

TOXICIDAD AGUDA Y EFECTIVIDAD ANTINEOPLASICA DEL CLORHIDRATO DEL 4-hidroxi-7-bis (2-cloroetil)-amino-5-heptino

SILVIA L. CORTÉS FRANCO *
J. GUILLERMO ORDORICA VARGAS * *
RICARDO YÁÑEZ AVILA *

INTRODUCCIÓN

La farmacoterapia antineoplásica ha alcanzado gran importancia en la práctica médica; tiene como objetivo primordial encontrar sustancias que controlen el crecimiento de las células tumorales o que las destruyan completamente, sin dañar a las normales (Dowling, 1970), pero aún no se ha logrado el fármaco ideal.

El arsenal quimioterápico con que se cuenta en la actualidad para el tratamiento de las neoplasias es muy extenso; sin embargo, una de las razones para continuar la investigación de nuevos productos es que la mayoría de los empleados en la clínica

Estos fármacos tienen dos grupos importantes: el electrofílico (β -cloroetil), responsable de la actividad alquilante y otro donde radica la especificidad, llamado grupo portador; este último es responsable de la concentración del fármaco en el tejido neoplásico; los grupos portadores utilizados son muy diversos, por ejemplo glúcidos, esteroides, antipalúdicos y grupos alquílicos.

Las mostazas nitrogenadas son agentes bifuncionales ya que presentan dos cadenas de β -cloroetilo, capaces de formar puentes entre las cadenas de la molécula del DNA, entrecruzándose y bloqueando su replicación; también pueden afectar a otras moléculas de importancia biológica como las

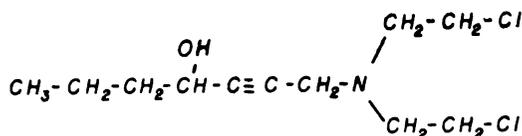


FIG. 1. El clorhidrato del 4-hidroxi-7-bis (2-cloroetil) amino-5-heptino (Saldaña, 1973).

presentan acciones colaterales que lesionan severamente los tejidos normales.

Entre los fármacos antineoplásicos destacan los agentes alquilantes que incluyen las mostazas nitrogenadas, compuestos de gran utilidad en el tratamiento de diversas formas de cáncer, por lo que su importancia e investigación son crecientes.

* Departamento de Bioquímica y Biofísica, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México (17), D. F.

* Becario de la DEDICT-COFAA.

proteínas.

Tomando en consideración la utilidad de este tipo de compuestos en la clínica (clorambucil, mustargen y otros), y en un esfuerzo por encontrar nuevos agentes antineoplásicos más efectivos y menos tóxicos se han sintetizado nuevas mostazas nitrogenadas (Saldaña y Yáñez, 1973), entre otras el clorhidrato del 4-hidroxi-7-bis(2-cloroetil)-amino-5-heptino (Fig. 1) cuyo estudio farmacológico parcial es motivo de este trabajo.

MATERIAL

Se emplearon ratones blancos hembra de la cepa BALB/c, con peso entre 18 y 22 gramos; se alimentaron con agua estéril y "Purina Laboratory Chow" o alimento equivalente, *ad libitum*.

El tumor utilizado como sistema de prueba fue el linfoma murino L5178Y en fase ascítica, cuya línea se mantiene por inoculación intraperitoneal del líquido de ascitis, cada 9 a 10 días, en ratones de la cepa BALB/c.

La mostaza empleada para su administración se disolvió en agua bidestilada estéril.

MÉTODOS

Toxicidad aguda. Para la determinación de la toxicidad aguda se siguió la metodología recomendada por Loomis (1974), con ciertas modificaciones. Las diluciones del fármaco se prepararon en condiciones de esterilidad inmediatamente antes de usarse, de tal forma que las dosis deseadas se encontraban en 0.5 ml de la solución; el pH de las soluciones fue de 5.5 y el del vehículo 6.5. Se hicieron 6 lotes de prueba que recibieron dosis únicas del fármaco, y uno de control, que recibió solamente el vehículo. La administración se hizo por vía intraperitoneal con jeringa de insulina y aguja del núm. 27. Se observó la sintomatología de los animales y se les pesó diariamente. Se registró la mortalidad durante las primeras 48 horas. A los que murieron se les realizó la necropsia y a los sobrevivientes se les observó durante 14 días, al término de los

cuales se sacrificaron y se practicó la necropsia.

Los datos de mortalidad porcentual en cada lote fueron procesados mediante el método de Litchfield y Wilcoxon (1949), para precisar la DL_{50} .

Efectividad antitumoral. Se siguieron los lineamientos recomendados por el Cancer Chemotherapy National Service Center de los Estados Unidos de Norteamérica (Goldin, 1968). Se extrajo asépticamente el líquido ascítico del donador, se depositó en un recipiente estéril de vidrio sumergido en baño de hielo y se diluyó 1:4 ó 1:19 con solución de Hartman para conteo de células en una cámara de Neubauer. Conociendo el número de células por mililitro en la primera dilución se ajustó una segunda dilución para obtener el inóculo deseado, que fue desde 10.8×10^6 hasta 28.4×10^6 células, contenidas en 1 ml. Para medir la viabilidad celular se colocó una gota de la segunda dilución en un portaobjetos, se agregó una gota más pequeña de una solución al 1% del colorante supravital azul de tripano (las células vivas no se tiñen en tanto que las muertas lo hacen de azul); se determinó entonces el porcentaje de células vivas, que en ningún caso fue menor del 80%. La administración del inóculo se hizo por vía intraperitoneal con aguja del núm. 27. Una vez inoculados, los animales se asignaron al azar a los grupos de control y en tratamiento; se registraron diariamente las condiciones generales y el peso de cada animal.

Los esquemas de tratamiento aparecen a continuación:

| Esquema | Dosis ¹ | Días de administración ² |
|----------------|--------------------|-------------------------------------|
| 1 | DL_{10} | 9,13 |
| 2 | $1/3 DL_{50}$ | 1,3,5,7,9,11 |
| 3 | $1/5 DL_{50}$ | 1,2,3,4,5,7,9 |
| 4 ³ | DL_{10} | 1, |
| | $1/3 DL_{50}$ | 6,9 |
| | $1/5 DL_{10}$ | 16,23,30 |

¹ Estas dosis se eligieron siguiendo las experiencias de Letter y Abbott (1965) con la leucemia L1210.

² El día de inoculación se tomó como cero.

³ Se hizo una combinación de esquemas.

El parámetro que se utilizó para medir cuantitativamente la efectividad, fue el índice T/C, definido de acuerdo con el CCNSC (Goldin, 1968), como:

$$T/C = \frac{\text{tiempo de vida de los animales en tratamiento}}{\text{tiempo de vida de los animales de control}} \times 100$$

RESULTADOS

La signología que presentaron los animales en las pruebas de toxicidad se presenta en la tabla 1, en tanto que en la 2 apare-

cen los resultados que se utilizaron para el cálculo de las dosis letales, que resultaron ser:

$$\begin{aligned} DL_{10} &= 40 \text{ mg/kg de ratón} \\ DL_{50} &= 70 \text{ mg/kg de ratón} \\ DL_{84} &= 108 \text{ mg/kg de ratón} \end{aligned}$$

Tabla 1. Signos de toxicidad observados en los animales sobrevivientes a las 48 horas de recibir dosis del clorhidrato del 4-hidroxi-7-bis(2-cloroetil)-amino-5-heptino.¹

| <i>Signología</i> | <i>% presentación</i> |
|---|-----------------------|
| Disminución de actividad espontánea | 70 |
| Disminución de intensidad de respuesta a estímulos externos | 70 |
| Pérdida de peso | 100 |
| Pelo erizado | 100 |
| Dificultad respiratoria | 80 |
| Diarrea | 80 |

¹ Modificado de Cortés, 1979.

Tabla 2. Letalidad del clorhidrato del 4-hidroxi-7-bis(2-cloroetil)-amino-5-heptino.¹

| <i>Dosis (mg/kg)</i> | <i>Núm. de ratones</i> | <i>Mortalidad (M/V)²</i> | <i>% mortalidad</i> |
|----------------------|------------------------|-------------------------------------|---------------------|
| 50 | 10 | 1/10 | 10.0 |
| 60 | 10 | 4/10 | 40.0 |
| 70 | 10 | 7/10 | 70.0 |
| 80 | 10 | 5/10 | 50.0 |
| 90 | 10 | 6/10 | 60.0 |
| 100 | 10 | 8/10 | 80.0 |

¹ Modificado de Cortés, 1979.

² M/V = muertos/vivos, a las 48 horas.

Las necropsias demostraron que el fármaco produce fuerte efecto irritativo local (tabla 3).

Tabla 3. Resultado de las necropsias de los animales muertos dentro de las 48 horas de la administración del clorhidrato del 4-hidroxi-7-bis(2-cloroetil)-amino-5-heptino.¹

| <i>Hallazgo</i> | <i>% presentación</i> |
|-------------------------------------|-----------------------|
| Restos de vehículo o fármaco | 0.0 |
| Engrosamiento de peritoneo parietal | 70.0 |
| Engrosamiento de peritoneo visceral | 90.0 |
| Aumento de la trama meséptica | 90.0 |
| Edema de intestinos e hígado | 40.0 |
| Necrosis de intestinos | 20.0 |
| Congestión e infarto: hígado | 60.0 |
| Congestión e infarto: riñones | 20.0 |

¹ Modificado de Cortés, 1979.

Los resultados de las pruebas de efectividad se resumen en la tabla 4. Como puede verse, solamente en el primer esquema de tratamiento no se encontró diferencia entre la sobrevivencia de los animales de control y en tratamiento.

Tabla 4. Efectividad antineoplástica del clorhidrato del 4-hidroxi-7-bis(2-cloroetil)-amino-5-heptino.¹

| Prueba | Núm. de animales ² | | Inóculo (millones de células) | Dosis de Dosis acumulada (D) | | 1/D | T/C |
|--------|-------------------------------|----|-------------------------------|------------------------------|-----------------------|-------|-------|
| | T | C | | prueba ³ | (en mg.) ⁴ | | |
| 1 | 10 | 10 | 28.4 | DL ₁₀ | 1.683 | 0.594 | 105.8 |
| 2 | 9 | 9 | 16.6 | 1/3 DL ₅₀ | 2.118 | 0.472 | 176.9 |
| 3 | 8 | 13 | 14.3 | 1/5 DL ₅₀ | 1.950 | 0.512 | 146.4 |
| 4 | 9 | 9 | 10.8 | combinada ⁵ | 2.097 | 0.477 | 149.5 |

¹ Modificado de Cortés, 1979.

² T = animales en tratamiento; C = animales de control.

³ DL₁₀ = 40 mg/kg de ratón; 1/3 DL₅₀ = 23.3 mg/kg de ratón; 1/5 DL₅₀ = 14 mg/kg de ratón.

⁴ Es promedio de las dosis acumuladas recibidas por cada ratón del lote.

⁵ DL₁₀ el día 1; 1/3 DL₅₀ los días 6 y 9; 1/5 DL₅₀ los días 16, 23 y 30.

DISCUSIÓN

La toxicidad del compuesto en estudio es semejante, desde el punto de vista cualitativo, a la de las demás mostazas nitrogenadas, y la DL₅₀ (70 mg/kg de ratón) cae dentro del rango acostumbrado.

Por lo que hace a la efectividad contra el linfoma L5178Y, por lo menos en tres de los esquemas (ver tabla 4) se sobrepasa el T/C de 125% fijado como mínimo para continuar el estudio de un quimioterápico (Goldin, 1968 y Leiter y Abbott, 1965).

Al graficar la inversa de la cantidad total de fármaco administrado, en promedio, a cada ratón (D) contra el T/C obtenido con cada esquema de tratamiento, se obtiene una relación lineal ($r = -0.9372$), como puede verse en la figura 2; dicha relación abre la posibilidad de modificar los esquemas para obtener dosis acumulativas mayores que permitan sobrevivencias más prolongadas; sin embargo, esto tendrá un límite superior dado por la toxicidad de la sustancia, la que determinará, en su momento, que los animales mueran por los efectos

del fármaco y no por los del tumor. Las modificaciones citadas deberán tomar también en cuenta que mientras más temprana sea la intervención quimioterapéutica, mayores serán las probabilidades de éxito. Como es patente en el caso del esquema 1, las intervenciones en estudios tumorales avanzados tienen poco éxito, en contraposición con los buenos resultados que se consiguen atacando desde temprano como sucedió en los esquemas 2, 3 y 4.

El tamaño del inóculo es también muy importante, como lo demuestran las cifras de la tabla 4; se ve que en el primer esquema de tratamiento en que el inóculo fue mayor, no presentó una sobrevivencia significativa.

Quedan pendientes estudios con otros sistemas tumorales; además es recomendable repetir los hechos con el sistema L5178Y pero, experimentos en los cuales el parámetro utilizado como criterio de efectividad sea el número total de células tumorales y no la sobrevivencia del animal.

Trabajamos ahora en montar las técnicas adecuadas.

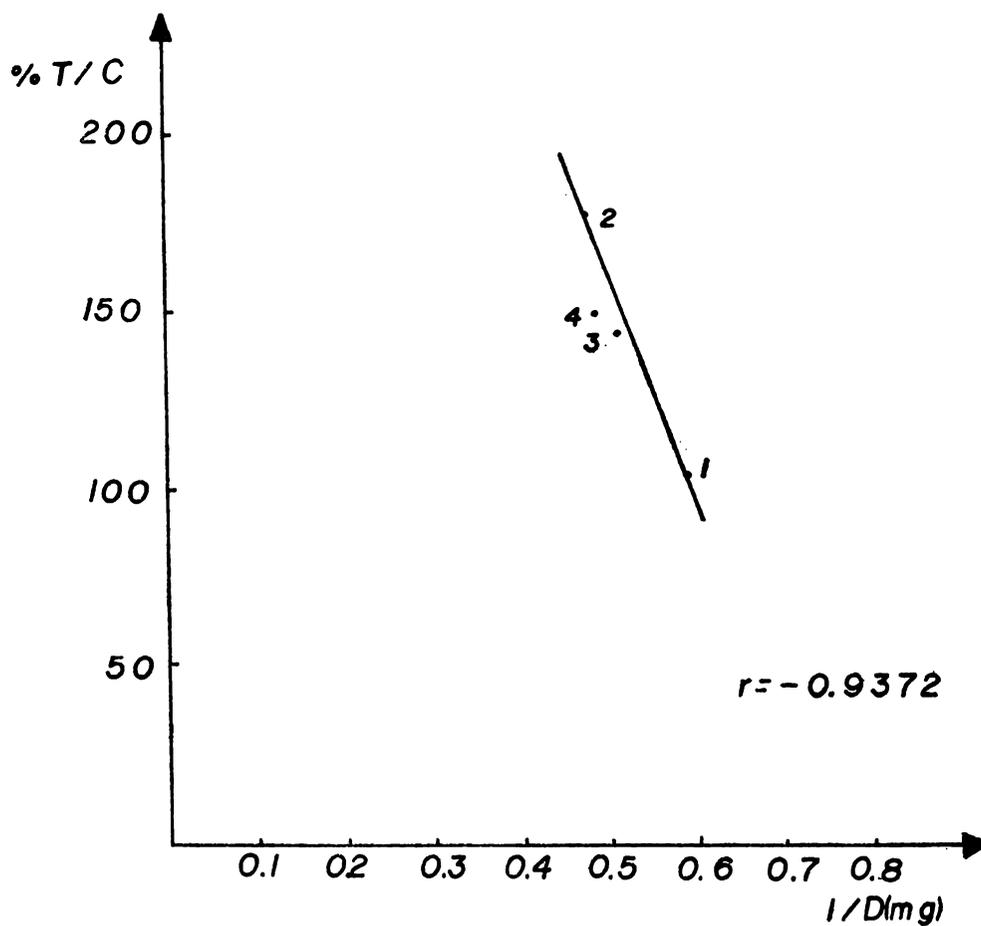


FIG. 2. Correlación de las variables $1/D$ (mg) contra el % T/C de la prueba de eficacia para el compuesto del clorhidrato del 4-hidroxi-7-bis(2-cloroetil)-amino-5-heptino.

1. Dosis = $LD_{10} = 40$ mg/kg.
2. Dosis = $1/3 LD_{50} = 23.3$ mg/kg.
3. Dosis = $1/5 LD_{50} = 14.0$ mg/kg.
4. Dosis combinada: $LD_{10}; 1/3 LD_{50}; 1/5 LD_{50}$.

RESUMEN

Se describen en este trabajo los métodos utilizados para determinar la toxicidad aguda y la primera fase de la prueba de eficacia antineoplásica del compuesto clorhidrato del 4-hidroxi-7-bis(2-cloroetil)-amino-5-heptino en base a las recomendaciones del C.C.N.S.C., de Estados Unidos de Norteamérica (Cancer Chemotherapy National Service Center).

Los resultados experimentales de toxicidad aguda dieron una DL_{50} de 70 mg/kg (0.082 moles/kg). En la prueba de efectividad antineoplásica, en un esquema de tratamiento se obtuvo un T/C de 176%. Considerando que 125% es el mínimo que se recomienda para aceptar un fármaco para estudios posteriores, se puede concluir que esta mostaza debe estudiarse con más profundidad (2a. etapa de la prueba de eficacia), o sea probar diferentes dosis, otros esquemas de tratamiento, otro tipo de neoplasias, otros animales y los estudios citológicos, bioquímicos que se consideren necesarios.

SUMMARY

In this paper description is made of the methods used in the determination of the acute toxicity and the first fase of the antineoplastic efficacy test of the compound: chlorhydrate of the 4-hydroxi-7-bis(2-chlorethyl)-amine-5-heptine, according to the recommendations of the C.C.N.S.C. of the United States of North America (Cancer Chemotherapy National Service Center).

The experimental results of acute toxicity gave a DL_{50} of 70 mg/kg (0.082 moles/kg). In the antineoplastic efficacy test a T/C of 176% was obtained in one treatment schedule. If 125% is considered the

minimum recommended for a pharmaceutical substance to be accepted for further studies, conclusions can be drawn that this mustard should be thoroughly studied (2nd. stage of the efficacy test), that is, to test different doses, other treatment schedules, other type of neoplasias, with other animals and the cytologic and biochemical studies considered necessary.

BIBLIOGRAFIA

1. CORTÉS, F., S. L.: Tesis Profesional: "Estudio Farmacológico del Clorhidrato del 4-hidroxi-7-bis-(2-cloroetil)-amino-5-heptino". ENCB, México, (1979).
2. DOWLING, O. M., KRAKOFF, H. J. O., y KARNOFSKY, A. D.: "Mechanism of Action of Anti-Cancer Drugs" en Chemotherapy of Cancer, W. H. Cole (ed.); Lea Febiger, Filadelfia, pp.: 124-148, (1970).
3. GOLDIN, A.: "General Methods and Cancer Chemotherapy National Service Center Protocols", en Methods in Cancer Research, Vol. IV; Harris Busch (Ed.). Academic Press, Nueva York.; pp.: 200-254, (1968).
4. LEITER, J., ABBOTT, J. B., y SCHEPARTZ, A. S.: Screening Data from the Cancer Chemotherapy National Service Center Screening Laboratories. XXVIII. Cancer Research, 25: 1626-1635, (1965).
5. LITCHFIELD, J. T. JR., y WILCOXON, F.: "A simplified Method of Evaluating Dose-Effect Experiments". J. Pharmacol Exp. Therap. 99-113, (1949).
6. LOOMIS, T. A. Essentials of Toxicology, 2a. Ed. Lea Febiger, Filadelfia, pp.: 13-19, 145-176, 177-184, (1974).
7. SALDAÑA, S., E. J.: *Synthesis of Alkyne-N-bis(2-chloroethyl)amines*". Tesis Doctoral, Universidad del Estado de Arizona, E.E.U.U., (1973).
8. SALDAÑA, S., E. I., y YAÑEZ, A. R.: "Síntesis de nuevas mostazas nitrogenadas con probable actividad antineoplásica". Comunicación al VI Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas, México, (1973).