

## Efecto de la Quinacrina con agentes antiinflamatorios sobre el desarrollo del tumor TA3 en ratón AJ.

Alfredo Dabancens O.<sup>(1)</sup>, Aníbal Guerrero C.<sup>(2)</sup>, Jaime Zipper A.<sup>(3)</sup>

### Resumen

**Objetivo:** Analizar la eventual potenciación mutua del efecto antineoplásico que presentan la quinacrina, los glucocorticoides y los antiinflamatorios no esteroideos. (AINEs)

**Material y Método:** Se utilizaron trasplantes de tumor TA3 en ratones machos AJ. Se establecieron 29 grupos con diferentes combinaciones terapéuticas, y se hizo un análisis estadístico de la sobrevivencia y del diámetro tumoral promedio en cada grupo.

**Resultados:** La quinacrina combinada con betametasona y un agente AINE, permite obtener una alta tasa de regresión completa y definitiva de los tumores TA3

**Discusión:** La betametasona y los AINEs, en forma separada no modifican la curva de crecimiento de los tumores TA3. La administración simultánea de quinacrina con betametasona o con un AINE, y su administración triple demuestra poseer una potente acción antitumoral, con regresiones totales que llegan a 50 o 70 % de los tumores, variando en forma

inversamente proporcional al lapso de días previos al inicio del tratamiento. El mecanismo de acción puede relacionarse con la apoptosis de células endoteliales de los capilares intratumorales que se observa en los animales tratados.

**Palabras claves:** Tumorigénesis, Quinacrina, Betametasona, AINEs.

### Summary

**Objective:** To analyze the eventual potentiation between quinacrine, betametasone and Non Steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs)

**Material and Method:** Transplantable tumor TA3 were grown in AJ male mice. 29 experimental groups with different therapeutical combination were assayed. Statistical significance of results was determined over survival period and the average size of the tumors.

**Results:** Quinacrine in combination with betametasone plus a NSAIDs, gets high rate of regressions in the model studied.

**Discussion:** Independently each of these agents doesn't get modification in the growth curve of the tumors. Double or triple combinations succeed in 50 to 70% complete regressions of TA3 transplantable tumors. Mechanisms of action could be related to apoptosis of endothelial cells observed in capillaries on tumors.

**Key words:** Tumorigenesis, Quinacrine, Betametasone, and NSAIDs

### Introducción

Guerrero et al<sup>(1)</sup>, reportó la acción antineoplásica ejercida por la quinacrina sobre los tumores TA3 y TA3 MTXR de ratón. Posteriormente Dabancens et al<sup>(2)</sup>, demostró la potenciación que ejerce el cobre sobre la quinacrina sobre los mismos tumores. Por otra parte Mc Cormick<sup>(3)</sup> demostró que la quinacrina impidió el desarrollo de tumores mamarios inducidos por N-metil-N-N-nitrosourea a dosis bajas en ratón.

<sup>(1)</sup> Instituto de Anatomía Patológica. Hospital Clínico Universidad de Chile

<sup>(2)</sup> Instituto de Ciencias Biomédicas ICBM Prof. Dr. Eduardo Cruz Coke. Facultad de Medicina Universidad de Chile.

<sup>(3)</sup> Facultad de Medicina Universidad de Chile  
Financiado parcialmente con Proyecto Fondecyt# 1990852

Alade et al.<sup>(4)</sup>, reportó que la quinacrina ejerce un papel inhibitorio sobre la línea leucémica U937.

En 1968 García et al.<sup>(5)</sup> publicó un estudio sobre el efecto de glucocorticoides en el crecimiento del tumor trasplantable K7 del ratón y por otra parte Lynch et al.<sup>(6)</sup> fue el primero que describió una inhibición del crecimiento de tumores en ratón por efecto de indometacina. Posteriormente varios autores han reportado el efecto antitumoral de diversos agentes antiinflamatorios<sup>(7,8,9,10)</sup>.

Basados en estos antecedentes, se realizaron varias series experimentales para analizar la eventual potenciación mutua del efecto antineoplásico que presentan la quinacrina, los glucocorticoides y los antiinflamatorios no esteroideos.

#### **Material y método**

Se utilizaron ratones machos de la cepa AJ criados en el vivero del ICBM de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El tumor TA3 corresponde a un carcinoma mamario espontáneo, que fue convertido a un tumor de crecimiento ascítico que se mantiene por trasplantes cada siete días en la cavidad peritoneal de esta misma cepa. Los trasplantes se realizaron a partir de una suspensión de células del tumor ascítico en suero fisiológico adicionado con penicilina 100 unidades/ml y estreptomina 100 mg/ml. Previo recuento en una cámara hemocitométrica, las células tumorales se diluyen para obtener una concentración final de 10.000.000 de células por ml. Cada animal es inoculado con 0.1 ml por vía intramuscular.

El grupo control proviene de un consolidado de 72 animales provenientes de 9 sub-grupos en los que se observó la evolución espontánea de los tumores TA3 inoculados en diversas fechas.

Se hicieron 29 ensayos terapéuticos administrando la droga o mezcla de sustancias por vía oral dentro del agua de bebida.

En las tres primeras series el tratamiento se inició el mismo día de la inoculación del trasplante tumoral

(tratamiento concomitante). En las series 4, 5 y 6, el tratamiento se inició entre 4 a 7 días después de inoculado el trasplante tumoral (tratamiento desfasado). Los tratamientos se mantuvieron hasta la muerte del animal o hasta 15 días después de la regresión tumoral.

Los grupos experimentales de la Serie 1 se detallan en la Tabla 1.

Los grupos experimentales de la Serie 2 se detallan en la Tabla 2.

Los grupos experimentales de la Serie 3 se detallan en la Tabla 3.

Los grupos experimentales de la Serie 4 y el lapso que el tumor evolucionó espontáneamente, previo al inicio del tratamiento, se detallan en la Tabla 4.

Los grupos experimentales de la Serie 5 y el lapso que el tumor evolucionó espontáneamente, previo al inicio del tratamiento, se detallan en la Tabla 5.

Cada grupo estuvo formado por 5 a 10 ratones AJ que pesaban entre 20 y 25 g cada uno y fueron inoculados con 1.000.000 células tumorales en el muslo derecho. Se registró la evolución de los nódulos midiendo el diámetro mayor y menor cada 3 a 4 días.

Aunque se privilegió observar la evolución espontánea de las series, ocasionalmente se sacrificó un animal de algunos grupos para realizar estudios histológicos del tumor y sus modificaciones por el tratamiento. En estos casos los tumores fueron fijados en formalina buffer por 24 horas, incluidos en parafina y se obtuvieron cortes de 5  $\mu$  teñidos con hematoxilina eosina.

Los cálculos estadísticos se realizaron con el programa InStat utilizando para los resultados paramétricos el test aproximado "t" de Welch, para datos con diferente desviación estandar y para los datos no paramétricos, el test exacto de Fisher. En ambos casos se comparó cada grupo experimental con los valores del grupo control. Se incluyen, además, comparaciones estadísticas entre las diferentes combinaciones

Tabla 1.

*Tratamiento Simple Concomitante*

Grupo #	Tratamiento
1	Quinacrina 100 mg/L
2	Ac. Acetil Salicílico 100 mg/L
3	Diclofenaco 10 mg/L
4	Indometacina 5 mg/L
5	Indometacina 10 mg/L
6	Betametasona 3 mg/L

Tabla 2

*Tratamiento doble concomitante*

Grupo#	Tratamiento
1	Quinacrina 100 mg/L + Ac. Acetil Salicílico 100 mg/L
2	Quinacrina 100 mg/L + Diclofenaco 10 mg/L
3	Quinacrina 100 mg/L + Indometacina 10 mg/L
4	Quinacrina 50 mg/L + Betametasona 3 mg/L
5	Quinacrina 100 mg/L + Betametasona 3 mg/L
6	Quinacrina 100 mg/L + Prednisona 15 mg/L

Tabla 3

*Tratamiento Triple Concomitante*

Grupo #	Tratamiento
1	Quinacrina 100 mg/L + Betametasona 3 mg/L + Prednisona 15 mg/L
2	Quinacrina 100 mg/L + Indometacina 10 mg/L + Diclofenaco 10 mg/L
3	Quinacrina 100 mg/L + Betametasona 3 mg/L + Ac. Acetil Salicílico 100 mg/L
4	Quinacrina 100 mg/L + Betametasona 3 mg/L + Indometacina 10 mg/L
5	Quinacrina 100 mg/L + Betametasona 3 mg/L + Ibuprofeno 40 mg/L

Tabla 4

*Tratamiento Doble Desfasado.*

Grupo #	Lapso sin tratamiento	Tratamiento
18	Cuatro días	Quinacrina 100 mg/L + Indometacina 10 mg/L
19	Siete días	Quinacrina 200 mg/L + Indometacina 10 mg/L
20	Cinco días	Quinacrina 100 mg/L + Betametasona 3 mg/L

terapéuticas, atingentes con la hipótesis de potenciación mutua.

La manipulación de los animales fue realizada por el Dr. Vet. A.G.C. quien posee calificación profesional para manejo de viveros y animales de experimentación.

**Resultados**

Los tumores TA3 se desarrollan siempre en todos animales inoculados. En los animales de los subgrupos de control tuvieron un crecimiento de tipo Gompertziano, muy homogéneo. Todos los animales fallecieron entre los días 20 y 42. El diámetro promedio máximo alcanzado al final de la cuarta semana de evolución fue de 30.2 mm. con una desviación estandar de 2.558 mm

Los animales que recibieron quinacrina en dosis de 100 mg/L en el agua de bebida, presentaron un menor crecimiento promedio, alcanzando a 15.4 mm y 10% de esos tumores presentaron regresión total. Los tumores que regresaron, presentaron inicialmente un crecimiento similar al del resto del grupo durante la primera semana, pero en la 3ª o 4ª medición se observó primero una detención del crecimiento y luego una regresión sostenida hasta que sólo se puede medir el grosor del muslo (5 x 5 mm)

Los resultados de la serie 1 se detallan en la Tabla 6. Los resultados de la serie 2 se detallan en la Tabla 7. Los resultados de la serie 3 se detallan en la Tabla 8.

Tabla 5

*Tratamiento Triple Desfasado*

Grupo #	Lapso sin Tratamiento	Tratamiento
21	Cinco días	Quinacrina 100 mg/L + Betametasona 3 mg/L + Ac. Acetil Salicílico 200 mg/L
22	Cuatro días	Quinacrina 100 mg/L + Betametasona 3 mg/L + Diclofenaco 50 mg/L
23	Cuatro días	Quinacrina 100 mg/L + Betametasona 3 mg/L + Indometacina 10 mg/L
24	Cinco días	Quinacrina 100 mg/l + Betametasona 3 mg/L + Ibuprofeno 20 mg/L
25	Cuatro días	Quinacrina 100 mg/L + Betametasona 3 mg/L + Ibuprofeno 60 mg/L
26	Cuatro días	Quinacrina 100 mg/L + Betametasona 3 mg/L + Ibuprofeno 100 mg/L
27	Cuatro días	Quinacrina 100 mg/L + Betametasona 6 mg/L + Ibuprofeno 40 mg/L
28	Cuatro días	Quinacrina 200 mg/L + Betametasona 6 mg/L + Ibuprofeno 100 mg/L
29	Siete días	Quinacrina 200 mg/L + Betametasona 6 mg/L + Ibuprofeno 100 mg/L

Tabla 6

*Evolución de tumores TA3 con tratamiento simple concomitante.*

Tratamiento en agua de bebida mg/L	N	% de regresión	"p"	Diámetro Promedio	Desv. estándar	"p"
1 Quinacrina 100	10	10%	NS	17,4	5,1	<0.0001
2 A. Acetil Salicílico 100	10	10%	NS	23	8,9	<0.05
3 Diclofenaco 10	5	0	*	22,7	2,3	<0.0001
4 Indometacina 5	5	0	*	20,5	1	<0.0001
5 Indometacina 10	10	0	*	23,9	1,8	<0.0001
6 Betametasona 3	5	0	*	23,4	0,9	<0.0001

Tabla 7

*Evolución de tumores TA3 con tratamiento doble concomitante.*

Tratamiento en agua de bebida. (mg/L)	N	% de regresión	"p"	Diámetro promedio en mm	Desv. estándar	"p"
7 Quin 100 + A.A.Sal 100	10	40%	0.0001	12,6	8,9	<0.001
8 Quin 100 + Diclo 10	6	16%	NS	15,8	6,3	<0.005
9 Quin 100 + Indo 10	10	60%	<0.0001	9,5	6,2	<0.0001
10 Quin 50 + Beta 3	5	40%	0.0034	12,6	6,9	<0.005
11 Quin 100 + Beta 3	6	33%	0.005	16,3	7,8	<0.01
12 Quin 100 + Predn 15	6	0	*	22,8	3,8	<0.01

Tabla 8

*Evolución de tumores TA3 con tratamiento triple concomitante.*

Tratamiento en agua de bebida (mg/L)	N	% de Regresión	"p"	Diámetro promedio en mm	Desv. estándar	"p"
<b>13 Quin 100 + Beta 3 + Predn 15</b>	<b>6</b>	<b>16%</b>	<b>0.0769</b>	<b>20,1</b>	<b>7,14</b>	<b>&lt;0.01</b>
<b>14 Quin 100 + Indo 10 + Diclo 10</b>	<b>6</b>	<b>33%</b>	<b>0.005</b>	<b>10,16</b>	<b>5,5</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>15 Quin 100 + Beta 3 + A.A.Sal 100</b>	<b>10</b>	<b>30%</b>	<b>0.0014</b>	<b>14,75</b>	<b>8</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>16 Quin 100 + Beta 3 + Indo 10</b>	<b>10</b>	<b>50%</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>11,15</b>	<b>6,5</b>	<b>&lt;0.0001</b>
<b>17 Quin 100 + Beta 3 + Ibuprof 40</b>	<b>10</b>	<b>70%</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>9,65</b>	<b>7,5</b>	<b>&lt;0.0001</b>

El estudio histológico de algunos tumores en regresión de la serie 3, reveló amplias zonas de necrosis de coagulación en el centro del tumor, y apoptosis de las células endoteliales de los capilares que atraviesan las zonas no necrosadas del tumor.

En los animales que presentaron regresión tumoral, se suspendió el tratamiento quince días después, sin que apareciera ninguna recidiva tumoral, hasta 3 meses de observación.

Los resultados de la serie 4 en la cual se permitió que los tumores TA3 inoculados crecieran espontáneamente por algunos días antes de iniciar el tratamiento se detallan en la Tabla 9.

Los resultados de la serie 5 en los cuales se combinaron tres fármacos después que el tumor creció espontáneamente por algunos días se detallan en la tabla 10.

### Discusión

El tumor TA3 es un carcinoma anaplástico que, de acuerdo al protocolo de trasplante descrito, se desarrolla siempre en todos los animales, crece muy rápidamente y mata al animal por caquexia y metástasis, entre la cuarta a quinta semana después de trasplante. La administración de betametasona por vía oral no disminuye la letalidad de este tumor. Igualmente, la administración de indometacina por vía oral no modifica la tasa de mortalidad.

Las combinaciones dobles de betametasona más quinacrina produjeron 33 a 40% de regresiones totales y definitivas. Las combinaciones de indometacina más quinacrina produjeron 60% de regresiones totales. Dado que la indometacina es bastante tóxica para estos ratones, se hicieron ensayos con otros agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), que fueron mejor tolerados.

Las combinaciones terapéuticas triples, consistentes en quinacrina 100 mg/L más betametasona 3 mg/L, más un agente AINE, dieron tasas de regresión total y definitiva de 30%, 50% y 70%, según se empleara ácido acetil salicílico, indometacina o ibuprofeno, respectivamente. En numerosas series experimentales no relatadas en la presente publicación se ensayó agregar un cuarto componente sin conseguir superar la cifra de 70% de regresiones alcanzadas.

En una segunda etapa, se modificó el protocolo, introduciendo unos 4 a 7 días de intervalo entre la inoculación de las células tumorales y el comienzo del tratamiento por vía oral. En estas circunstancias, la combinación triple de quinacrina, betametasona e ibuprofeno, logró un 30 % de regresiones definitivas. La curva de desarrollo exponencial de estos tumores se detiene al iniciar el tratamiento y una semana después se pueden distinguir por observación y palpación, los tumores que empiezan a regresar de los que prosiguen su curva de crecimiento.

Tabla 9

*Evolución de tumores TA3 con tratamiento doble desfasado 4 a 7 días después de la inoculación*

Días	Tratamiento en agua de bebida (mg/L)	N	% de regres.	"p"	Diám. medio en mm	Desv. estandar mm	"p"	
18	4	Quin 100 + Indo 10	10	40%	0.0001	12,44	7,1	< 0.01
19	7	Quin 200 + Indo 10	10	10%	NS	19,3	8,8	< 0.0001
20	5	Quin 100 + Beta 3	10	20%	0.0136	13,7	4,9	< 0.001

Tabla 10

*Evolución de tumores TA3 con tratamiento triple iniciado 4 a 7 días después de la inoculación.*

Días	Tratamiento en agua de bebida (mg/L)	N	% de regres	"p"	Diámet medio en mm	Desv. estandar	"p"	
21	5	Quin 100 + Beta 3 + A.A.Sal 200	10	10%	NS	18,5	6,1	< 0.001
22	4	Quin 100 + Beta 3 + Diclo 50	10	0	*	(**)		
23	4	Quin 100 + Beta 3 + Indo 10	10	20%	0.0136	14,7	5,4	< 0.0001
24	5	Quin 100 + Beta 3 + Ibuprof 20	10	0	*	17,41	2,4	< 0.0001
25	4	Quin 100 + Beta 3 + Ibuprof 60	10	30%	0.0014	14	6,3	< 0.0001
26	4	Quin 100 + Beta 3 + Ibuprof 100	10	10%	NS	18,58	7	< 0.001
27	4	Quin 100 + Beta 6 + Ibuprof 40	10	30%	0.0014	13,78	8,3	< 0.001
28	4	Quin 200 + Beta 6 + Ibuprof 100	10	50%	< 0.0001	7,7	4,7	< 0.0001
29	7	Quin 200 + Beta 6 + Ibuprof 100	10	20%	0.0136	14,2	8,4	< 0.001

(\*\*) Los animales murieron en la tercera semana por combinación tóxica.

Tratando de optimizar el efecto terapéutico en este nuevo protocolo con tratamiento desfasado, se duplicó las dosis de cada uno de los componentes, obteniendo 50% de regresiones, en una serie que tuvo 4 días de intervalo y 20% en una serie que tuvo 7 días de intervalo. Es evidente por lo tanto que la eficacia de esta combinación terapéutica es mayor mientras más pronto se administre.

Al analizar la histopatología de los tumores que muestran regresión, se pudo observar intensa apoptosis en las células endoteliales de los capilares que nutren al tumor. Es posible por lo tanto, que esta triple combinación terapéutica tenga un efecto angiostáti-

co, el que será analizado en futuros protocolos, cuantificando la red vascular. Folkman<sup>(11)</sup> demostró la propiedad angiostática de algunos corticoides, especialmente cuando se los asocia con heparina, pero no se conoce el mecanismo de ese efecto angiostático.

Recientemente se ha utilizado quinacrina y otros compuestos acridínicos asociados a quimioterapia, dada la propiedad que ellos tienen de bloquear la glicoproteína P que participa en el mecanismo de multi-resistencia a drogas<sup>(12)</sup>. Sería oportuno analizar la eventual participación de la glicoproteína P en la evolución del tumor TA3 tratado con la triple combinación de AINEs, glucocorticoides y quinacrina.

## Referencias

1. Guerrero A, Zipper J, Dabancens A.  
*Actividad antineoplásica ejercida por quinacrina oral sobre tumores malignos transplantables en ratón. Revista Chilena de Cancerología, 1992; 2: 119-22.*
2. Dabancens A, Zipper J, Guerrero A.  
*Quinacrine and Copper, compounds with anticonceptive and antineoplastic activity. Contraception, 1994; 50: 243-45.*
3. Mc Cormick DL.  
*Anticarcinogenic activity of quinacrine in the rat mammary gland. Carcinogenesis 1988; 9: 175-78.*
4. Alade SL, Brown RE, Wormsley S, Wu MC.  
*Cytostatic and tumoricidal effects of quinacrine on a monoblastic cell line (U937) expressing P-glycoprotein. Proc Ann Meet Am Assoc Cancer Res 1991; 32: A2247.*
5. Garcia H, Dabancens A.  
*Comparative effects of glucocorticoids on tumor growth. Arch Biol Exper 1968; 5: 77-80.*
6. Lynch NR, Salomon JC.  
*Tumor growth inhibition and potentiation of immunotherapy by indomethacin in mice. J Natl Cancer Inst 1979; 62: 117-21.*
7. Hofer D, Dubitsky AM, Reilly P, Santoro MG, Jaffe BM.  
*The interactions between indomethacin and cytotoxic drugs in mice bearing B16 melanomas. Prostaglandins 1980; 20: 1033-39.*
8. Lala PK, Parhar RS.  
*Cure of B16F10 melanoma lung metastasis in mice by chronic indomethacin therapy combined with repeated rounds of interleukin 2: Characteristics of killer cells generated in situ. Cancer Research 1988; 48: 1072-79.*
9. Mertens WC, Bramwell VHC, Gwady-Sridhae F, Romano W, Banerjee D, Lala PK.  
*Effect of indomethacin plus ranitidine in advanced melanoma patients on high-dose interleukin-2. Lancet 1992; 340: 397-98.*
10. Pollard M, Luckert PH.  
*Indomethacin treatment of rats with dymethylhydrazine-induced intestinal tumors. Cancer Treat Rep 1980; 64: 1323-27.*
11. Folkman J, Langer R, Linhardt RJ, Haudenschild C, Taylor S.  
*Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. Science 1983; 221: 719-25.*
12. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM.  
*Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1999; 39: 361-98.*