tubo recibió PHA más Ruta 6-alta dosis, todos agregados en el momento de iniciación del cultivo. Todos los cultivos se incubaron a 37°C , y las células fueron cosechadas después de 72 h siguiendo las técnicas de secado al aire normales.

Recolección de células y preparativos citológicos.

Toda la droga tratada y el control MGR1 cultivos celulares, B-linfoide y los cultivos PBL se trataron con colcemid (0.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para 45 min a las 37°C y entonces se procesó para cromosomático las preparaciones (14). Todas las diapositivas aire-secadas fueron codificadas y entonces manchadas en Giemsa para la evaluación de índice del mitótico; la frecuencia normal, tetraploide y células del endore duplicado; y para cualquier otra catástrofe del mitótico obvia, incluyendo el

cromosoma - y anomalías del tipo cromatídico.

Fluorescencia cuantitativa en la hibridación in situ (el Q-FISH).

Las diapositivas codificadas se procesaron por el Q-FISH analizadas usando el Cy 3 Péptido de ácido nucleico etiquetado (PNA) la sonda del telómero obtenido de la Corporación Dako (Carpintería, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. Las diapositivas que usaron se examinaron en un foto microscopio de Nikon equipado con un chargedcoupled refreshado el dispositivo (CCD) en la cámara. El telomérico señala en la interfase de los núcleos (100-200 de cada muestra) que se cuantificó usando un metavisor de imagen del Sistema software versión 3.6a (Universal imaging, Westchester, PA). El porcentaje telomérico área con respecto al área nuclear era moderada en los píxeles para la media y las cantidades del medio de DNA telomérico presente en cada muestra.

Determinación de la población sub diploide por el análisis FACS.

El control y droga-tratada B-linfoide normal y MGR1 células de cáncer se lavaron con el tampón de fosfato frío salino (PBS). Aproximadamente 1×10^6 a la 6×10^6 células de cada uno de los experimentos fueron resuspendidos en 0.5 ml de propidio el yoduro (la PI) la solución (50 PI del $\mu\text{g/ml}$, 0.1% Tritón X-100, y 0.1 citrato de sodio en PBS). Estas células se incubaron en la PI la solución a 4°C en la oscuridad para 24 h y entonces la fluorescencia fue leída en las Épicas de Coulter (R) XL y el contador celular (Beckman Coulter, Brea, CA). El porcentaje de células con el hypodiploid DNA contenido fue calculado con el programa multi-gráfico.

Los resultados

El resultado de pacientes con cáncer de cerebro tratado con Ruta 6 + $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. La terapia de combinación de Ruta 6 y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ fue muy eficaz en el tratamiento de cáncer de cerebro intracraneal. De los 9 pacientes con el glioma, 8 (88.9%) presentaron regresión completa, y el otro paciente mostró regresión parcial. Dos de los tres pacientes con el meningioma presentaron detención prolongada de sus tumores y el tercero tuvo completa la regresión. El primer paciente con craniopharyngioma y el primer paciente con los tumores pituitarios ambos presentaron regresión completa, y el primer paciente con el neurinoma había tenido detención prolongada de su tumor como se determino por escaneo de imágenes

tomograficas computarizadas (datos no mostrados).

En nuestros experimentos in vitro, nosotros estudiamos si la Ruta 6 + $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ podría inducir la muerte celular en el humano (HL-60 y el glioma de MGR1) y murine (K 1735 copia X-21) células de cáncer y proporcionar quimio-protección para PBLs en humano normal y las células de B-linfoide, por inducción mitótica catástrofe y corrosión de DNA telomérico selectivamente en las células de cáncer y por la proliferación celular induciendo en las células normales. Aunque éstas células de cáncer mostraron grados diferentes de sensibilidad al tratamiento con Ruta in vitro, el volumen de los datos presentado aquí será sobre el humano MGR1 células glioma. De las dos células B-linfoide humanas las líneas establecidas de dos individuales normales (uno masculino, una femenina) y usada en el experimento de tratamiento con Ruta, datos en sólo una línea celular serán presentados. Los cultivos PBL de los dos voluntarios saludables normales (uno masculino, una femenina) mostraron inducción de mitosis con la morfología del cromosoma normal cuando PHA se reemplazó por Ruta en medio cultivo de su sangre.

Ruta 6 + $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ induce la catástrofe mitótica en células con cáncer.

El cáncer en células glioma MGR1 humano, fueron tratadas con concentraciones diferentes de Ruta + $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Ruta 6, 1, y Q) para 24 h a las 37°C , y se estudiaron las preparaciones citológicas para catástrofes mitóticas. Nosotros evaluamos varias catástrofes mitóticas, incluso la frecuencia de meta fases con aberraciones (cromatida - y tipos de cromosoma, fragmentos, la pulverización y asociaciones del telomérico), índice mitótico(MI), endore duplicación y tetraploide. Fig. 2 contiene el meta fase los cobertores de control y Ruta 6-tratando las células de cáncer de cerebro. Esto mostró morfología del cromosoma normal (Fig. 2A), seleccionados los cromosomas del endore duplicado con asociaciones del telomérico (TAs), cromatida - y aberraciones del cromosoma-tipo (Fig. 2B), y una meta fase del endore duplicado con severo fragmentación del cromosoma(Fig. 2C). Meta fases con las configuraciones mostradas en Fig. 2B y C no fueron observadas en el control MGR1 celular. En 24 células h-tratadas (Ruta 6-alto), 64.3% de las meta fases fueron anormales comparado con sólo 8% en el control celular (Tabla 1). había un aumento dosis-dependiente en el número de meta fases con aberraciones del cromosoma. Un resultado similar se obtuvo con el K 1735 copia X-21 células de

melanoma murine en la cual el control de células fue mostrado TA en 2.4% de meta fases. Sin embargo, 24.4% de las meta fases en las células tratadas mostradas con la morfología del dicentrico y fragmentos del acentrico. La mayoría de estas anomalías estaba presente en endore duplicado o células tetraploide, pero ellas fueron raramente presente en un cobertor de la meta fase con una línea del tallo del número del cromosoma (como se mostro para MGR1 en Fig. 2A).

Ruta en combinación con H2O2

Induce los efectos sinérgicos sobre MGR1 células de cáncer glioma. Las células de cáncer glioma humano MGR1 fueron plateadas (~2 millón por el frasco) en cuatro cultivos T-75.

(JOHAN)

PAGINA 978 Pathak et al: Ruda 6, un nuevo tratamiento para el cáncer de cerebro humano.

FIGURA 2: Metafase del control y tratamiento de Ruda 6 en células humanas con cáncer de cerebro mostrando la catástrofe mitótica: A, propagación metafase normal de un cultivo control. B, propagación de metafase parcial endoreduplicada mostrando configuraciones di céntricas, cromatidas rotas y tri radiales. C, metafase endoreduplicada con fragmentaciones extensas de cromosomas de cultivos tratados con RUDA.

TABLA 1: Frecuencia de metafases normales y anormales en células cancerigenas del cerebro humano MGR1 tratadas con Ruda+fosfato tricalcico por 24 horas.

FIGURA 3: Histogramas mostrado porcentajes de índice mitótico (MI) y metafase normal y anormal del cáncer del cerebro humano y células b-linfoides tratadas por 24 horas con dosis de Ruda 6-high únicamente, Peroxido de hidrógeno únicamente y combinación ruda-peroxido: A, Células cancerigenas en cerebro humano MGR1 mostrando porcentajes mas altos de metafase anormal en células tratadas con peroxido y ruda 6; B, células humanas normales b-linfoides mostrando metafase algo mas normal en cultivos de ruda y protección por Ruda 6 contra peroxido.

De estos, El control matraz no recibió ningún tratamiento. El segundo matraz fue tratado con Ruda 6-high. El tercer matraz fue tratado solo

con peroxido de hidrogeno (0,2 micro molar). El cuarto matraz fue tratado con combinación de Ruda 6-high y peroxido de hidrogeno (0,2 micro molar). Todos los tratamientos en este conjunto de experimentos fueron desarrollados por 24 horas.

El tratamiento siguiente, el M1 y porcentaje de metafase con morfología de cromosoma normal y anormal fue marcado debajo de un lente objetivo en aceite de inmersión. Peroxido de hidrogeno inducido en tipos aberraciones de cromatidas y cromosomas limpios en las células de cáncer en el cerebro (datos no mostrados). El porcentaje de metafases con propagaciones normales y anormales son mostrados en la figura 3A. En las células tratadas con combinación de ruda-peroxido, el 100 % de las propagaciones de metafase mostró anomalías estructurales. En más de 100 metafases examinadas desde 3 a 4 diapositivas, no mostró una sola propagación normal de la morfología de los cromosomas.

Células tratadas únicamente con peroxido de hidrogeno mostraron más aberraciones cromosómicas que no metafases de las células tratadas con ruda únicamente (figura 3A). Células tratadas con combinación de ruda-peroxido mostraron un aumento significativo de la proporción de metafases con aberraciones que para cualquier otro tratamiento. La mayoría de esas aberraciones fueron rupturas tipo cromatidas y Tas debido a la pérdida de DNA telomérico.

Índices mitóticos en células fueron más altos en el control y más bajos en el tratamiento combinado. A partir de estos resultados experimentales, parece que la ruda 6 no provee ninguna protección con peroxido frente a daños en el glioma de células cancerigenas MGR1. Por el contrario, tiene efectos perjudiciales sobre la sinérgica de las células cancerigenas MGR1.

(ALEX)

Tabla II. Frecuencia de metafases con aberraciones en una línea celular B-linfoide tratada en un medio con o sin Ruta+Ca₃(PO₄)₂ y H₂O₂ por 24 horas.

No. Experimento	Dosis	%normal de metafases		%Metafases con aberraciones
		1S	2S	
SP4338	Control	92.0	8.0	0.0
SP4341	Ruda 6 (dosis altas)	91.4	3.8	4.8
SP4345	0.2 μM H ₂ O ₂	46.0	6.0	48.0
SP4342	Ruda 6+0.2	79.0	2.0	9.0

	μM H_2O_2 (dosis altas)			
SP4343	Ruta 1	91.2	4.9	3.9
SP4344	Ruta 1 0.2 μM H_2O_2	87.4	3.9	8.7

Tabla III. Inducción de mitosis en dos muestras de sangre periféricas incubadas en un medio cpn ó sin Ruta (Ruta 6 + $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) y PHA por 72 horas.

Tratamientos	Mitosis	Anormalidad cromosómica
RPMI-1640+PHA	+	-
RPMI-1640 solamente	-	-
RPMI-1640+Ruta 6 (altas dosis)	+	-
RPMI-1640+PHA+Ruta 6 (altas dosis)	+	-

+, Metafases presentes; -, ausencias de anomalías cromosómicas y de metafases.

Ruta protege los linfocitos B humanos de el H_2O_2 el cual induce daño cromosómico. 8 frascos para cultivo fueron procesados (aprox. 5 millones células/frasco) usando una línea celular de linfocitos B obtenidos a partir de una persona sana. Tres de estos cultivos fueron expuestos solamente a Ruta (Ruta 6-baja, Ruta 6-alta y Ruta 1 respectivamente), el cuarto fue expuesto a H_2O_2 0.2 μM solamente, el quinto, sexto y séptimo a una combinación de Ruta (Ruta 6-baja, Ruta 6-alta, Ruta 1 R respectivamente) y H_2O_2 ; el octavo frasco fue usado como control. Así como con con los experimentos llevados a cabo con el glioma MGR1, los linfocitos B fueron igualmente tratados para evaluar MI (índice de mitosis) y el % de metafases normales y anormales en cada set de experimentos. Como se muestra en la figura 3B, el valor de MI fue elevado en células tratadas solamente con Ruta comparadas con el valor obtenido para el control. El valor de la catástrofe mitótica, como sea, fue también similar entre el control y los linfocitos B tratados solamente con Ruta. De todas maneras no hubieron metafases con aberraciones cromosómicas en las células tratadas solamente con Ruta. Los linfocitos B tratados con Ruta 6 + H_2O_2 y las células que recibieron solamente H_2O_2 mostraron una diferencia significativa en la frecuencia de metafases con aberraciones. Una reducción mayor al 50% de metafases con aberraciones en las células que recibieron el tratamiento combinado indican que hubo protección contra

el H_2O_2 (Tabla II). Estos resultados indican que en vez de inducir aberraciones en los linfocitos B, la Ruta estimula la mitosis y además protege las células del daño inducido por el H_2O_2 .

Ruta induce actividad mitogénica en linfocitos normales. Así como se muestra en la Tabla No. III, el PHA solo y la combinación del mismo con Ruta 6 estimulan la división celular en ambas muestras de linfocitos normales, las cuales mostraron expansión mitótica como se esperaba. Los cultivos que no recibieron ni PHA ni Ruta 6 no mostraron ninguna expansión mitótica. De todas maneras, los cultivos de células expuestos solamente a Ruta 6 mostraron metafases en ambas muestras de sangre periférica, así como reducción en la frecuencia comparados con aquellos cultivos estimulados con PHA. Todas las metafases estimuladas en los cultivos tratados solamente con Ruta 6 de ambos donantes mostraron una morfología cromosómica normal (los datos no son mostrados). El MI de los linfocitos expuestos a una combinación de Ruta 6 + PHA no fue significativamente diferente de aquellos que fueron tratados solamente con PHA. De estas observaciones concluimos que la Ruta 6 actúa como un mitógeno para linfocitos humanos normales, además de no inducir aberraciones en sus cromosomas.

Efectos de la Ruta en las dinámicas teloméricas en MGR1 glioma cancer y linfocitos B normales. El glioma humano MGR1 y los linfocitos B normales expuestos solamente a Ruta 6 por 24 horas mostraron valores significativamente diferentes cuando se llevó a cabo la cuantificación de DNA telomérico por la técnica Q-FISH. Como se muestra en la Figura 4, no hubo reducción en los signos teloméricos en el núcleo en interfase del control (Figura 4 A) así como en los linfocitos B tratados con Ruta 6 (Figura 4B). Como sea, hubo una significativa diferencia en la cantidad de DNA telomérico en el núcleo en interfase del control sin tratar (Figura 4C) y las células cancerígenas de cerebro humano tratadas con Ruta 6 (Figura 4D). Las células cancerígenas del cerebro tratadas con Ruta 6 mostraron una reducción drástica del DNA telomérico en comparación con el control sin tratamiento. De los resultados Q-FISH, se encontró que el tratamiento con Ruta 6 es detrimento con las células cancerígenas del cerebro pero no con los linfocitos B normales humanos. La diferencia de pérdida de DNA telomérico en las células cancerígenas del cerebro y los linfocitos B pueden explicar por qué se evidencian más metafases con una catástrofe mitótica en las

células cancerígenas, factor que no se observa en los linfocitos B, presentándose una insignificante anormalidad mitótica.

Determinación de presencia subdiploide por medio de análisis FACS. Para determinar la inducción de apoptosis en células cancerígenas del cerebro por acción de la Ruta, así como la protección ejercida en los linfocitos B de la apoptosis, nosotros llevamos a cabo una exposición a altas dosis de Ruta 6 para las células cancerígenas MGR1, así como para los linfocitos B, utilizando cultivos a los cuales se les adicionó Ruta 6 cada día por 72 horas, además se usaron células control sin tratamiento para citometría por flujo. La figura 5 muestra los histogramas representativos obtenidos después de 72 horas de tratamiento continuo. Las células cancerígenas del cerebro MGR1 tratadas por 24 y 48 horas mostraron dependencia en la duración de la captación de G1 (datos no mostrados). Ruta 6 induce niveles reproducibles y significativos de muerte de células cerebrales cancerígenas, como se refleja por un contenido de 40.8% de DNA G1 comparado con un 13.4% del control. En contraste, los valores para el subdiploide DNA G1 para los linfocitos B difieren poco entre las células tratadas con Ruta 6 y las células control, con valores de 4.11% y 3.05% respectivamente. Los datos de análisis FACS se relacionan bien con los resultados obtenidos con la frecuencia catastrófica mitótica. Estos resultados implican que Ruta 6 induce rutas de eliminación y muerte en células cancerígenas del cerebro-glioma, in vivo e in Vitro, además de signos de supervivencia en los linfocitos B y T normales.

(PAOLA)

Discusión

En el presente estudio, hemos encontrado que una combinación de la Ruta 6 y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, tomada por vía oral, puede bloquear la progresión o revertir totalmente el crecimiento de las células cáncergenicas en el glioma cerebral humano, con mínimos o ningún efecto secundario. Los pacientes diagnosticados con el glioma, cuando se trataron con la Ruta 6, mostraron mejores resultados en comparación con pacientes con otros tipos de cánceres intracraneales. Aunque el número de pacientes en nuestro grupo era pequeño, Los resultados del tratamiento homeopático son altamente alentadores y novedosos. El cómo la Ruta, puede inhibir el crecimiento células cancerosas en el glioma cerebral humano o induce la

regresión completa no se conoce en este momento. Para dilucidar algo sobre este fenómeno, se realizó un número de experimentos in vitro utilizando células cancerosas humanas y de mureina, células linfocitos B humanos normales y PBLs (linfocitos de sangre periférica) normales en cultivo. Nuestros resultados indican lo siguiente: a) aunque ruta es citotóxica células cancerosas humanas y murinas es mas dañina para el células cancerosas del glioma cerebral humano que para de las que HL-60 células de leucemia (datos no presentados); B), la Ruta induce la división a las células en PBLs humano normal cuando se cultiva en complementada con RPMI - 1640 sin PHA; C) la Ruta no induce aberraciones cromosomales en linfocitos B normales y linfocitos T en cultivo estimulados por la presencia de PHA D) La Ruta no protege las células cancerosas del glioma cerebral humano de daño genético inducido Por H_2O_2 ; E) La Ruta protege a las c linfocitos B del daño estructural infligido por el H_2O_2 , medido por un reducido número de metafases con aberraciones cromosómicas f) La Ruta induce grave acortamiento y erosión de los telómeros MGR1 en las células del cáncer del cerebro, pero no tiene efecto sobre las células linfoides B y de los linfocitos normales, medidos por Q - FISH; G) La muerte preferencial de células cáncergenicas del glioma de cerebro dada por Ruta es al parecer mediado a través de la pérdida de telomérica DNA, seguida de la detención de las células en el la fase G2 / M, inducción de la endomitosis y fragmentación de DNA, que conduce a la muerte celular; H) Los análisis FACS indican que la Ruta induce La muerte celular en la dosis y duración dependientes en MGR1 de células cancerosas

de cerebro humano , seguida por la saturación de efectos. Sin embargo, la Ruta protege las células linfoides B y linfoides T PHA estimuladas, incluso actuando como un leve mitógeno en estos cultivos. La Rutina, es el ingrediente activo de la Ruta, es conocida por su actividad antioxidante y antiinflamatoria también por reducir daño oxidativo en un modelo de roedores (15,16). Además, Ruta También se conoce por proteger la ruptura de la cadena de DNA y Prevenir la mutagénesis (17,18). $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ se añadió en nuestros experimentos In vivo e in vitro, porque activa la fosfolipasa, que rompe el fosfalidilinositol bifosfato,

molécula anclada en la membrana que activa la proteína Kinasa C. Los productos de la ruptura provocada por la fosfolipasa desencadena un flujo de iones de calcio hacia el interior de la célula, que ayudan a transferir el factor nuclear citoplásmico de las células T activadas hacia el núcleo a través de la vía asociada a las enzimas calmodulina y calcineurina, que modula la inducción de el factor de necrosis tumoral, Un potente activador de la NF-KB, que en última instancia conduce a la apoptosis de células (19-21) y / o regresión espontánea o prolongada detención de las células tumorales (22). NF-KB es un factor de transcripción y desempeña un papel fundamental en el sistema inmunológico.

La otra posibilidad podría ser que la Ruta induce deamidación (eliminación de un grupo amida) de la proteína antiapoptótica Bcl-xL en células cancerosas del cerebro humano las pero no en los linfocitos T y B normales. Se sabe que La deamidación se ocurre en el dominio de Bcl-xL que hace que la inactivación de esta proteína. Esto puede resultar en que las células cancerosas son más sensibles a la muerte celular que las células normales (23).

La combinación de Ruta 6 y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ es capaz de general una protección de las lesiones cromosómicas de las células linfoides B normales, inducida por H_2O_2 mediante la reducción de la cuantía de los daños >50%. Sin embargo, el tratamiento de combinación en el MGR1 Las células cancerosas del glioma mostró efectos citotóxicos sinérgicos sin protección de las células cancerosas. Incluso en el MI de células linfocitos B expuestas a Ruta fue mayor (21,4%) en comparación con el control (10,4%), mostrando su efecto mitogénico sobre células normales. Además, el MI en células linfoides B sólo tratadas con H_2O_2 fue del 7,1% en comparación con 14,4% en las células tratadas con Ruta 6 + H_2O_2 . Estos resultados sugieren firmemente que el tratamiento con Ruta 6 + $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ es mitogénico y nonclastogenico en células normales. Pero en células cancerosas de glioma cerebral humano es antimitóticas y apoptóticas MGR1. Cómo las células cancerosas en el glioma cerebral pierden la vida o cómo están protegidas las células normales mostrando una mayor proliferación por Ruta 6 no es conocido. Los telómeros, que protegen los cromosomas y el genoma, se han reducido con el tratamiento con Ruta 6 en células cancerígenas, pero no en células de linfoides B normales (Fig. 4).

En los datos del análisis FACS las células tratadas con Ruta 6, mostraron la acumulación

de más células subdiploides en el MGR1 glioma de células cancerígenas (40,8%) que en células linfoides B (3%), lo que sugiere que las células de cancerígenas del cerebro en estas condiciones mueren mas .(Fig.5).

En una serie de las publicaciones, nosotros hemos demostrado que la erosión de los telómeros es primer evento que le ocurre a la cromatina que conduce a toda una maquinaria de la cascada apoptótica en espontáneamente la regresión espontáneamente del melanoma porcino y/o inducidas por el fármaco la muerte celular en las células cancerosas (8-13, 24,25). Independientemente de que aún es desconocido el mecanismo de acción de protección de las células linfoides B en condiciones normales, es claro por nuestras observaciones In vivo e in vitro que la Ruta tiene la novedosa propiedad de matar preferentemente las células cancerígenas de glioma cerebral humano y proteger a las células normales del cuerpo. En general, nuestros resultados muestran que las plantas derivadas de la Ruta 6 y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, cuando es tomada por vía oral, pueden inducir la regresión In vivo de cánceres cerebrales tipo glioma .Esto podría lograrse mediante la inducción de acortamiento y pérdida de los telómeros de las células cancerosas, como se indica en nuestros experimentos in vitro con células cancerosas derivada de glioma cerebral las .En contraste con las convencionales quimioterapias que mata no sólo células cancerosas sino también células normales, La combinación de Ruta 6 + $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ mata las células cancerosas del glioma cerebral selectivamente y protege a los linfocitos normales por la inducción de la división celular en las células que forman la sangre. Este medicamento homeopático puede ser formulado para el tratamiento óptimo de cánceres de cerebro en general, en particular los gliomas y posiblemente, reduciendo de efectos secundarios graves y generando la protección de las células que conforman la sangre en estos pacientes.