

Plantas superiores con acción antitumoral

por

MANUEL GÓMEZ-SERRANILLOS FERNÁNDEZ

Departamento de Farmacognosia - Facultad de Farmacia
Ciudad Universitaria - Madrid, 3

Discurso de Ingreso como Académico de Número

Sesión del 31 de mayo de 1979

En nuestros tiempos se ha redoblado el interés de esta parcela de la ciencia farmacológica y se realizan esfuerzos muy considerables en la investigación para encontrar la solución terapéutica en la lucha contra el cáncer. Es cierto que hasta el momento son muchos los descubrimientos llevados a cabo, pero no es menos cierto que aún se está muy lejos de llegar a un feliz resultado, pues son muchas las causas que a ello se oponen. De una parte la existencia de diferentes tipos de tumores, que presentan diferente velocidad de crecimiento, que afectan a tejidos de distinta naturaleza, que ocupan diferentes posiciones en el organismo y sobre todo que no se conoce la causa, o sólo en muy pocos casos, que produce el tumor.

Se conocen tumoraciones que son fruto de cierta condición profesional, como son aquellos que se producen en individuos que con mucha frecuencia están expuestos a la acción de determinadas sustancias, tales como hidrocarburos aromáticos, aminas aromáticas, nitrosoderivados, etc., así como los tumores a virus que, al parecer, constituyen un grupo restringido. Hay, por el contrario, muchos casos en los que es un misterio el que en un momento determinado de la vida de un ser, se produzca una modificación en el código genético que induce a una célula a producir una multiplicación incontrolada que se traduce en una tumoración.

Sólo en los casos en que se conoce el agente cancerígeno, se puede llegar mediante medios profilácticos a evitar la aparición de

estas malformaciones, pero en la mayor parte de los casos puede decirse que el tumor surge en el organismo de una manera larvada y sin ninguna señal de aviso, pues cuando el paciente acusa los primeros síntomas, en la mayor parte de los casos, el tumor está bien implantado y exige un tratamiento tan drástico como es la extirpación quirúrgica del tejido neoplásico, a la que no siempre se llega a tiempo, o el tratamiento con agentes radioactivos.

De un tiempo a esta parte, quizás persuadidos de los escasos resultados positivos alcanzados por los medios citados y también con el propósito de reforzarlos, se ha vuelto la mirada al empleo, en su tratamiento, de agentes químicos dotados de actividad fisiológica para producir el bloqueo de la proliferación tumoral.

Entre los muchos remedios que en todos los tiempos se han empleado, de un modo absolutamente empírico, basándose en los resultados obtenidos con el uso, se encuentran las plantas superiores. Es evidente que en su composición química se encuentran moléculas de complicada estructura, en muchos casos totalmente desconocida, que pueden estar dotadas de propiedades bien mitóticas, bien oncolíticas, que puedan ser útiles en la terapia de tumores. Es por esto por lo que si siempre han estado presentes las plantas en esta terapia, en los últimos quince años se ha investigado sin descanso en este campo y son muchas las moléculas aisladas de distintas especies que son experimentalmente activas. No se piense que al decir esto lo hacemos con aire triunfalista, ni mucho menos, pues es preciso reconocer que, a pesar de ser varias las sustancias activas descubiertas, el resultado práctico está aún muy lejano a su solución. No obstante se han realizado avances muy meritorios aplicando las técnicas adecuadas. A comentar lo conseguido vamos a dedicarnos a continuación.

Pero... hagamos un poco de historia.

El cáncer es una enfermedad que se conoce desde los más remotos tiempos, como se deduce de una serie de hechos perfectamente conocidos. En el año 1891 se encuentra enterrado en Java un antroipoide en el que se hallan huellas de este padecimiento; en la gran pirámide de Gizeh se han podido observar momias con restos de tumores óseos. Se tienen noticias de esta enfermedad a través de

los escritos antiguos. El papiro de Ebers describe formas de ella y algunos remedios primitivos para su tratamiento, cita entre ellos la levadura, un hecho curioso si pensamos que en 1950 se introduce en la terapia del cáncer el ácido fólico, que como se sabe es un derivado de la levadura.

El Ramayana considera también la enfermedad y su tratamiento con pastas cáusticas hechas con arsénico, mezcladas con distintas especies vegetales. Remedio del que se sirven todavía algunos curanderos.

Dioscórides recomienda el uso del colchico para su tratamiento. En la actualidad está plenamente demostrado que el alcaloide del colchico, la colchicina tiene acción citostática y que un derivado de la colchicina se puede emplear en el tratamiento de la leucemia granulocitósica.

Plinio el viejo recomendaba la planta de los druidas, el muérdago. Hoy se ha comprobado que el jugo fresco del *Viscum album* L. tiene una marcada actividad, produciendo más de un 50 por 100 de inhibición experimental de tumores.

A través de los siglos se han ido incorporando al arsenal terapéutico un crecido número de especies que han sido muy empleadas, y si bien es verdad que no obtuvieron resultados claramente positivos, no es menos cierto que en algunas ocasiones se ha logrado disminuir el padecimiento físico de los enfermos.

Entre todas ellas hemos seleccionado algunas de las que en otro tiempo fueron muy apreciadas:

Las uvas o su zumo

Se tenía bastante fe en una dieta abundante de uvas o del zumo durante varias semanas, seis como mínimo; se citan (2) que por este procedimiento se consiguieron curaciones, principalmente de tumores de estómago e intestino. Este es el origen de la cura de Bremd, que consiste en una dieta de uvas, yogur y otros alimentos vegetales; esta dieta es considerada por algunos como ineficaz e incluso per-

judicial, dado que algunas uvas pueden contener una elevada cantidad de taninos que potencialmente tienen un efecto carcinógeno.

Vervena officinalis (3)

Se emplea desde cuatro siglos antes de Cristo con una técnica curiosa y pintoresca. Una vez obtenida la raíz se corta en dos partes, una se aplica al lugar donde el sujeto tiene la tumoración y la otra se coloca en las proximidades de un foco calorífico. Esta última parte, por efecto del calor, se va secando y disminuyendo el volumen; de la misma manera irá disminuyendo la inflamación del enfermo. Cuando así no sucedía la parte de raíz exterior se sumerge en agua y si recupera su tamaño primitivo, cosa que sucede siempre, es que la enfermedad es incurable.

Allium sativum

El papiro de Ebers menciona como tratamiento de tumores frotar con ajo la región afectada. Hipócrates recomienda comerlos para combatir los tumores de útero. Es curioso conocer que en los tiempos actuales Hartwell (4) indique que la incidencia del cáncer es menor en los países que se come mucho ajo.

En el año 1957 Wetberger y Pensky (5) señalan que el bulbo de ajo contiene un poderoso agente bacteriano, el éster alil sulfúrico o alicina que se origina por la interacción de un enzima existente en el ajo y el sustrato S-etil-L-cisteína sulfósido. En las pruebas farmacodinámicas se puede observar que cuando por separado son inyectadas a ratones a los que se les ha implantado un sarcoma, todos los ratones mueren en un plazo no superior a dieciséis días, pero cuando el sustrato es puesto en contacto durante unos días y pasados estos se inyecta la mezcla a ratones en las mismas condiciones, el tumor no crece y los animales aguantan un período de observación de varios meses.

Sanguinaria canadensis

Esta especie ha sido empleada en el año 1857 por Fell (6). En su trabajo hace referencia al empleo de esta planta en enfermos afec-

tados por tumores. Se sabe a través de los indios de América del Norte que vivían en las costas del Lago Superior y por lo recopilado en los comentarios de aquellos que se sirvieron de esta planta con fines medicinales, que se obtienen, con su uso, resultados superiores a los obtenidos hasta aquel momento. El procedimiento usado por Fell consistía en aplicar a diario, sobre la parte donde se encontraba la tumoración, una especie de cataplasma sobre la que se ponía una pasta preparada con extracto de planta, cloruro de cinc, fluor y agua. Mediante un prolongado tratamiento terminaba desprendiéndose el tumor cuando éste era superficial. En el caso de que fuera algo interno, se practicaba a su alrededor incisiones profundas por las que se introducía la pasta diariamente y según Fell el tumor en algunas semanas desaparecía.

Stone (7) ensaya este procedimiento en el año 1916 y sostiene que hay menos recidivas que por el método quirúrgico, mientras que Beutley y Trimmen (8) aseguran que la planta es completamente inocua.

En el año 1947 Osol y Famar (9) dicen que el uso de la sanguinaria estuvo muy extendido en Estados Unidos para el tratamiento de las verrugas y pólipos nasales, así como para el cáncer de piel, entonces ya se conocían los trabajos de Stiekl (10), en los que había comprobado la presencia en la planta de dos alcaloides, la sanguinaria y la cheleritrina, que ejercían una distinta acción sobre el carcinoma de Erlich en ratones, comprobado en el 1960 por Shear y colaboradores (11).

Phelan y colaboradores (12) (13) realizan en el año 1962 un tratamiento parecido al creado por Fell, que aplican en el tratamiento de tumores superficiales, incluyendo los de nariz y oído interno y dicen haber llegado a curaciones completas con muy pocas recidivas.

Podofilum peltatum

Los indios del maine usaron con bastante éxito el rizoma de podofilo para el tratamiento de tumores superficiales. Partiendo de estas prácticas realizadas por los indios, y empleando la resina obtenida

del rizoma, el podofilino, Kaplan (14) (15), en el año 1942, obtuvo un brillante resultado en el tratamiento de verrugas venereas o condiloma acuminata. Hartwell logra, más tarde, el aislamiento a partir de este rizoma de la Podofilotoxina, demetilpodofilotoxina y las α y β peltatinas que tienen experimentalmente actividad antimitótica.

Prunus armeniana

Con las semillas de albaricoque preparan en Méjico un extracto al que denominan lactrille (16), esta planta es originaria de China, donde también se tienen noticias de haber sido usada para el tratamiento de cierta clase de tumores. Esta coincidencia de semejante empleo en partes tan alejadas del mundo es notable y digna de un estudio más profundo, pues hasta el momento aunque no se ha dejado de emplear, se sabe poco de ella. Se especula por algunos que la acción debe achacarse en el glucósido cianogenético que en ellas se encuentra, que al llegar a las células tumorales que contienen un enzima la β glucuronidasa, se produce en el interior de las mismas ácido cinhídrico que las destruye, dejando intactas las sanas con su crecimiento normal. Se nos antoja una idea demasiado fácil e ingenua para explicar un hecho tan difícil e importante, al menos no hay un asomo de una comprobación experimental. De todas maneras el Lactrille es un medicamento polémico hasta en nuestros días. Morrone (17) asegura que empleando Lactrille en diez casos de enfermos inoperables todos ellos con metástasis, había obtenido una clara regresión y alivio del dolor. En América existe un grupo de científicos que se han pronunciado en favor de los beneficiosos efectos de la droga, mientras que otros niegan todo valor a la misma. Esta polémica la recoge Willian J. Broad en un artículo que publica en Science en octubre de 1978, en el que dice que con objeto de resolver de una vez para siempre la polémica que existe alrededor del empleo del Lactrille como un medicamento de mucha actividad contra el cáncer el director del Instituto Nacional del Cáncer convocó el 27 de septiembre un ensayo clínico del Lactrille y que entre 150 y 300 pacientes de cáncer están expectantes para recibir la droga. Este ensayo clínico no se había realizado porque por los ensayos experimentales «in vivo» e «in vitro» no parece que dicho

extracto mostrara actividad. Ante la polémica establecida con esta droga, el articulista citado señala que los defensores de la droga dicen que más de 70.000 personas se han beneficiado de ella, y piden que se realice un ensayo clínico, que se había ido posponiendo ya que no había razones científicas que lo aconsejaran y lo mucho que cuesta un programa de este tipo, pero como decíamos anteriormente el ensayo clínico está programado, se va, o se habrá empezado en enero y para la primavera darán los primeros resultados.

Con estos ejemplos que hemos seleccionado, queremos llegar a las conclusiones: primera, que la humanidad en todos los tiempos ha sido víctima del cáncer; segunda, que los vegetales han jugado un papel preponderante en la confección de los remedios que se han empleado en su tratamiento.

Es cierto que durante mucho tiempo se han empleado de un modo empírico, pero más tarde se pasa a realizar un estudio científico, racional y sistemático en la búsqueda de especies con actividad antitumoral, para ahondar en el estudio de éstas hasta encontrar los principios responsables de esta acción.

Esta fase comienza en el año 1937, fecha en que se crea el Instituto Nacional del Cáncer en los Estados Unidos de América, con el fin de promover, promocionar y coordinar las investigaciones relativas a su tratamiento. La creación de este Instituto se hace dotándole de medios que puedan asegurar su eficacia, como lo demuestra el hecho de que en 1938 cuenta con la subvención mayor de cuantos constituyen el Instituto Nacional de la Salud.

Entre las investigaciones que se llevan a cabo, el Instituto pone un especial énfasis en el estudio de las plantas superiores, como portadoras de moléculas complicadas, a veces completamente desconocidas, que pueden estar dotadas de actividad antitumoral.

Son encargados de dirigir este trabajo los doctores Hartwell y Shear's; ciertamente estos investigadores realizaron un gran esfuerzo y consiguieron aislar algunas sustancias con actividad, como en el caso del podofilo. La carencia de una metodología para llevar a buen fin los ensayos Farmacognósticos, Farmacodinámicos y clínicos hizo que no fuera posible el avance que en principio se había preconizado.

Es necesario llegar al año 1950 para que el I. N. C. establezca un programa mucho más ambicioso, en el que van a tener cabida todos los interesados en el tema, los cuales forman equipos independientes, financiados por el I. N. C. Al trabajar aislados existe una falta de conocimiento entre lo que cada uno está investigando y es por esto, por lo que el año 1955 es el propio Instituto el que además de financiar, va a coordinar el trabajo llevado a cabo por los distintos grupos, creando un vasto programa sobre la terapéutica del cáncer, que es ampliado posteriormente por presiones académicas y una masiva participación de la industria farmacéutica.

La labor realizada en esta época es enorme y fácilmente puede apreciarse echando una mirada a la tabla de Schepart (8), en la que se muestran el número de plantas que fueron sometidas a un completo ensayo para conocer si en ellas existían propiedades antitumorales.

A ñ o	Núm. de plantas ensayadas
1956 — 1958	500
1959	1.000
1960 — 1961	5.500
1962	5 200
1963	5.200
1964	4.000
1965	3.816
1966	3.620
1967	6.253
1968	4 245
1969	5.109
1970	3.499
1971	3.015
1972	11.434
1973	11.661
1974	5.830

Podemos ver por ella que durante los años 1956 a 1959 se someten a ensayo 1.500 especies, que aunque a primera vista parece ele-

vado, pues es una media de 373 por año, es prácticamente insignificante con la llevada a cabo en años posteriores. Desde 1960 a 1971 se ensayan en este programa 49.057 especies, que representa una media de 4.459 por año. Esta proporción es muy incrementada durante 1972 y 1973, con una media de 11.097 por año; con esta cifra se consigue un ritmo que no es posible seguir si se han de realizar todas las partes del programa y es necesario retornar al número de, más o menos, 5.000 especies, que es lo que permite la coronación de todos los ensayos precisos.

¿Cuál es la clave que sirve para establecer este gigantesco programa a partir del 1960? Pienso que todo se programó como consecuencia del aislamiento de los alcaloides de las Vincas.

La *Vinca rosea* L. o *Catharantus roseus* G. Don. es portadora de muchos alcaloides, entre los que se encuentran la vincristina, vincalécoblastina, leurosina, leurosina y rovidina, que muestran una notable actividad antileucémica (19), principalmente la vincristina, mientras la vincalécoblastina se muestra más eficaz en el coriocarcinoma, enfermedad de Hodgkin y en el tratamiento del cáncer de seno.

El camino que conduce a este importante descubrimiento tiene su origen en los laboratorios de investigaciones médicas de Collip, en Ontario (Canadá), donde el Dr. Noble realiza los primeros experimentos con esta planta buscando con ellos justificar de una manera científica el uso que de ella hacen los jamaicanos en el tratamiento de la diabetes. En el año 1949 recibe de un médico de Jamaica las hojas de Vinca, las cuales son sometidas a un ensayo farmacodinámico sobre conejos. Se les administra la planta por vía oral y se comprueba que no tiene ninguna influencia sobre la glucemia normal ni sobre la hiperglucemia provocada. Cinco años después entran en el equipo de Noble, Beer y Cutts, que continúan la experimentación sobre la acción hipoglucemiante de estas hojas, pero cambiando la metodología; en primer lugar se va a partir de extractos de hoja preparados en condiciones de que puedan ser inyectados, en segundo se va a operar con ratones. Tampoco en este caso se observó ningún resultado sobre la glucemia, pero en cambio ocurrió que muchos ratones murieron como consecuencia de una infección provocada por pseudomonas. Se estudió si los extractos inyectados esta-

ban infectados y pudo comprobarse que no. Se pensó entonces que los ratones habían sucumbido por la infección de estos microorganismos que viven normalmente donde hay ratones, porque éstos perdieron la resistencia natural a la infección, probablemente porque alguno de los componentes del extracto influyera de forma notable en la caída rápida del número de leucocitos o dañara la médula ósea. Se controló la sangre de los animales comprobándose la rápida disminución del número de leucocitos y al mismo tiempo se comprobó que no tenía influencia en otros factores de la sangre y que no sufrían los órganos vitales, es decir, que sólo estos extractos mostraban una acción selectiva cual era la reducción del número de leucocitos, y esto sugirió que los extractos podrían tener una acción antileucémica y antitumoral, hecho que se comprobó con las experiencias farmacodinámicas oportunas.

Posteriormente los extractos fueron sometidos a un estudio fitoquímico y fue posible aislar un alcaloide al que denominaron vincaleucoblastina.

Los canadienses presentaron los resultados de su experimentación en un simposio que se celebró en Nueva York en el año 1958.

Cuando Noble presentó el trabajo, lo primero que dijo es que el cáncer estaba muy lejos de su imaginación cuando acometió el estudio con las vincas. Pudiera pensarse que este importante descubrimiento fue completamente fortuito, pero nada más lejos de la verdad, pues al comprobar su inactividad sobre la glucemia y que la muerte de los ratones se debía a un hecho plenamente justificado, se pudo haber dado por cerrado el caso, pero la investigación es algo más que la aplicación de unas técnicas y la obtención de unos resultados, es la de enfrentarse a una serie de hechos experimentales y sean cuales fueran los resultados, en muchas ocasiones inesperados, buscar las causas que pueden producirlos hasta llegar a una auténtica interpretación de los mismos y al conocimiento de la verdad.

Mientras en Ontario, Noble y sus colaboradores investigaban con la Vinca, en Indianápolis, lugar bastante alejado del primero, Svoboda trabajaba en el mismo tema. En realidad el proyecto Svoboda no estaba dedicado al estudio de una planta para una determinada dolencia, sino al acopio de un considerable número de plantas, a ser posible con antecedentes en la medicina popular y determinar en

ellas la presencia de moléculas que pudieran ser útiles a la terapéutica. El proyecto estaba financiado por Lilly y comenzó por una prospección de plantas en el Lejano Oriente; entre ellas fue introducida la Vinca, por haber llegado a conocimiento de los encargados de la recolección que durante la segunda guerra mundial los diabéticos de las Islas Filipinas usaban Vinca nativa llamada Sitsirika, por carecer de insulina para su tratamiento.

Centrados los estudios sobre las Vincas, en el año 1956 Lilly solicitó de la corporación Meer, Vincas bien identificadas de todas las especies y variedades que se pudieran encontrar. Se reunió para ello a distintos especialistas del mundo, mediante los cuales se consiguió un abundante material perfectamente clasificado, algo que hasta entonces había sido difícil porque en la clasificación de las Vincas existía mucha confusión en la bibliografía botánica.

Los mejores resultados se consiguieron con la *Vinca rosea* L., y la mayor parte de la planta empleada procedía de las montañas del este de la India y en menor cantidad de las Antillas. Posteriormente, como consecuencia de los resultados obtenidos se han realizado extensos cultivos en el sur de los Estados Unidos.

En el año 1957 Svoboda ensaya los extractos de la planta sobre ratones con la leucemia P 1534, obteniendo un resultado francamente positivo.

En una segunda parte se dedica al aislamiento de los principios activos y en poco tiempo consigue obtener los alcaloides siguientes: Leurosina, Virosina, Pervirina y Leurocristina (21) (22) (23).

La labor de Svoboda en relación con los alcaloides de las Vincas representa un extraordinario desarrollo en la técnica farmacognóstica, y así fue reconocido por todos los miembros de la Sociedad Americana de Farmacognosia, de la que él era entonces presidente, pues no tenía paralelo en la técnica seguida hasta entonces en este campo de la ciencia. También fue reconocido por la American Pharmaceutical Association, concediéndole en 1963 el premio de investigación de Productos Naturales.

Svoboda introduce un método de extracción por el que consigue aislar 50 de los 64 alcaloides que han sido separados hasta ahora de la planta, cuyo contenido total es de 0,7 por 100 y uno de los más importantes, la Vincristina, se encuentra en la proporción de 0,00025

por 100, es decir, 1 gramo por cada 400 kilos de planta seca, aproximadamente 1.300 kilos de planta fresca.

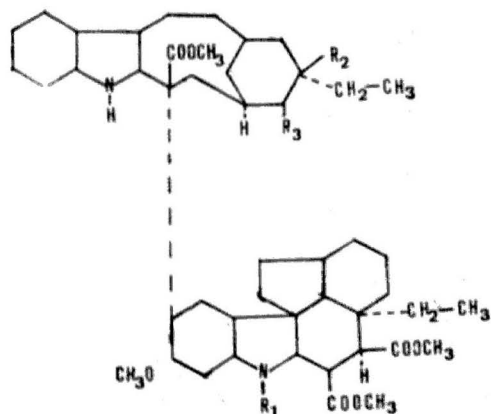
Llega a estos resultados prescindiendo de la técnica de aislamiento y purificación hasta entonces conocida y emplea una nueva en la que el aislamiento y la selección la realiza conjuntamente fijando en la droga las bases fuertes mediante la presencia de un ácido orgánico débil, el tartárico, que permite una separación de las bases débiles. Siguiendo esta técnica cuyo esquema exponemos a continuación, es posible aislar siete fracciones de extractos alcaloídicos que son sometidos posteriormente a una separación cromatográfica en columna de alúmina F 20, parcialmente desactivada con ácido acético al 10 por 100.

De los 64 alcaloides son diméricos con carácter indol indolínico 24 y de ellos, solamente siete han mostrado actividad oncolítica.

Son sólo dos, Vincaleucoblastina y Leurocristina, aptos para su uso clínico, pues la Leurosina, experimentalmente de mayor actividad oncolítica, presenta una mayor toxicidad, por lo que no es posible su uso en terapéutica.

La Vincaleucoblastina y la Leurocristina han sido utilizadas, en muchos casos, con resultados eficaces, en el tratamiento de neoplasmas humanos.

Presentan una complicada estructura, que ha sido establecida por medios químicos y fisicoquímicos (24) (25) (26). Son indol indolínicos dímeros asimétricos.



Alcaloide	R ₁	R ₂	R ₃
Vincaleucoblastina	CH ₃	OH	H
Leurocristina	CHO	OH	H
Leurosina	CH ₃	H	OH

Es de notar que la Leurosina y un isómero de la Vincaleucoblastina diferencianse tan sólo por la posición del grupo OH en la porción indolínica, siendo esta pequeña diferencia estructural la que concede a la molécula un poder tóxico mucho mayor que su isómero, hasta el punto, como ya hemos dicho, de que no pueda utilizarse en terapéutica.

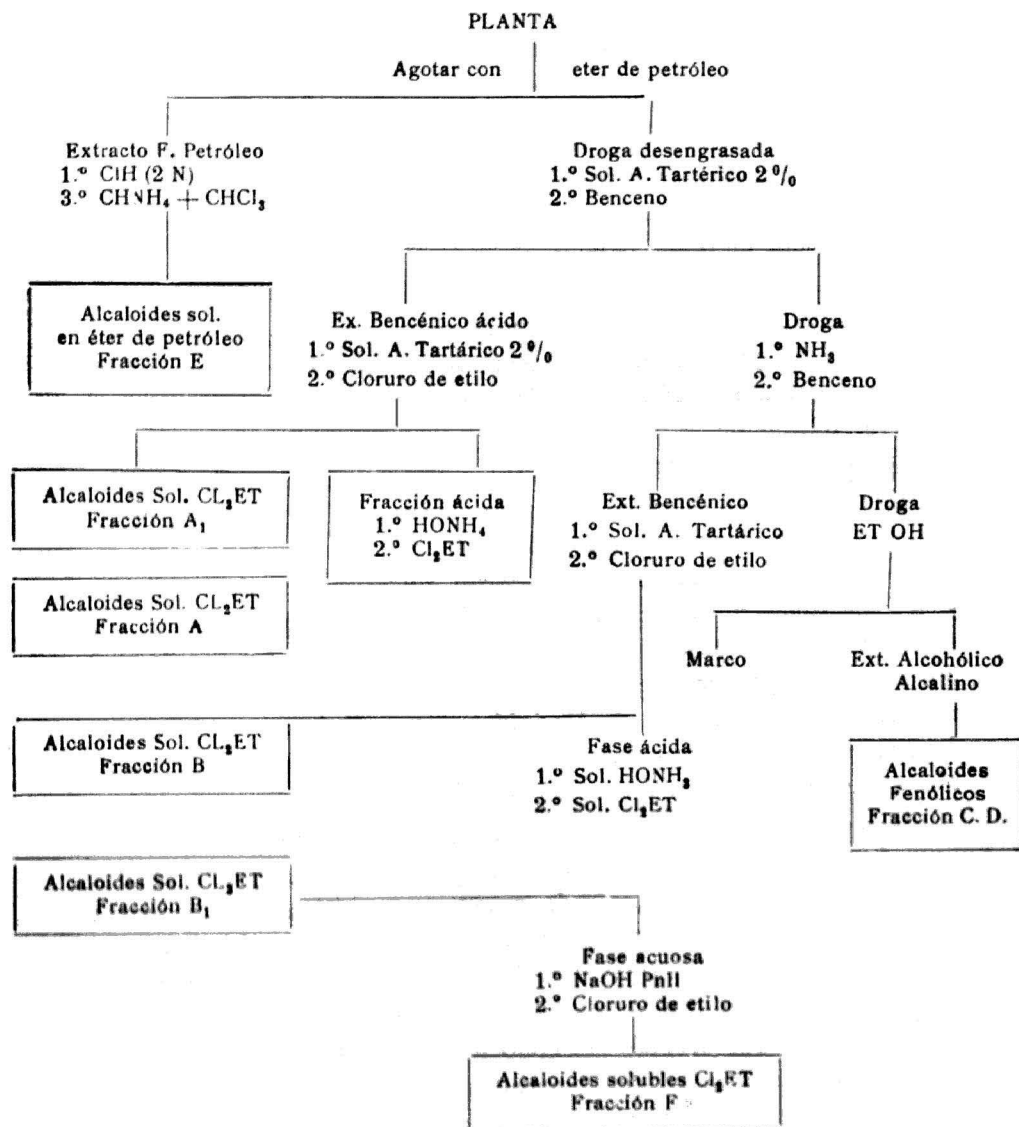
El desarrollo como medicamento de estos alcaloides fue desusadamente rápido, ya que en sólo diez años pasaron de los primeros ensayos a su aceptación en clínica, quizás sólo pueda equipararse su desarrollo al de la penicilina.

Son productos tenidos en consideración en la terapia del cáncer (27) y se ha establecido su uso en clínica, con un profundo conocimiento de su farmacología y toxicología. Hoy se conoce que a pesar de la poca diferencia que existe entre la Vincaleucoblastina y la Leurosina ($R_1 = \text{CH}_3$ o $R_1 = \text{CHO}$) en su molécula, haya una significativa diferencia en su comportamiento frente a los neoplasmas humanos. La primera tiene respuestas muy apreciables en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin y otras linfomas como el linfoma de células B y neuroblastomas resistentes al Metotrexato, coriocarcinoma y enfermedad de Letterer-Siwe (Histiocitosis).

El segundo, contrariamente, muestra su actividad de modo más acusado en la remisión hematológica completa de leucemias agudas en niños, habiéndose encontrado respuestas positivas en carcinoma de mamas y en algunos tumores en niños. No obstante, donde parece ser más útil es en el tratamiento de leucemia, asociándola al metotrexato, 6 mercapto purina y prednisona (28).

Es natural, que después del conocimiento de los alcaloides de las Vincas y de sus propiedades terapéuticas, se ponga un especial énfasis en los vegetales superiores como portadores de sustancias con poder antitumoral, que como los alcaloides anteriores puedan ser aplicados en la terapia del cáncer.

Esta es la razón por la que desde el año 1959 hasta nuestros días,



veinte años, se hayan investigado alrededor de 180.000 especies pertenecientes a 2.500 géneros, entre las cuales se han encontrado bastantes moléculas con actividad antitumoral experimental, que han dado motivación a otro tipo de investigación, cual es la obtención por medios sintéticos, tomando como modelo la molécula natural, de estructuras parecidas, que sin perder su actividad pueden estar libres de efectos colaterales no deseables.

El programa que se realiza en esta masiva investigación, tiene tres fases claramente definidas:

a) Realizar una selección y adecuada recolección de las especies que se van a someter a estudio.

b) Conseguir una técnica de extracción con la agilidad suficiente para realizar los ensayos con la rapidez que exige una investigación en la que se conoce que los resultados negativos van a ser numerosos.

c) Standarizar las pruebas biológicas a las que hay que someter a los extractos para descubrir su actividad.

RECOLECCIÓN DE ESPECIES

El programa está, como hemos más arriba señalado, patrocinado por el Instituto Nacional del Cáncer, y la dirección del mismo encargó al Servicio de Investigaciones Agronómicas la organización de la selección y preparación de las especies que serían objeto de estudio.

Naturalmente en principio todas las especies servirían, sin más limitaciones que la planta fuera lo suficiente abundante para proporcionar la materia prima necesaria y que la recolección se duplicara o en distintas zonas geográficas o en diferentes estaciones del año.

Realmente, aunque todas las especies eran válidas se apoyó bastante la selección en los antecedentes que en la medicina popular tenían determinadas plantas, por eso de las primeras especies recogidas fueron la *Argemone mexicana* L., que se usaba en Africa y en otros lugares del mundo para el tratamiento del cáncer, y la *Gloriosa simplex* L., porque los etíopes usaban sus tubérculos en la curación de la gonorrea.

Esta recolección se llevó a cabo por un equipo especializado durante los años 61 y 62, y de todas las especies enviadas, solamente cuarenta y tres presentaban actividad antitumoral. Es preciso reconocer que las especies más interesantes fueron principalmente aquellas que la medicina popular había sancionado como plantas útiles. Por esta razón en una segunda campaña dirigida por Perdue (29), que recoge un número considerable de especies, la selección de las mismas estará presidida por los datos suministrados por los nativos sobre el empleo que hacían de ellas, recorriendo los mercados donde eran vendidas y recogiendo los datos que regulaban su empleo y los usos a que eran destinadas. Plantas como el *Croton macrostakius* Hosht, *Embelia schimperi* Vatke, *Miristica africana* L. y *Hagenia abisinica* Bruce fueron recolectadas por gozar de virtudes medicinales entre los indígenas. En las encuestas que se llevaron a cabo se conoció que el uso de la *Cardiosperma halicabum* L. estaba muy extendido, empleándola en el tratamiento de tumores; la especie no se pudo recoger en Etiopía dada la pequeña cantidad de ejemplares que se encontraron en las regiones exploradas. Los pocos ejemplares recolectados sirvieron de muestra para enseñarla y poder situar el lugar donde pudiera ser recolectada, y en estas gestiones tropezaron con un Burmés que no solamente la reconoció como una planta muy empleada para curar tumores, sino que aseguró que en Burma era muy abundante y en efecto, allí fue recogida.

Dos auténticas panaceas de la medicina popular africana están constituidas por la *Brucea disenterica* Miell, que fue sugerida por Kabuga en el año 1972 (30), la otra está representada por especies del género *Maytemus*, que fueron encontradas formando parte de mezclas de hierbas que como medicamentos secretos eran vendidos y gozaban de cierto crédito en la curación de diversas afecciones.

En los ensayos primarios realizados con estas dos especies se demostró experimentalmente una actividad antitumoral en sus extractos, los cuales, convenientemente fraccionados, posibilitaron el aislamiento de la *Bruceatina* y *Maytansina*, respectivamente, que representan en la actualidad sustancias de primordial interés como nuevos agentes antitumorales en potencia.

Todos estos casos han sido considerados por Hartwell, quien piensa que no es una nueva coincidencia encontrar especies activas

en las plantas que de una manera popular se les ha reconocido propiedades medicinales o propiedades tóxicas y que esta característica debe ser tomada muy en cuenta a la hora de la selección de las especies a estudiar. Para ello, tomando diferentes textos de Farmacognosia se han confeccionado grandes listas con las especies medicinales o venenosas que citan estas fuentes bibliográficas, practicando una amplia revisión de sus nombres vulgares y latinos con el fin de evitar repeticiones y que figuren en estas listas con los nombres más aceptados en la actualidad.

El equipo de Perdue recogió además muchas especies al azar, sin tener en cuenta los antecedentes; esto ha servido para llegar a conclusiones muy valiosas al acometer este problema de la recolección. Por un lado se ha comprobado que hay familias en las que todos los ejemplares estudiados están desprovistos de actividad y que, por tanto, carecen de interés, mientras que existen familias en las que merece la pena potencializar su estudio; entre otras muchas, citaremos las Apocináceas, Simarubáceas, Rutáceas, Timeláceas, entre las que se encuentran muchos representantes de acusada actividad.

En esta segunda campaña se recolectaron y prepararon extractos correspondientes a 20.525 especies, 4.716 géneros y 317 familias.

Los resultados obtenidos en los ensayos primarios dieron actividad antitumoral en 2.127 especies el 10,4 por 100, que correspondieron a 1.225 géneros el 26 por 100.

Con estos datos se ha comprobado que las especies que se conocen popularmente como activas medicinalmente o que tienen propiedades tóxicas, se han encontrado más que las que no tienen ningún antecedente, lo que ya había dicho Hartwell, que indica que, fundamentalmente, este debe ser el camino a seguir en investigaciones posteriores.

Es muy interesante el auténtico conocimiento de la planta, con la que se llevan a cabo las experiencias para determinar su actividad, y en esto juega un papel destacado los estudios de taxonomía, que son siempre una ayuda impagable para la Farmacognosia.

Los taxonomistas valoran la categoría de los organismos y clasifican éstos por táxones, que se incluyen dentro del sistema genérico, especie, género y familia. No siempre los taxonomistas coinciden con la interpretación de la especie. Un ejemplo puede aclarár-

noslo. Una de las especies recogidas en Etiopía y de la que se obtuvo la maytansina, fue inicialmente clasificada como *Maytemus ovata* (Wall) Loes, apelando a un concepto conservador en que se daba a esta especie un hábitat localizado en la India y Africa; por el interés que presentaba de este género, se hizo una profunda revisión de la flora Zambeciana (31), y el resultado es que la especie de Etiopía se conoce en la actualidad como *Maytemus obscura* A. Rich., considerándose que el *M. ovata* es un endemismo del sur de la India. También se había recogido en Kenia y Tanzania *M. ovata*, especie que después de la revisión se ha diferenciado y se la conoce ahora como *M. bucanani* R. Wilesek, habiéndose comprobado que no sólo existen diferencias morfológicas sino químicas, ya que esta especie es más rica en maitansina.

Algo semejante ocurre con otras plantas. Una especie usada por los indios americanos con el nombre de *Black eyed* (ojos negros), que según Weiner (32) es la *Rudbeckia divergens* Tivi More, cuando según Perdue (38) la especie verdaderamente activa es la *Rudbeckia hirta* L.

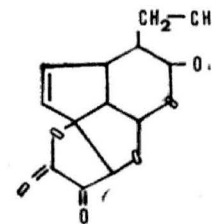
A veces las diferencias afectan a los géneros, lo que produce más confusión. Este es el caso de las especies del género *Ginosporia*. La *Ginosporia obscura* A. Rich, un antimalárico de Africa y *G. senegalensis*, también muy apreciado por sus virtudes medicinales (34), están incluidas en la actualidad en el género *Meytemus*.

Todo ello demuestra la necesidad de la colaboración que los Botánicos taxonomistas proporcionan al Farmacognosta, para evitar confusiones que puedan conducir a resultados difíciles de interpretar y en algunos casos repetir experimentos inútiles.

En otro tiempo este problema de la no autenticidad de las especies era frecuente, pero actualmente son cada vez menos, merced a los estudios monográficos de géneros y floras regionales, los que permiten una completa información sobre la autenticidad de la especie sometida a estudio.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS Y ENSAYOS BIOLÓGICOS

Fácilmente puede deducirse que una experimentación en forma tan masiva como se ha llevado a cabo en la búsqueda de principios antitumorales en las plantas superiores, debe estar apoyada por unos métodos apropiados que tengan la agilidad necesaria para actuar con la rapidez exigida. Por ello hay que prescindir de los clásicos métodos fitoquímicos que exigen mucho tiempo y largas técnicas para llegar al aislamiento al estado de pureza de las distintas estructuras químicas que pueden encontrarse en una planta. Por otra parte, esta investigación fitoquímica suele polarizarse sobre grupos de sustancias que están ya declaradas como activas en el grupo que se estudia, mientras que la actividad antitumoral puede encontrarse en una estructura hasta entonces desconocida, que puede pasar inadvertida. Así ha sido el caso de la *Allamanda cathartica*, planta de la familia de las Apocinaceas. Como es sabido por los antecedentes farmacognósticos de esta familia, sus principios activos son alcaloides indólicos, o heterósidos cardenólidos. Estas bases fitoquímicas no permitieron descubrir sus propiedades antitumorales, pero siguiendo el camino de ensayos biológicos, Kupcan (35) y colaboradores, en el año 1974, han conseguido aislar una lactona con una nueva estructura que presenta «in vivo» una clara actividad antitumoral frente al P 388, al que la dieron el nombre de Almandina y se le ha asignado la estructura siguiente:



De haber seguido el método fitoquímico, hubiera sido imposible alcanzar el ritmo con que se ha actuado, pues en diecinueve años han sido sometidos a ensayo 77.000 extractos obtenidos a partir de espe-

cies de plantas superiores, que en una prueba previa se determina si tiene o no actividad, consiguiéndose así una rápida selección que permite la eliminación de las negativas y extremar toda la experimentación en el fraccionamiento de aquellos extractos cuya actividad antitumoral resulta positiva, para llegar al aislamiento, en estado de pureza, de la sustancia responsable, establecer su estructura y si es posible llegar a su síntesis.

Los extractos primeramente obtenidos, cuya preparación y fraccionamiento consideraremos más tarde, son sometidos a una prueba biológica «in vivo» sobre animales inoculados con un sistema tumoral o «in vitro» observando la acción de los extractos sobre cultivo de células tumorales seleccionadas.

De estos ensayos preliminares, los extractos que manifiestan acción antitumoral en los medios antes citados, son considerados como activos.

En el caso de los ensayos «in vivo» los resultados son expresados en mg/Kg, exigiéndose como mínimo un aumento de vida del 25 por 100 para poderlo considerar como respuesta positiva.

Los ensayos «in vitro» representan la citotoxicidad del extracto frente al cultivo de células tumorales. Las más frecuentemente empleadas son las células 9 K B de la nasofaringe; el dato que se obtiene en este ensayo es la concentración mg/ml, denominándose D. E. 50 la concentración expresada en mg/ml de extracto que produce la reducción en el crecimiento celular de 50 por 100. Un valor de 20 mg/ml (2×10^{-1}) es la concentración que se estima necesaria para considerar la respuesta positiva (36).

Entre las especies activas se incluyen todas aquellas que presentan una significación antitumoral frente a los sistemas de ensayo utilizados. Entre ellos se encuentran el adenocarcinoma 755, sarcoma 180 y carcinoma de Walker 256.

En los ensayos primarios, estos sistemas no son empleados de forma masiva por presentar el inconveniente de no ser lo suficientemente selectivos para aclarar la actividad clínica, que estos sistemas son también sensibles a algunos tipos de sustancias que con frecuencia forman parte del equipo químico de los vegetales, como son los taninos, fitosteroles, saponinas, etc., y que están muy lejos de poseer propiedades antitumorales, sobre todo los taninos que están, por

el contrario, considerados como sustancias cancerígenas o tóxicas de bajo poder terapéutico. Esto ha influido para que a partir del año 1972 se utilicen como complementos de las pruebas de actividad, el sistema leucémico P 388 y L 1210, que clasifican considerablemente el ensayo, pues las sustancias antes mencionadas no son activas a estos sistemas (37).

En las pruebas con estos dos sistemas se obtuvieron, en 12.000 extractos ensayados, pocos casos activos frente al sistema L 1210, mientras que frente al P 388 fue confirmada en 361 casos, es decir el 3 por 100, que representa una cifra bastante importante. En los fraccionamientos que posteriormente se realizaron con los 361 extractos activos, se ha podido comprobar que 28 tuvieron respuesta positiva frente al L 1210, razón más que suficiente para que ahora, los ensayos primarios se realicen sólo probando su actividad frente al sistema P 388. El ensayo correlativo «in vitro» se realiza fundamentalmente con células 9 K B.

Los ensayos practicados últimamente por este método se elevan a 41.047, extractos entre los cuales han confirmado su actividad 632, es decir, el 1,53 por 100.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

La técnica de preparación de los extractos ha sido motivo de un detenido y comparado estudio. En el período 1957-1961 (38), los extractos fueron preparados en la Universidad de Wisconsin, la de Arizona y la industria farmacéutica Chas Pfizer and Company.

El primer proceso de extracción se debe al Dr. Kopacca Rao de Pfizer, quien era un especialista en plantas medicinales.

En resumen el método consiste en macerar el polvo de la planta, convenientemente desecado, con metanol, se señala la proporción de 10 a 12 litros por kilo de planta. Terminada la maceración con agitación, se separa el líquido extractivo por filtración y se concentra con las debidas precauciones a 1/20 del volumen inicial. Se obtiene así un líquido siruposo de color verde que se extrae con éter de petróleo y posteriormente con agua. Tres fracciones son obtenidas: la insoluble, la soluble en éter de petróleo y la soluble en agua, las

cuales son posteriormente sometidas a ensayo biológico, empleando ratas con el carcinoma Walter 256 inoculado. En los muchos extractos ensayados se confirma actividad en 44 en la porción acuosa, 13 en la porción etérea y 22 en la fracción insoluble.

Jack Cole es quien dirige la extracción en la Universidad de Arizona, utilizando el siguiente procedimiento: el polvo de la planta es agotado con una mezcla de cloroformo-alcohol agitando durante veinticuatro horas, después de reposo filtra, evapora a la temperatura del laboratorio en vitrina de gases. Otra cantidad igual se agota con agua y obtiene un extracto por liofilización. Se estudian por este método 4.500 extractos.

En Wisconsin, Morris Kupehar propone en el año 1958 un método, también de doble extracción, que es aplicado durante todo su programa entre 1958 y 1961. Consiste en una maceración acuosa, a temperatura ordinaria, con agitación constante. Una vez separada el agua, el marco es agotado en Soxhlet con alcohol de 90°. En los dos casos se eliminan los disolventes a presión reducida y a una temperatura aproximadamente de 40°.

Es aplicado este método a más de 9.000 especies y aproximadamente el 10 por 100 resultaron activas frente al carcinoma Walker 256 y frente a célula 9 K B tomadas originalmente de un carcinoma epidérmico de nasofaringe humano.

Al reconsiderar este método de extracción se llegó a la conclusión de que se conseguiría el mismo espectro de sustancias activas empleando un solo disolvente, que estuviera formado por la mezcla al 50 por 100 de etanol agua. Realmente valía la pena comprobar de esta manera, pues con una sólo extracción se puede aumentar de forma considerable la capacidad de ensayo.

Se realizaron, por este método, pruebas en especies que habían sido ensayadas con anterioridad y se pudo confirmar experimentalmente la hipótesis, de forma que en el año 1964 este es el procedimiento generalmente aceptado. A finales de este año, 1.254 plantas habían sido manipuladas, de las cuales 9 por 100 habían mostrado su actividad frente al Walker 256.

El método es, ciertamente, muy ventajoso al extraer un gran número de las sustancias alojadas en la planta empleando un solo disolvente, lo que conduce a ser sólo un producto el que debe ser sometido

a ensayo biológico, por otra parte, el producto extraído es un extracto sólido que puede conservarse pulverizado para ser empleado en el momento oportuno.

En el año 1972-1973 se pudieron ensayar por este método 175 plantas por semana.

Hartwell ensaya un procedimiento de extracción y fraccionamiento a la vez, partiendo de dos porciones de planta iguales, agotando la primera con etanol de 95° en caliente y otra con etanol agua al 50 por 100. En ambos casos se separan los líquidos extractivos y se concentran a presión reducida. Se obtienen así dos extractos secos al etanólico y el etanólico acuoso.

Del primero se separa una pequeña fracción para someterla a ensayo biológico, tendremos así una prueba A. La otra parte se extrae con cloroformo agua 1-1, separándose tras reposo dos partes, la clorofórmica y la acuosa, que son posteriormente concentradas, la primera a presión reducida, la segunda por liofilización. De esta última se obtiene un extracto seco que constituirá el ensayo biológico B, mientras que el extracto clorofórmico se extrae de nuevo con exano y etanol agua 90-10 saturado con exano. Se separa la fracción del exano cuyo extracto proporcionaría el ensayo C y por otro lado el metanol agua y su extracto serviría para el ensayo D.

Este procedimiento fue empleado en el experimento denominado de las 500 plantas, en el cual se tomaron un total de 504 plantas seleccionadas al azar por el laboratorio de recursos de plantas medicinales, en las que fue actualizado el ensayo de su actividad antitumoral siguiendo el método de Hartwell y comparando éstos con los obtenidos por un solo disolvente.

Los extractos obtenidos en este programa se terminaron a finales de 1974 y en mayo de 1975 se obtienen todos los resultados, que demuestran que el 21,4 por 100 de las plantas ensayadas tienen actividad antitumoral frente al P 388, mientras que sólo 0,8 por 100 se mostraron activas, empleando el método de un solo disolvente (etanol agua 50 por 100).

En el correspondiente ensayo «in vitro» frente al 9 K B hay cierta similitud, si bien la diferencia no es tan espectacular; se muestran activas por el procedimiento de Hartwell el 5,4 por 100 y sólo el 2,4 por 100 con el metanol agua.

En cuanto al reparto de las sustancias activas en las diferentes fracciones, pudo comprobarse que la mayor parte de los principios activos pasan en el metanol, menos en la fracción clorofórmica, prácticamente ninguno en el agua y nada en el exano.

Con estos datos se modifica el método de Hartwell, haciendo una primera extracción del polvo de la plata con éter de petróleo en Soxhlet durante ocho o diez horas para eliminar la grasa que puede producir interferencias en el resto de la operación. El polvo desengrasado se agota con metanol de 95 por 100 en soxhlet durante catorce horas y el líquido metanólico extractivo se concentra a vacío hasta obtener un extracto seco. Una pequeña parte se separa y servirá para hacer el ensayo biológico A.

El resto se extrae con cloroformo agua 1-1, después de la separación se elimina la fracción acuosa por haber comprobado que no pasan principios activos y la clorofórmica se lleva a extracto seco y constituirá la base del ensayo B.

AISLAMIENTO DE PRINCIPIOS

Siguiendo los métodos de extracción sucintamente expuestos y sometiendo los extractos a las pruebas biológicas reseñadas, se consigue una rápida selección de aquellas especies que por haber mostrado una significativa acción antitumoral, deben ser sometidos sus extractos a un completo procedimiento de fraccionamiento al que se suman las modernas técnicas de separación cromatográficas que nos van a permitir llegar al aislamiento de los principios responsables de la acción, en estado de pureza, y establecer la estructura de su molécula y, en ocasiones, conseguir su síntesis y la de algunos derivados que conservando sus principales propiedades, pierden alguno de los efectos colaterales, no deseables que pueden presentar las sustancias iniciales.

Hasta el momento han sido infinidad las especies de vegetales superiores que han sido sometidos a estudio, entre ellas hay un número bastante considerable en las que se ha encontrado actividad antitumoral, al menos en el orden experimental. De entre todas ellas hemos entresacado las más estudiadas, las que han proporcionado moléculas

puras bien conocidas y es a éstas, como muestra de lo que se lleva conseguido en este campo de la investigación, a las que nos vamos a referir a continuación, reuniendo estos principios en dos grupos:

- 1.º Sustancias de actividad antitumoral de naturaleza alcaloídica.
- 2.º Sustancias no alcaloídicas con esta acción.

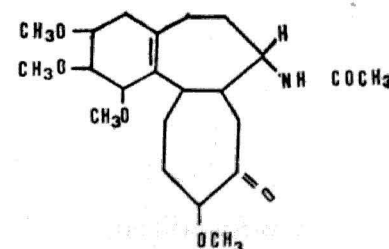
Alcaloides de acción antitumoral

Anteriormente hemos visto que el campo de investigación en la búsqueda de posibles sustancias antitumorales de naturaleza alcaloídica, toma fuerza con el aislamiento y conocimiento de la actividad de los alcaloides de las vincas. Son desde entonces muchas las sustancias alcaloídicas con acción antitumoral demostrada, que han sido aisladas, establecida su estructura química, sintetizadas algunas e incluso modificadas buscando un mayor rendimiento terapéutico, bien al aumentar la actividad, bien al disminuir su toxicidad, lo que se traduce en un aumento del índice terapéutico.

Vamos a pasar revista a estos alcaloides siguiendo un orden estructural más que cronológico.

I) *Alcaloides con el nitrógeno extracíclico*

Encontramos en este grupo la Colchicina. El Cólchico ha sido una planta muy encomiada en la medicina popular contra los tumores, entre los años 1934 y 1939 se estudió científicamente este problema y, en efecto, se descubrió que los extractos de la planta gozaban de una propiedad citostática y que ésta era debida a la Colchicina.

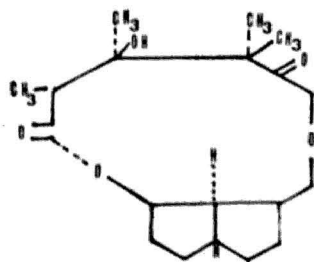


El conocimiento de la actividad de la Colchicina llenó de esperanza a muchos médicos, esperanza que no duró mucho al comprobar que el producto era muy tóxico a las dosis que eran precisas para conseguir la acción citostática. De todas maneras la idea del empleo de esta estructura alcaloídica no ha sido del todo abandonada, todos recordamos que la famosa cura del italiano Dr. Bari, que hace ahora diez años llenaba muchas páginas de la prensa, no eran más que vinagre de colchico. Hoy se piensa que esta estructura puede ser útil, pues algunos derivados de ella, como la democolchicina, que está presente en algunas variedades de colchico, parece ser una sustancia bastante prometedora en el tratamiento de la leucemia mielocítica.

II) Alcaloides derivados de la pirrolicidina

En este grupo se encuentra la monocrotalina, que ha sido aislada de extractos con acción antitumoral obtenidos de especies de *Senecio* y *Crotalis*, que tienen, por otra parte, una acción hepatotóxica bien probada.

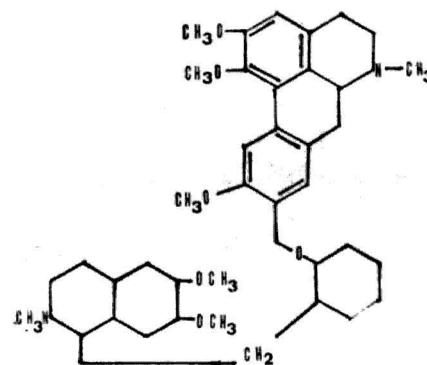
En los extractos de estas plantas, principalmente de los obtenidos de la *Crotalaria spectabilis* y de la *C. assamica*. Anon en 1974 aisló la monocrotalina (39) por fraccionamiento de los extractos iniciales y comprobó, posteriormente, que este alcaloide es la sustancia responsable de la acción antitumoral que dichos extractos presentan. La estructura de este alcaloide ha sido establecida; es un derivado de la pirrolicidina:



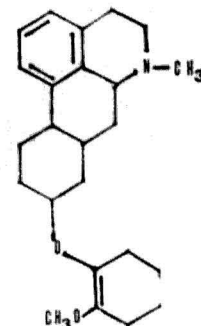
MONOCROTALINA

III) Alcaloides derivados de la isoquinoleína

Es posible que las primeras investigaciones llevadas a cabo por Kupchan y colaboradores en la Universidad de Wisconsin condujeran al aislamiento de la *Ruta purpurea* (40) de un alcaloide, la Talicarpina, con estructura aporfinoisoquinoleica, en el que pudo apreciarse una acción hipotensora, posteriormente, en el año 1966 Dutchewska lo obtiene del *Talictrum minus* subespecie *elatum* (41). Se trata de una sustancia de un gran interés por ser un poderoso agente antileucémico.



TALICARPINA



HERNANDALINA

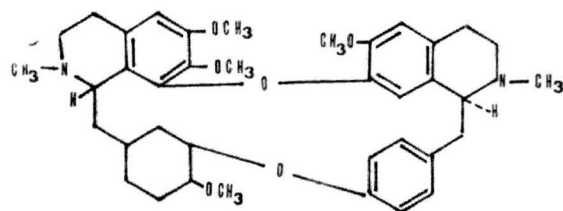
Y además porque Kupchan y Liepa (1974 y 1975) han descrito algunos métodos de síntesis para llegar a este alcaloide, siendo el más eficaz el que practican partiendo de la hermandalina, que es un alcaloide obtenido de la *Esthania hernadifolia* Wolf, originaria de la India.

La Talicarpina es un alcaloide tóxico; si se fuerza la dosis y se realiza una rápida administración de esta sustancia, se produce una fuerte hipertensión, acusada bradicardia e inhibición respiratoria (42), Todorov, 1975.

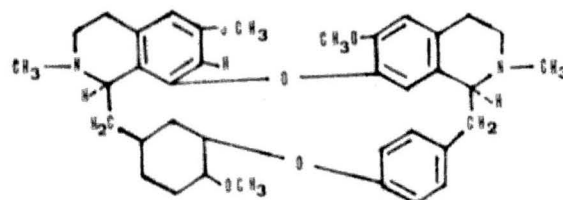
En cuanto a su acción antitumoral, se han realizado pruebas «in vivo» frente a los sarcomas de Yoshida y Leusen, así como frente al carcinoma de Walker 256 que fueron positivas; en cambio es

completamente inactiva frente al sarcoma 37 y al carcinoma de Guerin (43).

Una menispermacia, la *Cyclea peltata*, ha producido unos extractos de actividad antitumoral. Fraccionado estos extractos han permitido aislar un alcaloide que se le ha denominado tetrandina (44); la tetrandina, como puede observarse en su estructura, es un dímero de la Bencilisoquinoleína, que ha sido aislado al fraccionar los extractos de la planta citada. Tiene una marcada acción antitumoral contra el crecimiento de los tumores Walker 256 en ratones. Es de señalar que otros alcaloides con actual uso terapéutico y con estructura derivada de la bencil isoquinoleína tienen, también en este momento comprobada, una acción antitumoral. En este caso se encuentran la *l* curina, la *d* isochondaodendrina y la fangchinoleína.

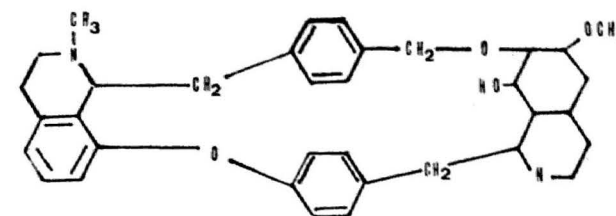


Siendo este último el de estructuras más parecida; las otras no las damos por ser de todos conocidas.



Otro alcaloide de este tipo ha sido aislado del *Cissapeltus pareira* L., planta que habita en Africa, Asia y América. Se trata de la Cissampareina (45), es el primer alcaloide dimérico de la bencil isoquinoleína que se caracteriza por tener una unidad de para xileno

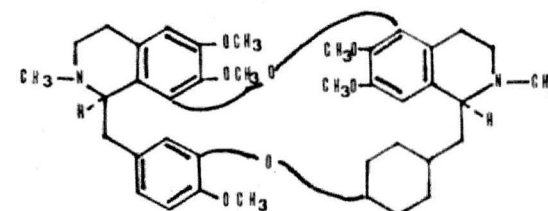
sustituido y una estructura simétrica que contiene la 3-4 dihidro isoquinoleína.



Es este un alcaloide de extracción fácil; pasa muy bien al solvente cuando se agota la planta con metanol, se elimina éste a presión reducida y el residuo se trata con ácido clorhídrico diluido. El líquido ácido se concentra, se alcaliniza y se obtiene un precipitado que es el alcaloide, el cual se recoge y se cristaliza en benceno.

La estructura se ha establecido por medios químicos y fisicoquímicos, habiendo sido posible situar un grupo N-CH₃ y un grupo fenólico metilable para originar la oximetilcissampareína.

Del *Thalictrum dasycarpum*, Kupchan y colaboradores (46) obtuvieron en el año 1967 otro alcaloide dimérico de la bencil isoquinoleína con actividad antitumoral, la Thalidasina.



Este alcaloide tiene un enlace éter difenílico en posición 5 de un grupo bencil tetrahidroisoquinoleína y es el primero en presentar una estructura asimétrica en un anillo de 20 átomos de C.

La actividad «in vivo» e «in vitro» de estos alcaloides ha sido determinada frente al carcinoma de Walker 256 «in vivo» y frente al K B «in vitro», habiéndose obtenido los siguientes resultados:

Alcaloide	car Walker 256	D. E. 50 car 9 KB
Cissampareina	—	2,5 mg/ml
Icurina	—	1,5 mg/ml
d isochondrodendrina	—	1,6 mg/ml
Fanchinoleina	—	0,5 mg/ml
Tetrandina	—	0 mg/ml
Thalidasina	200 mg/Kg	

Los datos facilitados en el cuadro anterior por Danieli son los valores medios obtenidos en un estudio no muy completo, por lo que él mismo señala que son sólo parcialmente comparables, aunque lo que se puede ver en seguida es que la citotoxicidad, cuando se practican ensayos de cultivo de tejidos «in vitro», es alcanzada con dosis relativamente pequeñas, mientras que su acción «in vivo» sobre animales con tumores implantados, sólo se alcanzan con dosis exageradamente elevadas y en algunos casos la DL está próxima a la dosis eficaz.

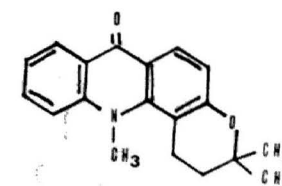
IV) Derivados quinoleicos

Hace tiempo que se conocían dos alcaloides, Acronicina y Elip-ticina, pero ha sido Svoboda quien descubrió sus propiedades anti-tumorales.

Es un alcaloide bastante difundido en distintas especies del gé-ne-ro acronychia, de la familia de las rutáceas, una de las cuales, la *Acronychia baneri* Schott fue estudiada por Svoboda, descubriendo en su extracto una significativa actividad antitumoral, que fue atri-buida, después del fraccionamiento del extracto al alcaloide acroni-cina, en el que se ha encontrado, hasta ahora, uno de los más am-plios espectros de actividad, como se deduce de las pruebas reali-zadas. Se ha mostrado eficaz contra 12 de los 17 neoplasmas provo-cados según Svoboda (47) y es activa de una manera singular a dosis de 28 mg/Kg contra la leucemia mielogena C 1498, hecho por de-más interesante, ya que ningún agente químico, hasta su descubri-miento, había mostrado actividad frente a este tipo de leucemia.

Por otra parte se han realizado pruebas con animales implanta-dos de sistemas tumorales parangonables con los del género humano como son: el mieloma X 5563 de las células del plasma y el carci-noma Sionogi 115, que puede ser considerado como el tumor mo-delado para el estudio del cáncer de próstata en el hombre, habiéndose encontrado actividad a dosis de 30 y 36 mg/Kg respectivamente.

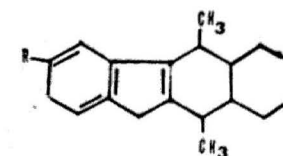
El estudio estructural de la acronicina ha sido bastante polémico, pero mediante medios químicos, fisico-químicos y finalmente la rea-lización de la síntesis se puede asegurar que su constitución es la siguiente:



V) Alcaloides indólicos monoméricos

La Ellipticina y su análogo la metoxiellipticina son reconocidos como responsables de la actividad de los extractos de algunas espe-cies del género *Ocrosia* perteneciente a la familia de las Apocina-ceas y muy próximo a la *Rawolfia* y el *Aspidosperma*, que está bas-tante difundido por las islas del Pacífico en Australia.

Es, como la de las Apocinaceas parecidas, un alcaloide indólico cuya estructura ha sido confirmada después de realizar su síntesis a partir del indol condensándolo con la 3 acetil piridina en presencia de ácido acético y cloruro de zinc.

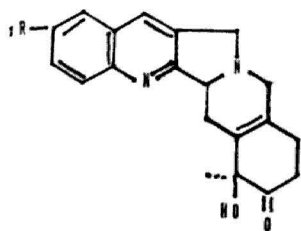


R = H = ELLIPTICINA

R = OCH₃ = METOXIELLPTICINA

De la *Camptotheca acuminata* Decne, de la familia de las nisáceas, originaria de China y de cuyos extractos se había obtenido una notable actividad contra el carcinoma 755, fue aislada por Wall, de sus cortezas, un alcaloide, la Camptotencina, de relevante actividad antitumoral y otros dos alcaloides que si bien son activos se encuentran en mucha menor proporción, son: la hidroxycamptotencina y la metoxycamptotencina.

Son alcaloides indólicos cuya constitución se ha puesto de manifiesto por medios químicos y fisicoquímicos, siendo estos últimos los que han permitido su total conocimiento.



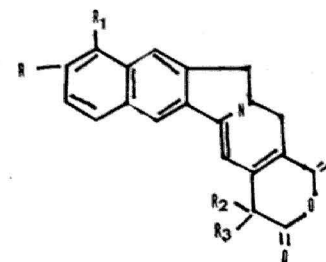
R = H = CAMPTOTENCINA
R = OH = HIDROXICAMPTOTENCINA
R = OCH₃ = METOXICAMPTOTENCINA

Como puede observarse, estos alcaloides tienen una estructura que hasta ahora nunca se había encontrado en la naturaleza. Se trata de una sustancia que tiene una potente actividad antitumoral, pudiendo señalar que la Camptotencina, que es del único que se han realizado pruebas en este sentido, se sabe que la presenta contra la leucemia L 1210 en ratas, habiéndose producido una prolongación de la vida de casi el 100 por 100 por administración de una dosis diaria de 0,25 a 1,0 mg/Kg.

También presenta su actividad contra diferentes tumores, entre ellos el Walker 256 en ratas donde ha producido una muy clara inhibición en el crecimiento a dosis de 1,25 mg/Kg y en el cultivo de células 9 K B la D E 50 tiene un valor de 0,07 mg/ml en los ensayos «in vitro».

Wani y Wall han aislado de la 10 hidroxycamptotencina y la 10 metoxycamptotencina como compuestos menores de la *Camptothe-*

cia acuminata Decne (48) y Govindachari (49) obtuvo la metoxycamptotencina de la *Mappia foetida* Miers.



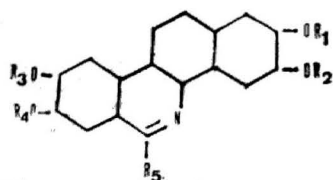
R = OH; R₁ = H; R₂ = C₂H₅; R₃ = OH = 10 HIDROXICAMPTOTENCINA
R = OCH₃; R₁ = H; R₂ = C₂H₅; R₃ = OH = 10 METOXICAMPTOTENCINA
R = H; R₁ = OCH₃; R₂ = C₂H₅; R₃ = OH = 9 METOXICAMPTOTENCINA

Todas estas sustancias son altamente activas, pues prolongan considerablemente la vida a los ratones inoculados con sistemas leucémicos. Wall (50) ha demostrado que en estos alcaloides, son necesarios el grupo lactónico y el oxihidrilo de la posición 20, para que tengan actividad antileucémica.

El aislamiento de la Camptotencina es bastante fácil dadas sus propiedades de solubilidad. El extracto etanólico de la planta se reparte entre cloroformo y agua. Se separa la parte clorofórmica eliminando a continuación el disolvente; el residuo se disuelve en metanol, menos una parte que, casi toda, está constituido por el alcaloide, el cual se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice y se obtiene la Camptotencina como un sólido amarillo que cristaliza en metanol acetonitrilo. Lo que resulta más difícil es recoger la *Camptotheca acuminata* en la cantidad suficiente, pues es una especie bastante escasa, por lo que se ha dispuesto de cantidad suficiente para los ensayos preliminares, pero no la necesaria para realizar su estudio de las propiedades farmacodinámicas generales. Se resolverá este problema si se consigue la síntesis que hasta ahora ha tropezado con serias dificultades.

VI) *Alcaloides derivados de la Benzofenantridina*

La Nitidina al estado de clorhidrato fue el primer alcaloide de este tipo que fue aislado de una Rutácea de Hong Kong, la *Anthoxylum nitidum* (51) y más recientemente de la *Fagara macrophylla* (52).



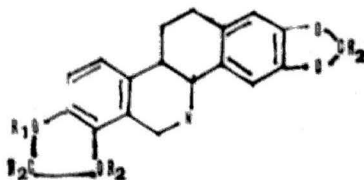
NITIDINA = $R_1 + R_2 = CH_2$; $R_3 = R_4 = CH_3$; $R_5 = 4$

FAGORINA = $R_1 = H$; $R_2 = R_3 = R_4 = CH_3$; $R_5 = 4$

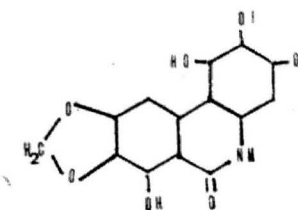
METOXINITIDINA = $R_1 = R_2 = CH_2$; $R_3 = R_4 = CH_3$; $R_5 = OCH_3$

En la obtención de la Nitidina se produce un producto secundario, un artefacto no preformado en la planta que es la metoxi 6 nitidina, ambos alcaloides son altamente activos frente a la leucemia P 388 y el segundo presenta también actividad frente a la leucemia L 1210. La Fagorina, como puede verse, es una sustancia muy parecida a la Nitidina y como ella se comporta con una acusada actividad antitumoral.

En este mismo tipo podemos incluir la sanguinarina, alcaloide de la Sanguinaria, a la que se le había atribuido la acción que en esta planta se sospecha como antitumoral. En las experiencias realizadas por Hartwell, en efecto las sales de este alcaloide tienen acción citotóxica, pero están desprovistas de actividad «in vivo» frente a los sistemas de tumores ensayados.

VII) *De la Fenantridina se deriva la Narciclasina (53)*

Es este un alcaloide aislado de numerosas variedades del género *Narcissus*, entre los que se encuentran, entre otros, el *N. taceta* L., *N. incomparabilis* Mill., *N. pseudonarcissus* L., *N. triandus* L., en el año 1968. Es un alcaloide fenantridínico con tres grupos fenoles, un cetónico y un oximetileno.



FENATRIDINA

Este alcaloide presenta una notable actividad antitumoral frente a los sistemas ensayados.

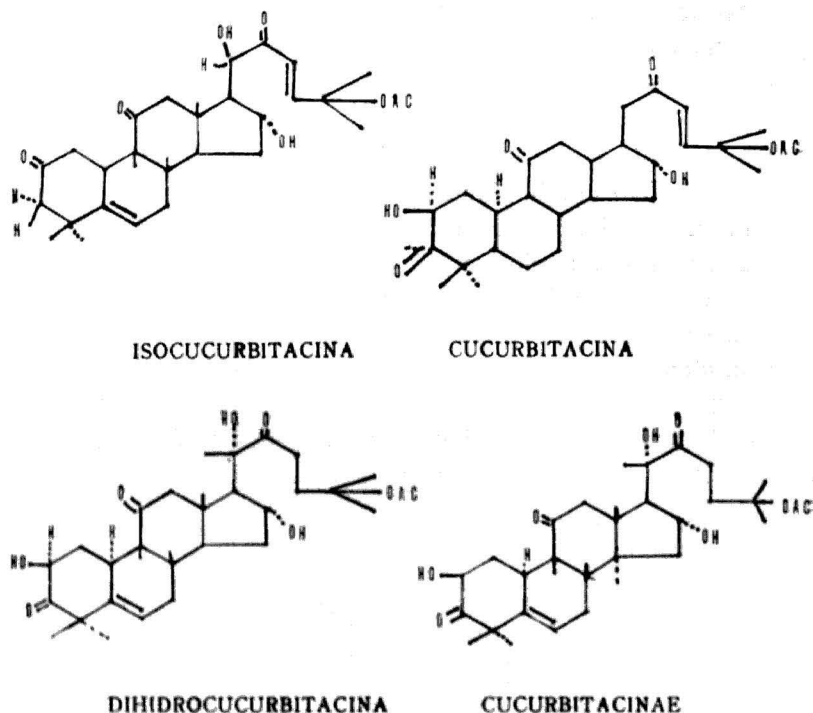
VIII) *Alcaloides con otros tipos de estructura*

Otro extracto que presenta una actividad inhibidora «in vitro» contra el carcinoma humano de la nasofaringe (KB) es el obtenido del *Solanum tripartitum* Dunal. Del fraccionamiento de dicho extracto se ha obtenido una sustancia de naturaleza alcaloídica en apariencia homogénea que se ha denominado Solapartina. De este alcaloide ha sido estudiada su estructura por medios físico-químicos y se ha visto mediante el espectro de infrarrojo una banda de carbonilo y de un doble enlace. El espectro de resonancia nuclear magnética es más complejo y permite reconocer un sistema $N-CO-CH-CH-CH_2$ y de los grupos $CH=$, CH_2-N-CO , R , $N-CH$, y numerosos metilenos y metilos.

La reducción catalítica de la Solapartina produce la hidrosolapartina con absorción de 1,3 equivalentes de H.

Antitumorales no alcaloídicos

Existen muchos extractos de plantas superiores con notable actividad antitumoral que en su fraccionamiento no han sido encontrados alcaloides, pero sí otras sustancias que justifican su acción. Algunas de estas sustancias tienen una estructura desconocida hasta el momento, otras por el contrario eran conocidas, pero se desconocían como sustancias activas y finalmente algunas que estando en uso como agentes terapéuticos, se desconocían sus propiedades antitumorales. En este caso se encuentran la cucurbitacina, los heterósidos cardenólidos y bufanólidos y las saponinas triterpénicas.



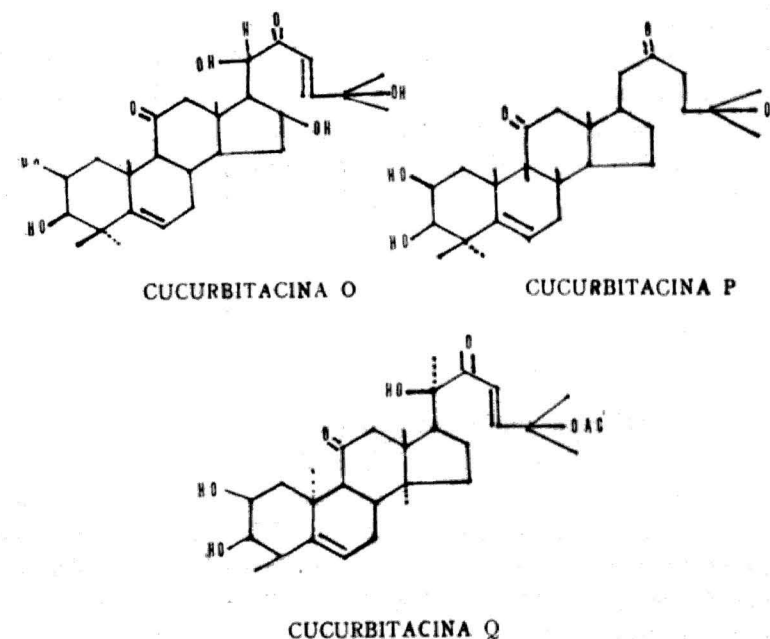
El extracto de la raíz del *Marah oreganus* Howell, de California, presenta una fuerte acción citotóxica «in vitro» contra el cultivo de células KB del carcinoma de la nasofaringe. El fraccionamiento de

este extracto ha conducido al aislamiento de cuatro cucurbitacinas responsables de esta acción citotóxica: Isocucurbitacina I, Cucurbitacina II, Dihidrocucurbitacina III y la Cucurbitacina IV.

La actividad «in vitro» de estas sustancias es excepcional y los valores dados para la D. E. 50 son para el compuesto núm. I $4,0 \cdot 10^{-1}$ mg/ml, para el II $2,5 \cdot 10^{-6}$ mg/ml, el III $1,7 \cdot 10^{-3}$ mg/ml y para el IV $4,6 \cdot 10^{-5}$ mg/ml (55).

Por su mayor actividad los compuestos cucurbitacina II y cucurbitacina IV, han sido experimentados «in vitro» en rata contra el carcinoma Walker 256, pero a pesar de su excepcional actividad ambos han mostrado un índice terapéutico muy restringido, es decir, la diferencia entre la dosis tóxica 3,2-10 mg/Kg (respectivamente) y la dosis activa 0,8 y 2,5 mg/Kg (respectivamente) es demasiado pequeña para que puedan ser consideradas como agentes terapéuticos prometedores.

Otras cucurbitacinas con acción citotóxica han sido aisladas de los extractos de la *Brandega bigelovii* Cong. (56) son la cucurbitacina O, F y Q.

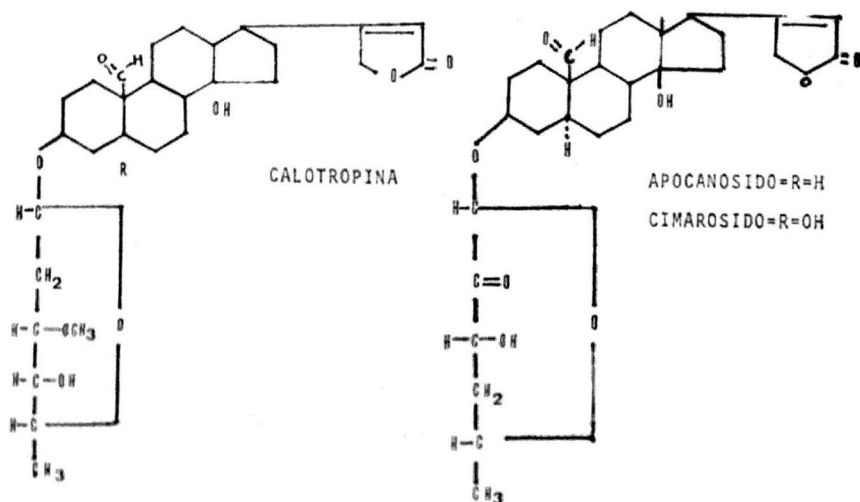


La diferencia de estas cucurbitacinas en cuanto a la característica estructural es la de poseer un hidróxilo en los carbonos 2 y 3, mientras que las anteriores tienen un grupo cetónico o un hidróxilo en el carbono 3.

En lo que no hay diferencia es en su comportamiento biológico, pues si bien es cierto que su actividad «in vitro» frente a las células KB es grande, no es menos cierto que su toxicidad es tan alta que no puede pensarse en ser empleadas en terapéutica.

Cardenólidos

Las investigaciones con la *Asclepias eurosavica* L. *asclepiadacea* de las costas de Méjico y Costa Rica, planta muy utilizada en la medicina popular y conocida en estos lugares con el nombre de Can-

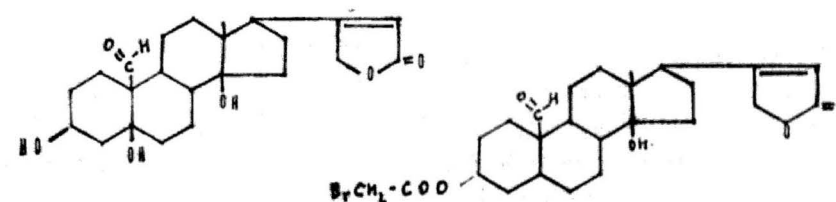


cerillo, por emplearse desde antiguo para curar el condiloma y las verrugas ha conducido a descubrir actividad biológica «in vitro» contra las células KB de un extracto alcohólico, en el cual, después de su fraccionamiento, se ha conseguido aislar la Calotropina (57). Al investigar la naturaleza de esta sustancia se ha comprobado que se trata de un heterósido del tipo de los digitálicos, tan conocidos desde antiguo por su bien comprobada acción cardiotónica.

Es un heterósido cardenólico, que tiene, por tanto, un núcleo pentano fenantreno con una función lactónica pentagonal con un doble enlace en el carbono 17, en el 10 un grupo aldehídico y tres oxhidrilos en posición 3-12-14, uniéndose por el tres a un azúcar de seis átomos de carbono, la 4 deoxi 2 ceto metil aldo pentosa.

La actividad antitumoral de la Calotropina es muy parecida a la de otros glucósidos que son usados como tónicos cardíacos, el apocinósido y el cimarósido aislados del *Apocimum camnabinum* L. (58), una planta originaria de la India, donde recibe el nombre de «Dog lane». Ambos heteróxidos tienen la misma porción azucarada constituida por la 2 deoxi 3 metoxi aldo metil pentosa; difiere en el aglucón por su sustituyente en el carbono 6, pues mientras el apocanósido tiene un H el cimarósido tiene un grupo OH.

Su actividad, en el caso de los heteróxidos, es notablemente alta. En el caso del apocanósido «in vitro» se muestra eficaz a dosis de 0,062 mg/ml, siendo la dosis eficaz para el cimarósido de 0,021 mg/ml. En estudios posteriores se ha podido comprobar que la actividad reside en la genina y que la parte azucarada no influye en la misma, puesto que la estrofantogenina es también activa y esta actividad es efectiva a dosis de 0,24 mg/ml. Por otra parte, experiencias con distintos tipos de estas geninas han demostrado que para que presenten actividad citotóxica, es preciso la presencia del grupo lactónico insaturado, el grupo aldehído en el carbono 10 y los hidróxilos 5 y 14. La esterificación de hidróxilo de carbono 3 por el ácido Brono o Iodo acético hace aumentar la actividad.

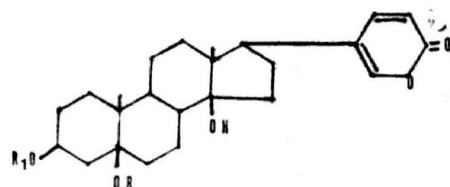


Por otra parte, además de la actividad cardiotónica y antitumoral, este tipo de heterósidos inhiben, «in vitro», específicamente la Adenosintrifostasa, y este hecho puede explicar la acción antitumoral de los mismos. En efecto, se conoce que el transporte activo de muchos

aminoácidos es inhibido por los cardenólidos, probablemente a través de una relación entre el transporte de aminoácidos y el del ión Na. Como las células tumorales pueden ser muy activas en la acumulación de aminoácidos para su anormal crecimiento, es posible que la inhibición de este crecimiento por parte de los cardenólidos sea debida a impedir, por el mecanismo mencionado, el acúmulo de aminoácidos.

Bufoenólidos

En su prueba biológica ha mostrado actividad antitumoral el extracto etanólico bruto de la *Bersama abisinica* Fresen *Meliastaceae* recogida en Abisinia. El fraccionamiento de dicho extracto ha conducido al aislamiento y caracterización de dos potentes principios citotóxicos frente al cultivo de células KB. Estos principios son la 3 acetil Helebrigenina y la 3-5 diacetil Helebrigenina (54), los dos acetatos, son los primeros ésteres naturales de un bufaenólido.



$R_1 = R_2 = H$ = Helebrigenina
 $R_1 = CH_3CO$ $R_2 = H$ = Acetilhelebrigenina
 $R_1 = R_2 = CH_3CO$ = Diacetilhelebrigenina

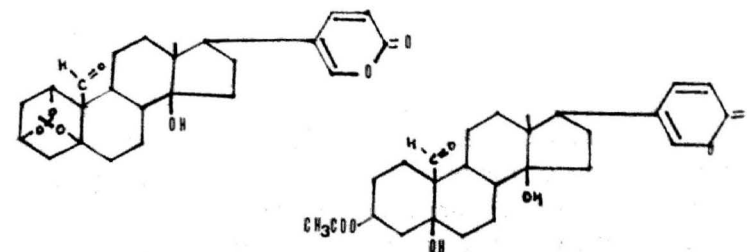
La actividad «in vitro» para la acetilhelebrigenina se alcanza a dosis de 10^{-2} mg/ml y para la dicetil helebrigenina se alcanza a la 10^{-3} mg/ml. El segundo presenta actividad en el carcinoma intramuscular Walker 256 en ratas a dosis de 8 mg/Kg, por tanto la 3-5 diacetilhelebrigenina es el primer esteroide cardiotónico que presenta una inhibición significativa y reproducible en un sistema tumoral «in vivo».

Como el comportamiento del extracto y los principios aislados de la *Bersama abyssinica* Fresen era francamente prometedor, se continuó su estudio y en una posterior investigación se ha conseguido el aislamiento de dos nuevos productos, la Bersaldegina 1-3-5 orto-

acetato, que es el primer ortoacetato que hasta ahora se ha obtenido de la naturaleza y la Bersaldegina 3-acetato.

El ortoacetato es activo «in vitro» a dosis de $7 \cdot 10^{-2}$ mg/ml, mientras que el acetato es mucho más eficaz $3,6 \cdot 10^{-5}$ mg/ml.

La constitución química de estas sustancias está perfectamente determinada, son efectivamente bufaenólidos con grupo aldehído en el C10, y OH en el C14 o el 5-14, según el caso, uno solo en 14 cuando es el ortoacetato y 5 y 14 cuando es el 3 acetato.



BERSALDEGENINA 1-3-5
Ortoacetato

BERSALDEGENINA
3-Acetato

Saponinas triterpénicas

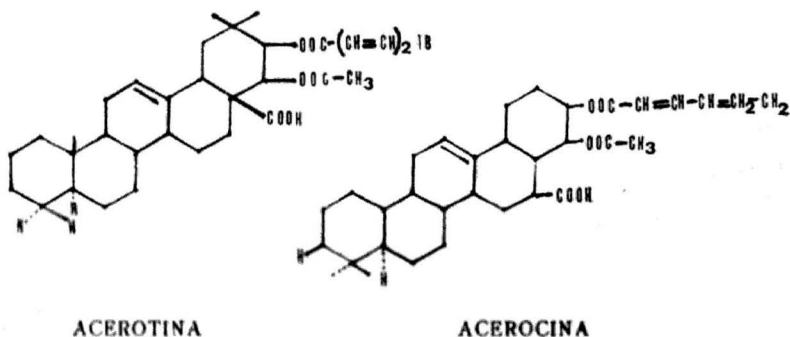
Otra planta recogida en la campaña de Etiopía, y que sus extractos tienen actividad, es la *Mirsina africana* L. De su extracto metanólico fraccionado se ha aislado una sustancia de naturaleza saponínica a la que se le ha dado el nombre de Mirsineasaponina, en la que se ha encontrado actividad frente al carcinoma de Walker 256 en ratones a dosis de 4,5 mg/Kg (60).

Como heteróxidos que son las saponinas, fue sometida a la correspondiente hidrólisis ácida, mediante la cual se separaron dos fracciones, una soluble en cloroformo, la otra en agua. La soluble en cloroformo, fue caracterizada como un triterpeno y comparada con un patrón purísimo de estructura conocida (61) se ha caracterizado como la Primulagenina A.

En la parte soluble en agua se han caracterizado los azúcares por cromatografía, estando presentes la glucosa, galactosa, rhamnosa y ácido glucurónico y como ya era conocida (62) una saponina de estas

características, la Primulasaponina, que por hidrólisis produce el mismo aglucón y una cadena azucarada constituida por los mismos azúcares en proporción 1-1-1-1, en principio se pensó que ambas saponinas eran iguales. La cromatografía de gas puso de manifiesto que existía una diferencia en la cadena azucarada, donde la relación molecular de glucosa, rhamnosa, galactosa, ácido glucurónico es de 1-2-1-1 en la Mirsineasaponina.

El *Acer negundo* L. recolectado en Wisconsin (63) da un extracto activo, del cual se ha aislado una saponina que es activa contra el sarcoma 180 a dosis de 2,5 mg/Kg y contra el carcinoma de Walker 256 en la de 2,2 mg/Kg. Esta saponina presenta un grupo carboxilo libre y es aparentemente unitaria en su estudio por cromatografía en capa delgada, pero en su hidrólisis se produce además de glucosa y arabinosa, una mezcla de geninas de las cuales, sólo las que se encuentran en mayor proporción han podido ser separadas, la Acerotina y la Acerocina. Por hidrólisis alcalina ambos glucósidos dan el ácido acerótico, cuya estructura ha sido establecida en base a su comportamiento químico y espectroscópico.



Una solanácea, el *Acnitus arborescens* (L) Schlecht, tiene unas hojas que de antiguo son empleadas en la medicina popular de América Central para el tratamiento de tumores.

El extracto con las hojas obtenido resultó con actividad citotóxica frente a células KB y con actividad antitumoral frente al sarcoma 180 y carcinoma de Walker 256.

El fraccionamiento de este extracto condujo al aislamiento (64) de una sustancia a la que se dio el nombre de Witaferina A, anterior-

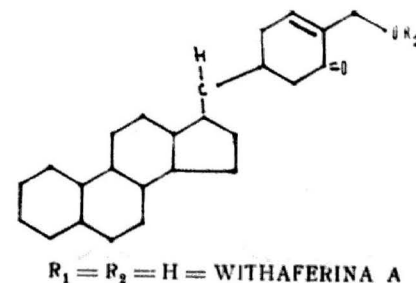
mente había sido aislada por el investigador israelita D. Lavie (65) de una solanácea difundida por la India, región cálida del Mediterráneo y África del Sur, la *Withania somnifera* Dun.

Su actividad responde a los siguientes datos:

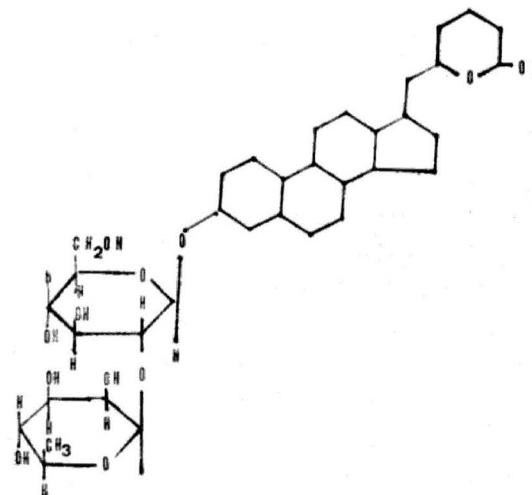
Cultivo de células KB actividad citotóxica a dosis 0,14 mg/Kg.

Actividad antitumoral contra sarcoma 180 a dosis 20 mg/Kg.

Actividad antitumoral contra carcinoma Walker 256 a dosis 20 mg/Kg.



Su estructura fue puesta de manifiesto por investigadores israelitas y confirmada por Kupchan por métodos físico-químicos y cristalográficos.

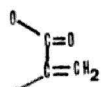


El principio se separa del extracto bruto, tratando éste con metanol acuoso al 10 por 100 y éter de petróleo; el principio queda en el metanol agua, se aumenta agua y se elimina el alcohol a presión reducida. El líquido acuoso obtenido se agita con cloroformo que disuelve la Witaferina y queda como residuo al eliminar el cloroformo, el cual es purificado por cromatografía.

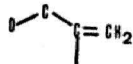
Como puede verse esta sustancia presenta una estructura rara e interesante. El anillo lactónico insaturado formado por los cinco átomos de carbono de la cadena lateral encuentra comparación sólo con la constitución de la polipodosamina aislada del polipodio vulgar por Sizba en 1971 (66).

Sesquiterpenos

Existen en el reino vegetal sesquiterpenos que han sido aislados de plantas africanas y norteamericanas pertenecientes a la familia de las Compuestas. Casi todos estos sesquiterpenos pertenecen a la estructura conocida, con una característica común cual es la presencia en su molécula del grupo carbonílico insaturado, de uno de los tipos expuestos a continuación.



I



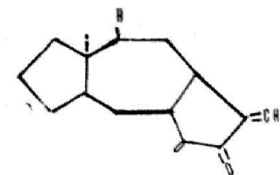
II

La actividad biológica de estas sustancias se ha supuesto, con cierta razón, que debe atribuirse a su capacidad de reaccionar con los grupos SH de los enzimas bloqueando la función de éstos.

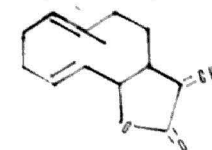
Por consiguiente habrá que pensar que la actividad de este tipo de sustancias no sea restringida a los sesquiterpenos, sino que debe ser extendida a todas aquellas que posean en la molécula agrupamientos del tipo señalado más arriba.

Puede servir de confirmación de lo que decimos el descubrimiento en 1969 de que el *Pseudoguaianólido damsina*, que había sido aislado el año 1953 (67), tiene una actividad inhibidora frente a las célu-

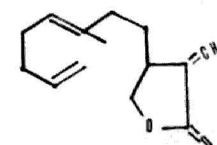
las 9 K B a dosis de 0,32 mg/ml. Más aún, el germacrano costunólido, y sus acetoxiderivados tulipanólido y epitulipanólido (68), son sustancias también activas, siendo las dosis efectivas respectivamente de 0,35, 0,46 y 0,21 mg/ml.



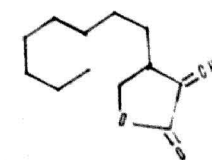
DANSINA



GERMACRANO COSTUNOLIDO

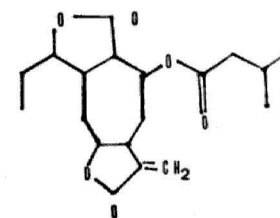


TULIPANOLIDO

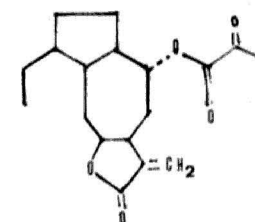


EPITULIPANOLIDO

El *Elephantus elatus* Berthold, da un extracto etanólico con actividad antitumoral. Fraccionado con agua y cloroformo y el residuo de esta última fracción con éter de petróleo y metanol al 10 por 100 en agua, los principios activos se acumulan en la fracción metanólica, la cual da un residuo que se purifica por cromatografía en columna de sílice, empleando cloroformo con 2 por 100 de metanol como eluyente (69).



ELEFANTINA



ELEFANTOPINA

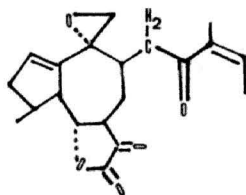
La elefantina y la elefantopina son las sustancias aisladas que muestran actividad. Ambas muestran las mismas características es-

pectroscópicas y análogas condiciones hidrolíticas, produciendo elefantolo y ácido metacrílico.

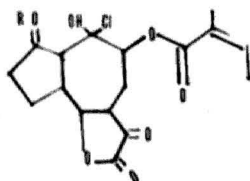
Lactonas

El extracto obtenido del *Eupatorium rotundifolium* L. fraccionado con agua y cloroformo, y el residuo clorofórmico fraccionado con metanol acuoso al 10 por 100 y éter de petróleo, permite obtener una lactona sesquiterpénica de estructura guayanolidica que posee acción citostática. Las dos primeras fueron la Eupatorina y la Eupatorina acetato, que difieren sólo por un grupo acetilo.

Empleando espectros infrarrojos, resonancia nuclear magnética y rayos X ha sido determinada la constitución de estas lactonas.



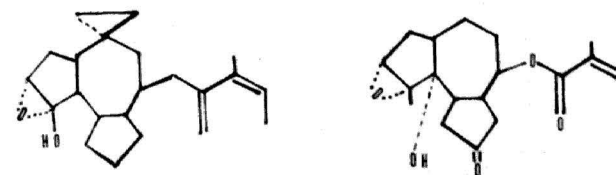
EUPATORINA = R = H
EUPATORINA ACETATO — R = AC
EUPATORINA BROMOACETATO R = CO CH₂ Br



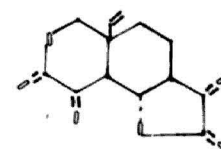
R = H EUPACLORINA
R = AC = AUPACLORINA ACETATO

Si en el grupo epóxido de éstas desaparece y es sustituido por un átomo de cloro y un hidróxilo, aparecen dos lactonas también presentes en la planta que son la eupaclorina y la eupaclorina acetato,

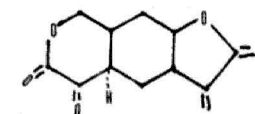
estas sustancias son las primeras lactonas terpénicas y sesquiterpénicas cloradas aisladas en la naturaleza, pero al tratarse de un derivado de una apertura antimarkow nikow del anillo epoxidico, existe la posibilidad de que su formación tuviera lugar en el proceso de extracción, pero si se tiene en cuenta que estas sustancias aparecen invariablemente aun cuando se tome la precaución de no emplear en su aislamiento ningún disolvente clorado, y que en muchas compuestas se ha comprobado la presencia de epóxidos acetilénicos, Clorhidrina y acetato de clorhidrina, se puede asegurar el origen natural de estos compuestos.



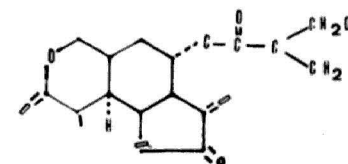
El quinto principio aislado de esta planta es la Euparotoxina, cuya diferencia con la Euparotina es la falta de doble enlace en el anillo ciclopenténico, siendo sustituido por un epóxido, así pues la Euparotoxina es el 3-4 epósido de la Euparotina, y el sexto la Eupatudina,



VERNOLOPINA



VERNOMICINA



VERNODALINA

que tiene una estrecha semejanza con la anterior y es igual su fórmula bruta estando sólo la diferencia en el grupo epóxido del 2-3-4 que existe en la primera y no en la segunda.

Tres dilactonas con actividad antitumoral han sido aisladas de los extractos de la *Vernonia himenolepis* y *V. amigdalina* pertenecientes a la familia de las Compuestas. Son ellas la Vernolepina, Vernomenina y Vernodalina.

La separación se ha realizado por tratamiento del extracto etanólico con metanol acuoso al 10 por 100 y éter de petróleo, y el residuo etanólico con acetato de etilo y agua quedando en el primero las sustancias que luego se separan por cromatografía (70) (71).

Su constitución ha sido establecida por medios químicos y físico-químicos.

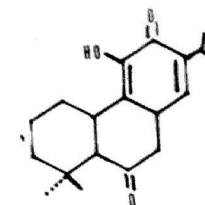
La actividad biológica «in vivo» de las lactonas sesquiterpénicas anteriormente mencionadas con acción antitumoral, las indicamos a continuación:

S u s t a n c i a	Walker 256 mg/kg	D. E. 50 mg/ml
Elefantina.....	50 — 100	0,28
Elefantopina	50 — 100	0,32
Eupatorina	55	0,21
Eupatorina acetato	75	0,21
Eupaclorina	—	0,36
Eupaclorina acetato.. ..	200	0,18
Eupacloroxina	—	0,39
Epatudina.....	—	2,8
Eupatoroxina	—	2,6
Vernolepina	10	2,0
Vernomenina	5	2,0
Vernoledina	—	2,0

Diterpenos

Del *Taxodium distidum* Rich (72) se ha obtenido un extracto etanólico, el cual fraccionado por cloroformo-agua, se separa el líquido clorofórmico y de su residuo se separa en columna de sílice dos

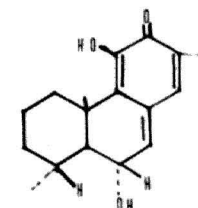
sustancias de naturaleza diterpénica, de acción antitumoral denominadas Taxodiona,



TAXODIONA

que muestra las reacciones características de un grupo hidróxilo de tipo fenólico y un carbonilo quinónico.

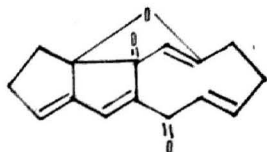
La Taxodone es muy similar a la anterior y su única diferencia es la de tener un grupo hidróxilo en lugar de un grupo cetónico.



De la misma manera que las lactonas sesquiterpénicas, a esta característica debe ser atribuida la actividad inhibidora «in vitro» 8 mg/ml para la taxodiona y 6 mg/ml para la Taxodona e «in vivo» frente al carcinoma Walker 256, 40 mg/Kg y 25 mg/Kg respectivamente.

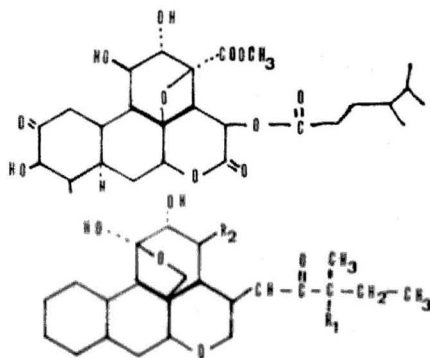
La *Jatropha gossypifolia* L. *euforbiacea*, se emplea desde hace mucho tiempo para el tratamiento popular del cáncer. Con su extracto se hicieron bioensayos que resultaron positivos. El extracto etanólico primario fue fraccionado con benceno filtrado, y de la solución bencénica fue eliminado el solvente, quedando un residuo que fue tratado por exano, el exano resultante, filtrado por carbón da una solución límpida de la que por destilación a presión reducida se le elimina el solvente y el residuo obtenido se cromatografía sobre co-

lumna de albúmina, que permite separar una fracción donde se encuentra como producto puro la Jatrophona ($C_{20}H_{24}O_{23}$) (73), la cual presenta actividad antitumoral que es bastante significativa contra la leucemia P 388 a dosis de 12 a 20 mg/Kg y un valor D. E. 50 0,77 mg/ml en 9 KB.



Simarubólidos

Los cuasinoides son sustancias aisladas de varias especies pertenecientes a la familia de las Simarubáceas, y Polonsky (74) ha estudiado y resumido los métodos para su aislamiento. Pero estas sustancias han adquirido interés cuando se ha descubierto por ensayos farmacodinámicos realizadas por varios grupos de investigadores que



BRUCEANTINA	R_1	R_2
AILANTINONA	H	CH_3
GLAUCARUBINONA	OH	CH_3
DEHIDROAILANTINONA	H	$=CH_2$
2'ACETILGLAUCORUBINONA	H	CH_3

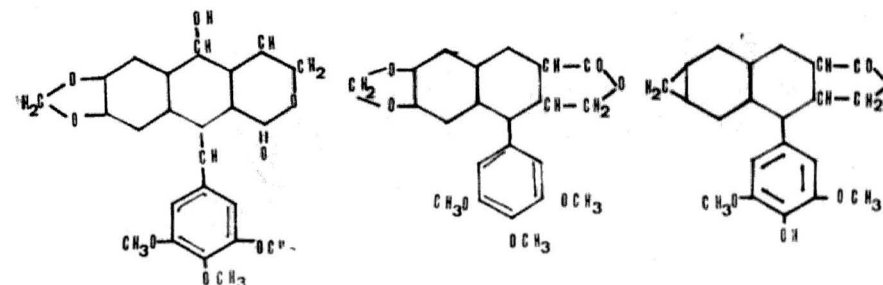
especies de esta familia tenían actividad antileucémica, ello ha motivado que se intensifique el estudio de sus principios y que estos trabajos hayan dado como fruto el aislamiento de algunos compuestos

de interés. Kupcham y colaboradores (75) han estudiado la *Brucea anhidysenterica* y obteniendo la bruceantina que ensayada frente a los sistemas P 388, LE, LL, y B 16 melanoma ha resultado tener una muy considerable actividad, y está en fase de experimentación farmacodinámica. Kupcham y Lacadie (76) han dado a conocer el aislamiento del nuevo simarubólido dehidroailantinona y de la 2'acetil glaucorubinona, que añadidos a la glaucorubinona y ailantinona son los que contiene el *Pierreodendron kerstinngui*.

Cada uno de estos compuestos se ha mostrado muy activo, en los ensayos realizados, frente al sistema P 388, y se espera que compuestos de este tipo tengan interés en ensayos en vivo y contar con compuestos de considerable actividad.

Lignanós

Como ya dijimos, el podofilo ha sido empleado en el tratamiento de verrugas venéreas y del condiloma acuminata. Su acción se encuentra en la podofilotoxina y peltatinas aisladas por Hartwell, pero cuando realmente estos principios adquieren valor es con los derivados de la podofilotoxina preparados y comercializados por la compañía Sandoz, de Basilea.



Los nuevos principios que han sido sometidos a ensayos clínicos son el 4'-dimetil epi podofilotoxina etilen glicósido y el 4'-dimetil epi podofilotoxina etiliden glicósido.

La primera ha sido determinada su valor clínico en Estados Unidos y en Europa y se ha comprobado una evolución favorable en la enfermedad de Hodgkin y alguna actividad ha sido también detectada frente a otro tipo de tumores; con la segunda fueron observa-

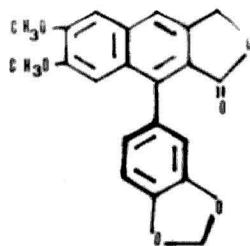
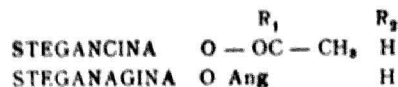
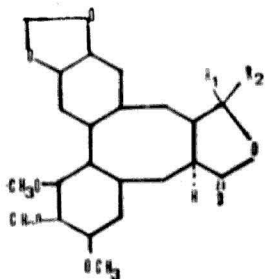
dos casos de intoxicaciones o intolerancias que afectan a la médula ósea, y produce náuseas y vómitos de importancia.

En este grupo hemos de incluir los principios activos del *Linum album*, con cuyos extractos se había encontrado una significativa actividad antitumoral. Del fraccionamiento de dicho extracto ha sido aislado por Weiss y colaboradores en el año 1975 (77) la 3'-dimetilpodofilotoxina, que es el responsable de la acción que se ha demostrado en esta especie.

También los extractos de la *Steganotaenia araliacea* se comportaron como antileucémicos, y de ellos Kupcham y colaboradores, en el 1973, aislaron dos principios causantes de la actividad de la planta, la stegancina y steganagina, en los que se ha comprobado su naturaleza de lignanos (78).

Finalmente, digamos que A. González y sus colaboradores aislaron del *Hapophyllum hispanicus* Spach, una especie recogida en el sur de nuestra península, una sustancia que después de purificada fue identificada con la Daphylina, que había sido obtenida por Murakami T. y Matsushima A. en el Japón en el año 1961.

La actividad inhibidora que esta sustancia presenta frente a tumores implantados en ratones puede ser debido a su estructura lignano de gran parecido con la podofilotoxina.



DAPHYLINA

Con cierta insistencia, hemos dicho en el curso de esta disertación, que siendo bastante los avances conseguidos en el aislamiento de sustancias que presentan actividad antitumoral, está aún muy le-

jana una solución terapéutica definitiva y a fuer de objetivos, hemos de reconocer que ese reto que el cáncer lanza a los hombres de ciencia que se ocupan del tema no está ni con mucho vencido y que no estamos en posesión del arma terapéutica que asegure la defensa de su ataque.

La realidad es muy distinta. Todas estas sustancias se muestran activas en el proceso experimental realizado con animales especialmente preparados o sobre cultivo de células perfectamente controlados, pero desgraciadamente existen casos en los que no puede programarse el ensayo clínico por impedirlo su toxicidad y cuando es posible la experimentación sobre humanos, la respuesta obtenida no tiene paridad con la conseguida en el ensayo farmacodinámico.

Las razones de este distinto comportamiento son varias y algunas ya han sido señaladas, pero hay una que puede ser interesante destacar. En el animal implantado puede seguirse el proceso desde el primer momento y siempre es posible plantear el experimento para llegar a tiempo. En el caso de los humanos, e incluso en los animales incontrolados, cuando se hace patente el estado patológico, en muchos casos, el proceso es irreversible y entonces la administración de estas sustancias puede, en parte, paliar los efectos de la enfermedad y hasta llegar a prolongar la vida, pero casi siempre en precario.

No tratamos en manera alguna de negar la eficacia de esta terapéutica, creemos por el contrario que toda la investigación realizada hasta ahora con las plantas superiores es muy interesante y su continuación de gran valor, pues será el medio de hallar estructuras que pueden presentar una auténtica efectividad y seguramente menos agresiva que las sintéticas porque su origen está en la misma vida de un ser. Ciertamente que el empeño es difícil, que la tarea puede ser larga, que el camino estará erizado de inconvenientes pero con constancia será posible arrancar, una vez más, a la naturaleza ese «algo» que con tanto interés esperamos.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) MARGARET, B.: *Kreig. Medicina verde*. Editorial Continental, S. A., México, España-Argentina, pág. 297 (1968).
- (2) WALTER H., LEWIS: *Memory P. F., Elvis Levis, E. P., John Wiley. «Medical Botany»*, New York (1976).

- (3) KOURENNOFF, P. M.: *Rosian Folk Medicine Pyramid Boons*. New York (1971).
- (4) HARTWELL, J. L.: *Plant remedies for cancer*. «Cancer Chemter. Rep.», pág. 19 (1960).
- (5) WEISBERGER, A. S., PENSKE, J.: «Tumor Sciencia», 126, 1112 (1957).
- (6) FELL, J. W.: *A Treatise on cancer, and its treatment*. «J. Churchill London», pág. 95 (1857).
- (7) STONE, W. S.: *A Review of history of chemical therapy in cancer*. «Med. Rec.», 90, 628 (1916).
- (8) BENTLEY, R., TRIMMEN, H.: «Medicinal Plants», Vol. 1, Ed. Churchill, London (1880).
- (9) OSOL, A., FANAR, G. JR.: *El dispensary of the United States of America*. Ed. 24 Lippincott, Philadelphia, London, Montreal, pág. 1128 (1947).
- (10) STICKL, O.: *Chemotherapeutische Versuche gegen das übertragbare mauscarcinoma Virchow*. «S. Arch. Pathol. Anat.», 270, 801 (1929).
- (10) SHEAR, M. J., HARTWELL, J. L., LEITER, J.: «Cancer Chemother Rep.», 19 (1960).
- (12) PHELAN, J. T., MILGRAM, H., STOLL, H.: «Surg Gynecol Obstet», 114, 25 (1962).
- (13) PHELAN, J. T., SURADO, J.: «Surg. Gynecol Obstet», 117, 224 (1963).
- (14) KAPLAN, L. W.: «Med. Surg. J.», New Orleans, 94, 388 (1942).
- (15) KAPLAN, L. W.: «Med. Surg.», 120, 251 (1944).
- (16) KITTLER, G. D.: *Laetrille (The anticancer drug): Control for cancer*. «Paperback Library», New York, pág. 255 (1963).
- (17) MORRONE, J. A.: «Exp. Med. Surg.», 20, 299.
- (18) SAULA, SCHIEPARTZ: «Cancer Treat Rep.», 60, 975 (1976).
- (19) SVOBODA, N., NEUS Y GORMAN, J.: «Am. Pharm. Soc.», 48, 669 (1959).
- (20) NOBLE, R. L., BEER, C. T., CURTIS, J. H.: «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 76, 883 (1958).
- (21) SVOBODA, G. H.: «J. Amer. Pharm. Assoc.», Ed. Sci., 47, 234 (1958).
- (22) SVOBODA, G. H., NEUS, N., GORMAN, M.: «J. Amer. Pharm. Assoc.», Ed. Sci., 48, 659 (1959).
- (23) SVOBODA, G. H.: «Lloydia», 24, 173 (1961).
- (24) GORMAN, M., NEUS, SVOBODA: «J. Amer. Chem. Soc.», 81, 4745 (1959).
- (25) MONGRIEF, S. W., LIPSCOMB, W. N.: «Acta Cryst.», 21, 322 (1966).
- (26) NEUS, N., BORMAN, M., HARGROVE, W., CONE, N. J., BIEMAN, K., BÜCHI Y MANNINE, R. E.: «J. Chem. Soc.», 86, 1440 (1924).
- (27) TAILOR, G.: *Introducción to symposium en Vincristina*. «Cancer Chemoter. Rep.», 52, 453 (1968).
- (28) SVOBODA, G. H.: «Lloydia», 29, 206 (1966).
- (29) SPJUT, R. W. y PERDUE, R. E.: «Jr. Cancer treat Rep.», 60, 979 (1976).
- (30) KABUGA: *In Nation Magazine de Nairobi, Kenia*. (1972).
- (31) ROSSON, N.: *New y Little*. «Bot. Soc. Broteriana», 39, 5 (1965).
- (32) WEINER, M. A.: *Earth Medicine-Earth Foods*. New York Macmillan Publishing Co. Inc., pág. 214 (1972).
- (33) PERDUE, R. E.: «R. Rhodora», 59, 274 (1957).

- (34) WATT, S. M. y BREYER-BRANDWIJK, M.: *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*. 2 ed., Edinburgh and S. Civitone Ltd., pág. 1455 (1962).
- (35) KUPCHAN, S. M., LIEPA, A. S.: «Brit. Pat.», 1, 373 (1974).
- (36) MONROE WAIL, M. C., HAROL TAYLOR: «Cancer Treat. Rep.», 60, 8 (1976).
- (37) ABBOTT, B. J.: *Bioassay of plant extract for anticancer activity*. «Cancer Treat. Rep.», 60, 1007 (1976).
- (38) W. STEATZ y F. B. COON: «Cancer Treat. Rep.», 60, 999 (1976).
- (39) ANNON: «Chem. Abstr.», 83, 25024 (1974).
- (40) KUPCHAN, S. M., CHAKRAVARTI, K. K., YOKORYAMA, N.: «J. Phar. Sci.», 52, 985 (1963).
- (41) DUTSCHEWSKA, H. B., MOLLOV, N. M.: «Che. ind.» (London), 770 (1966).
- (42) TODOROV, D., DAMYANOVA & M. DOLK.: «Bolg. Akad. Nauk.», 28, 709 (1975).
- (43) MALEEV, A., STOICHKOV, J., TODOROV, D., MIKHALAEVA, K., MOLLOV, N. M.: «Dokl. Bolg. Akad. Nauk.», 28, 713 (1975).
- (44) KUPCHAN, S. M., LIEPA, A. S., BAXTER, R. L., HINTZ, H. P.: «J. Org. Chem.», 38, 1846 (1973).
- (45) KUPCHAN, S. M., VOKOYAMA, N., THYAGARASAN: «J. Pharm. Sci.», 50, 104 (1961).
- (46) KUPCHAN, S. M., YANG, T. H., VASILIKIOTIS, G. S., BARNES, M. H., KING, M.: «J. Ame. Chem. Soc.», 89, 3076 (1967).
- (47) SVOBODA, G. H., POORE, G. A., SIMPSON, P. S., BODER, G. B.: «J. Pharm. Sci.», 55, 758 (1966).
- (48) WANI, M. C., WALL, M. E.: «J. Org. Chem.», 34, 1364 (1969).
- (49) GOVINDACHARI, V. R., WISWANATHAN: «Ind. J. Chem.», 10, 455 (1972).
- (50) WALL, M. G.: *Plant Antitumor Agents. V. Alkaloids with antitumor activity*. «Symposium Slerichte», 77 (1969).
- (51) ARTHUR, H. R., HUI, W. H.: «J. Chem. Soc.», 1840, 45 (1950).
- (52) MESSMER, W. M., TIN-WA: «J. Pharm. Sci.», 61, 1858 (1972).
- (53) F. PIOZZI, C. FUNGATI, R., MONDELI, G.: «Ceridti. Tet.», 24, 1119 (1968).
- (54) POND, R. G., WEISLEDER, D., SMITH, C. R., WALFF, I. A.: «Tet. Lett.», 4081 (1969).
- (55) KUPCHAN, S. M., GRAY, A. H., GROVE, M. D.: «J. Med. Chem.», 10, 337 (1967).
- (56) KUPCHAN, S. M.: *Abstracts from the Symposium on the Chemistry of the Natural Products*. Méjico, pág. 277 (1970).
- (57) KUPCHAN, S. M., KNOX, J. R., KELSEY, J. E., SÁENZ ENAUD, S. A.: «Sciencia», 149, 1685 (1964).
- (58) KUPCHAN, S. M., HEMINGWAY, R. J., DOSKOTCH, R. W.: «J. Med. Chem.», 7, 803 (1964).
- (59) KUPCHAN, S. M., HEMINGWAY, R. J.: «J. Org. Chem.», 34, 3890 (1969).
- (60) KUPCHAN, S. M., STEYN, P. S., GROVE, D. M., HORSFELD, S. M., MEITNER: «J. Med. Chem.», 12, 167 (1969).
- (61) HANN, L. R., SÁNCHEZ, C., ROMO, J.: «Tet.», 21, 1735 (1965).
- (62) T. TSCHESCHE, B. T., TJOA, G. WUOLFF.: «Ann. Chem.», 696, 160 (1960).

- (63) KUPCHAN, S. M., TAGASUGI, M., SMITH, R. M., PREYN, P. S.: «Chem. Comm.», 969 (1970).
- (64) KUPCHAN, S. M., DOSKOTCH, R. W., BOLLINGER, P., PHAIL, A. T., SIM, G. A., SÁENZ RENAULD: «J. Ame. Chem. Soc.», 87, 5806 (1965).
- (65) LAVIE, D., GLOTTER, E., SHOU, Y.: «J. Chem. Soc.», 7117 (1965).
- (66) SIZBA, J., DOLEIS, L., HERONT, V., SORM, F., FEHLHABER, H. W., SNATEKE, G., TOCHESCHE, R., WULFF: «Chem. Ber.», 104, 837 (1971).
- (67) HABU SHAG, T. O. SOINE: «J. Ame. Pharm. Assoc.», 43, 387 (1953).
- (68) R. W. DOSTOTTCH, F. S. ELFERALI: «J. Org. Chem.», 35, 1928 (1970).
- (69) KUPCHAN, S. M., AYUNARCHI, Y., CASADY, S. M., SCHONES, H. K., BORLINGANE, A. L.: «J. Org. Chem.», 34, 3876 (1969).
- (70) KUPCHAN, S. M., HEMINGWAY, R. R., KARIN A. WENER: «J. Org. Chem.», 34, 3903 (1969).
- (71) KUPCHAN, S. M., HEMINGWAY, R. R., KARIN A. WENER: «J. Org. Chem.», 34, 3876, 3908 (1969).
- (72) KUPCHAN, S. M., KARIN, A.: «Marricks C. J. Org. Chem.», 34, 3912 (1969).
- (73) KUPCHAN, S. M., SIEGUAL, C. N., MATZ, M. S., SÁENZ RENAULD, S. B., HALTIWANGER, R. C., BRYAN, R. F.: «J. Ame. Chem. Soc.», 92, 4476 (1970).
- (74) POLONSKY: «Chem. Org. Naturst.», 30, 101 (1973).
- (75) KUPCHAN, S. M., BRITTON, R. M., LACADIE, J. A., ZIEGLER, M. F.: «J. Org. Chem.», 40, 654 (1975).
- (76) KUPCHAN, S. M., LACADIE, J. A.: «J. Org. Chem.», 40, 654 (1975).
- (77) WEISS, S. G., TIN-WA, M., PERDUE, R. E. JR., FARNSWORTH, N. R.: «J. Pharm. Esci.», 64, 95 (1975).
- (78) KUPCHAN, S. M., BRITTON, R. W., ZEIGLER, M. F., GILMORE, C., J. RESTIVO, R. S., BRYAN, R. F.: «Ame. Chem. Soc.», 95, 1315 (1973).

Paramètres pharmacocinétiques et activité thérapeutique

Etude d'une série d'amides crésotiniques et de dérivés de cetoacides aromatiques

R. MARIGNAN

Faculté de Pharmacie. Montpellier (France)

Discurso de ingreso como Académico correspondiente extranjero

Sesión del 7 de diciembre de 1978

Les travaux qui font l'objet de cet exposé ont été réalisés ces dernières années et sont actuellement poursuivis et développés. Ils sont dus à un travail d'équipe et plus particulièrement à M. Chanal, Mme. Bret, M. M. Dubreuil et Audran. Ils portent sur deux séries de molécules qui ont été synthétisées et étudiées par les Laboratoires Pierre Fabre.

Nous présentons aujourd'hui les résultats des études pharmacocinétiques.

Réaliser une étude pharmacocinétique et métabolique complète d'une molécule est un travail long et délicat. Aussi y-a-t-il à l'heure actuelle très peu de résultats portant sur une même série chimique. Il est donc difficile de tirer des conclusions générales et de faire des corrélations entre les données de la pharmacocinétique et l'activité thérapeutique correspondante.

Aussi avons nous étudié systématiquement deux séries de dérivés et avons essayé d'établir au moins partiellement de telles relations, intéressantes pour la prévision de nouvelles molécules.

* * *

Les méthodes d'optimisation des molécules étudient en général la relation entre la structure d'un médicament et son activité pharmacologique. Très souvent on considère uniquement dans ce but l'interaction entre la molécule et son site récepteur.

Mais l'intensité de la réponse biologique dépend en réalité de l'ensemble des phénomènes qui se produisent dans l'organisme après administration du médicament. Il ne s'agit donc pas de considérer