

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE AGENTES ONCOLITICOS

Por el doctor LUIS ENRIQUE GAVIRIA SALAZAR, Profesor
del Departamento de Farmacia - Facultad de Ciencias.
Universidad Nacional.

INTRODUCCION

La inquietud sobre substancias inhibidoras de neoplasias me llevó a iniciar un estudio sobre este importante tópico, el cual comencé en el año de 1959 en la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional, con la cooperación inicial del entonces Decano, doctor Sven Zethelius, quien me facilitó los medios para poner en marcha esta investigación.

El trabajo hasta ahora realizado se puede dividir en dos etapas:

La primera, desarrollada en parte dentro de la Universidad Nacional, utilizando los servicios de las Facultades de Medicina y de Veterinaria; el Hospital San José, mi laboratorio particular; la colaboración de varios médicos particulares y laboratorios de anatomía patológica y partiendo de principios activos de origen vegetal.

La segunda etapa realizada casi en su totalidad fuera de la Universidad, haciendo un estudio químico detallado de los extractos de plantas que en la etapa anterior fueron utilizados, para llegar, en el año de 1963 a un producto de síntesis orgánica con el cual se han logrado obtener algunas respuestas de interés en el estudio de la quimioterapia del cáncer. Este producto lo he denominado GS-63.

DESARROLLO DEL TRABAJO

El trabajo desarrollado hasta el momento contempla los siguientes pasos:

- a) Obtención de principios activos partiendo de plantas colombianas (técnica personal).
- b) Estudio químico de los principios activos.
- c) Establecimiento de una forma farmacéutica adecuada para su administración (vías parenteral y oral).
- d) Investigación farmacológica para verificar el grado de toxicidad aguda o crónica en animales (ratones y perros).
- e) Investigación de la droga en neoplasias experimentales en ratones.
- f) Investigación de la droga en neoplasias espontáneas en perros y caballos.
- g) Iniciación de la experimentación clínica.
- h) Aplicación de productos de síntesis orgánica, cubriendo la investigación en el mismo orden indicado anteriormente.

Las experiencias iniciales fueron realizadas utilizando un extracto total de la planta, con el cual se preparó una solución isotónica inyectable, con un pH de 5 a 5.2. Con esta solución se procedió a efectuar ensayos de toxicidad en perros y ratones.

En la experimentación cualitativa de tanteo para fijar la dosis letal media (DL 50) se llegaron a establecer como inocuas las dosis de 70 mg. por kilo de peso y 100% mortales las de 700 mg. por kilo, en ratón.

Con base en estas experiencias se trabajó en ratones, hasta un total de mil, procurando hacer una selección, teniendo en cuenta diversos factores (peso, edad, etc.) con el fin de poder trabajar en las mejores condiciones posibles. Se dividieron en lotes y se produjeron carcinomas experimentales con alquitrán de hulla. Los animales fueron tratados por vía intraperitoneal, obteniéndose su recuperación rápida en comparación con animales testigos.

Debe observarse que los resultados positivos obtenidos en las experiencias en ratones no son seguros, debido a que éstos están en capacidad de regresar espontáneamente sin ningún tratamiento, una vez producidos los carcinomas con alquitrán. Este hecho se pudo comprobar repetidas

veces, pero llama la atención la mayor rapidez de recuperación en los lotes tratados con la droga.

Para la experimentación clínica en animales con cáncer espontáneo, se pueden destacar los siguientes casos, con respuestas de interés:

Se trató un perro que padecía de un sarcoma de la región inguino-crural, por vía intramuscular durante 4 meses. Se presentó una reabsorción de la masa tumoral y la recuperación completa del animal, sin que se manifestaran síntomas de regresión en un período de observación de 2 años.

Se trató un caballo de la Escuela Militar que padecía de un carcinoma escamo-celular del tercer párpado del ojo izquierdo, el cual fue intervenido quirúrgicamente el 20 de octubre de 1960. El 2 de noviembre de 1961 se le practicó la extirpación total del párpado por haberse reproducido la neoformación. La biopsia efectuada confirmó la primera. Además, el animal se encontraba en estado avanzado de anemia, como lo demostró el examen de sangre practicado entonces. Se comprobó también una metástasis en el miembro anterior izquierdo y una infartación ganglionar en la región del cuello. En el mes de diciembre se inició el tratamiento, con dosis bajas, por vía endovenosa. Este se prolongó por 3 meses. El tratamiento fue suspendido debido a las buenas condiciones del caballo; aumentó de peso de 380 kilos iniciales a 450 kilos; desaparición del tumor metastásico y de la infartación ganglionar y normalización del cuadro hemático. Actualmente el caballo se encuentra en condiciones normales, como se ha podido comprobar por los chequeos periódicos que se le practican.

Otro caso semejante se trató en la Facultad de Veterinaria. El animal padecía del mismo tipo de carcinoma en el ojo derecho, infartación ganglionar, metástasis en el ojo izquierdo y región perineal. Fístula purulenta en el miembro anterior derecho y estado general muy malo. Después de 6 meses de tratamiento se obtuvo la curación del ojo izquierdo, el desprendimiento por necrosis del tumor de la región perineal, la curación de la fístula y la desaparición de la infartación ganglionar. Además, tuvo un aumento de peso de 50 kilos. Posteriormente el animal murió sin que hubiera sido posible la modificación de la lesión primitiva.

Se trataron 2 caballos llegados a la Facultad de Veterinaria que padecían de un melanoma con metástasis debidamente diagnosticados con estudio histo-patológico efectuado en el Laboratorio de la misma Facultad.

Lo mismo que con el producto natural, solamente se administraron dosis empíricas basadas en la posología del mismo. Así, para el caballo Nº 1 se inició la posología con una dosis de 250 mg. diarios del GS-63 y con un peso corporal de 300 kilos. El tratamiento se prolongó por 8

días, siendo la cantidad total inyectada de 2 Gm. Al cabo de este tiempo se produjo una importante modificación de las lesiones, como se describe a continuación:

Al iniciar el tratamiento, el animal presentaba muy mal estado general; tenía afectadas varias zonas, una bastante extensa en la piel del espinazo, caracterizada por una úlcera con pequeñas y numerosas masas tumorales con grandes cantidades de melanina. En 2 zonas de la cara y debajo de la cola se observaban tumores pequeños, redondos, de color negro y muy abundantes. Después de 8 días se comprobó la desaparición casi total de las tumoraciones, con desprendimiento de la zona ulcerada. Se observó también una mejoría notable del estado general y recuperación del apetito, quedando todavía unos pequeños tumores en la lesión de la columna vertebral y unos muy discretos y semidesprendidos debajo de la cola. Se tomó una nueva biopsia de uno de los pocos tumores que quedaban en la región de la cruz. En el estudio histo-patológico se observan células sarcomatosas, pero hay zonas donde han desaparecido éstas y han sido reemplazadas por tejido conjuntivo cicatricial. No se presentaron nuevas metástasis.

Al iniciar el tratamiento del caballo N^o 2, el animal presentaba numerosas masas tumorales en diferentes regiones del cuerpo y metástasis glanglionares. Recibió primero 15 inyecciones del extracto vegetal, observándose la formación de abscesos y necrosis de los tumores más pequeños. Se continuó el tratamiento con el producto de síntesis GS-63, del cual se aplicaron 12 inyecciones intramusculares de 0.5 gm. del principio activo cada una, en el curso de 20 días. Se observó la formación de abscesos y necrosis de los demás tumores y la desaparición completa de uno de gran tamaño situado en la región axilar. Se tomó una biopsia de este tumor antes de desprenderse y se hizo el estudio histo-patológico. No se encontraron células cancerosas ni gránulos de melanina. El apetito del animal mejoró notablemente; buen estado general; no se presentaron nuevas metástasis.

Se trató un caballo de la Escuela Militar con el producto de síntesis, por vía endovenosa; la aplicación diaria fue de 1 gm. del GS-63. El animal padecía de un carcinoma escamo-celular del tercer párpado del ojo derecho, que le fue extirpado. Se hizo el estudio histo-patológico en la Facultad de Veterinaria, el cual confirmó el diagnóstico clínico. Dos meses después le apareció una metástasis en la misma región; se tomó una biopsia que confirmó la primera. El animal respondió rápidamente al tratamiento, siendo éste suspendido al cabo de un mes. El caballo se encuentra en observación desde hace más de 3 años y está en buenas condiciones. No se han presentado nuevas metástasis.

ENSAYOS FARMACOLOGICOS DEL GS-63 EN EL RATON

(Colaboración del Dr. Juan F. Theilkuhl. Sección de Farmacología).

Prueba de analgesia.

Este ensayo se efectuó mediante el estímulo doloroso térmico, con base en el método de Woolfs y Macdonald (1944) modificado de la siguiente manera:

En un baño de temperatura constante se instala un vaso de precipitados de vidrio de 400 ml. de capacidad, de manera que el fondo del vaso se mantenga constantemente a una temperatura de 60°C (\pm 5°C). Después de un tiempo prudencial de ambientación del animal al laboratorio, se mide con intervalos de 5 minutos el tiempo de reacción del ratón al estímulo térmico, teniendo como criterio de reacción dolorosa el momento en que el animal levanta bruscamente manos o patas del fondo del vaso. De las tres primeras lecturas se toma el promedio, que se considera tiempo de reacción control. Después de administrada la droga se continúa midiendo el tiempo de reacción con intervalos de 5 a 7 minutos. Se promedian las lecturas de los primeros 25 minutos, de los primeros 40 y de los primeros 60 y se calcula el porcentaje de disminución o de aumento en el tiempo de reacción con respecto al tiempo control. En el caso de una droga con poder analgésico manifiesto, el tiempo de reacción con una dosis efectiva, debe aumentar por lo menos en un 100%.

Para el ensayo se emplearon ratones de cuatro y medio meses de edad, masculinos, de peso promedio de 28.5 gms. en dos grupos paralelos, de los cuales uno se sometió a la acción de la droga y el otro se utilizó como control. El tiempo de reacción normal promedio fue de 8.7 segundos.

Con una dosis de 10 mg/kg. intra-peritoneal (n = 5) no pudo observarse prolongación del tiempo de reacción.

Con una dosis de 100 mg/kg. intra-peritoneal (n = 10) los resultados, respecto al grupo control (n = 10), fueron los siguientes:

CONTROL:	promedio en 25 minutos	— 7.8%
	promedio en 40 minutos	— 7.7%
	promedio en 60 minutos	— 1.5%
100 mg./kg.:	promedio en 25 minutos	+ 2.7%
	promedio en 40 minutos	+ 7 %
	promedio en 60 minutos	+ 2.8%

Diferencia respecto al control:

- + 10.5%
- + 14.7%
- + 4.3%.

Si bien se observa un aumento del tiempo de reacción en los primeros 25 y 40 minutos, éste no es significativo. Por lo que se verá más adelante, atribuimos este aparente efecto analgésico a una moderada acción sedante general que la droga produce en esta dosificación. Como se verá, 100 mg./kg. corresponden al 35% de la dosis letal media y por ello podemos afirmar que la droga no posee efecto analgésico que justifique la desaparición del dolor en el hombre.

La prueba de analgesia se complementó con el ensayo de Haffner (1929), consistente en la aplicación de una pinza de presión a la raíz de la cola en el ratón. La medición del tiempo de reacción al estímulo doloroso da indicación sobre efecto analgésico. En animales sujetos a la aplicación de 100 mg./kg. intra-peritoneal de la droga no pudo observarse ninguna modificación de la respuesta normal a este estímulo doloroso.

PRUEBA DE TOXICIDAD

La inyección intra-peritoneal de 10 mg./kg. en solución de pH 4.5 produce en el ratón una respuesta dolorosa inmediata que se manifiesta por incomodidad abdominal del animal. Los síntomas de incomodidad se prolongan por cerca de 2 minutos, después de los cuales el ratón no muestra ninguna acción farmacológica.

La inyección intra-peritoneal de 100 mg./kg. en solución de pH 4.5 conduce a una respuesta dolorosa inmediata manifestada por chillidos, intento de fuga precipitada y comportamiento desesperado. Esta reacción se prolonga por unos 30 segundos después de los cuales solamente se observa incomodidad abdominal por cerca de un minuto adicional. Al cabo de 3 a 4 minutos se presenta un estado de aparente sedación, que debe considerarse más bien consecuencia de la fuerte experiencia dolorosa precedente. Es notoria la intensidad y la brevedad de la reacción dolorosa y difícilmente atribuible al pH de la solución. Para confirmar este aspecto se neutralizó una porción de la solución momentos antes de la inyección. La respuesta de los animales a la solución de pH 7 es exactamente igual a la anteriormente descrita, por lo cual el efecto se debe a la sustancia misma y no a la acidez de la solución.

La administración intra-peritoneal de 375 mg./kg. produce las mismas manifestaciones ya descritas, algo más intensas pero igualmente

breves. Al cabo de 3 minutos se puede observar ocasionalmente una hiperflexia, que va seguida de un estado de quietud de varios minutos. Al cabo de 4 a 6 minutos el animal muestra ansiedad y al cabo de 8 a 10 minutos aparecen contracciones clónicas aisladas. Entre los 9 y los 11 minutos aparecen episodios de convulsiones tónico-clónicas que pueden conducir a la muerte o repetirse después de algunos minutos, en medio de un estado de disnea consecutivo a un episodio convulsivo que termina en paro respiratorio; 30 minutos después de la muerte clínica aún se observan convulsiones clónicas aisladas.

Con dosis que van entre los 243 y los 290 mg./kg. intra-peritoneal ($n = 40$) la muerte, cuando se presenta, ocurre entre los 9 y los 20 minutos, con un promedio de 10.5 minutos y nunca después de 20 minutos. El animal que sobrevive este tiempo se recupera rápidamente, mostrándose absolutamente normal al cabo de 30 a 40 minutos. En ningún caso se presentó muerte tardía.

Determinación de la dosis letal media.

Esta prueba se llevó a cabo en animales de las mismas características ya descritas, con peso promedio de 28.5 gm., por administración intra-peritoneal.

La curva se estableció con base en tres puntos:

243 mg./kg. ($n = 20$)	: 30%
270 mg./kg. ($n = 37$)	: 46%
290 mg./kg. ($n = 20$)	: 75%.

Por extrapolación se obtiene un valor de 269 mg/kg. intra-peritoneal para la DL_{50} . Si este valor fuera aplicable al hombre, con una dosis efectiva de 100 mg. i. m./día que se ha empleado, resultaría un índice terapéutico para el promedio de 70 kg. por lo menos, 180, lo cual constituye un margen de seguridad terapéutica extraordinariamente amplio.

Vías de administración.

Hasta el momento de este estudio solamente disponemos de experiencias en la administración intra-peritoneal en el ratón. Sin embargo, sabemos que la droga se absorbe por vía subcutánea e intramuscular. La administración de una y media dosis letal media por vía oral en el ratón, produce reacción de malestar en forma inmediata y se observan fuertes movimientos de intento de expulsión o de intolerancia en el transcurso de los primeros 20 minutos. Se observa al cabo de este tiempo cierta dificultad de coordinación de equilibrio, así como un estado de apatía que dura varias horas.

Observaciones: Con posterioridad a este estudio se hicieron aplicaciones del GS-63 en perros, por vía intramuscular, endovenosa y oral, sin que se observaran síntomas de intolerancia. Con base en estas experiencias, la droga se ha aplicado en casos humanos por las mismas vías, sin ningún inconveniente.

RESUMEN

La administración intra-peritoneal del GS-63 en el ratón desencadena una reacción dolorosa intensa de corta duración, independiente del pH de la solución y por lo tanto atribuible a acción directa de la sustancia.

Dosis altas producen contracciones clónicas y episodios convulsivos tónico-clónicos.

La muerte se produce por disnea y paro respiratorio entre los 9 y los 20 minutos.

Si el animal sobrevive, se recupera en muy breve tiempo y sin manifestaciones tardías de ninguna especie.

Es posible que durante la crisis toxicológica se presente un efecto sedante, pero faltan datos que lo confirmen (las experiencias clínicas realizadas posteriormente han demostrado esta acción sedante).

La droga no es analgésica en dosis equivalente a más de la tercera parte de la dosis letal media.

La dosis letal media es de 269 mg./kg. por vía intra-peritoneal.

CONCLUSIONES

1. Se descubrió un fármaco de origen vegetal, como agente quimioterápico en el tratamiento de neoplasias.
2. Se obtuvo una mezcla de sustancias naturales, con técnica personal de extracción.
3. Se estabilizó la mezcla y se adoptó una forma farmacéutica adecuada de administración (vía parenteral).
4. Mediante un estudio químico cuidadoso se pudo establecer que en la mezcla de sustancias naturales existía un agente oncolítico.
5. Se sustituyó éste por un producto de síntesis orgánica, que se administra por vía parenteral u oral.
6. En la experimentación cualitativa de tanteo para fijar la dosis letal media del producto natural, se llegaron a establecer como inocuas

las dosis de 70 mg. por kilo de peso y 100% mortales las de 700 mg. por kilo, en ratón.

7. Para el producto de síntesis se pudo establecer que la dosis letal media es de 269 mg. por kilo de peso en ratón, intra-peritoneal.
8. Se efectuaron experiencias en animales (ratones) con cáncer experimental, obteniéndose su recuperación rápida en comparación con animales testigos.
9. Se repitieron las experiencias en animales (perros y caballos) que padecían de cáncer espontáneo. Se obtuvieron respuestas de importancia y supervivencia más o menos prolongada en varios de los casos tratados sin que hasta ahora se hayan presentado nuevas metástasis.
10. Se constató que tanto el producto natural como el de síntesis son hematopoyéticos y sedantes, además de su acción sobre los tumores, en los cuales se ha observado unas veces detención del proceso evolutivo, otras reabsorción de la masa tumoral y la mayoría de las veces necrosis comprobada histológicamente.
11. Se ha comprobado que los productos en experimentación no atacan tejidos sanos.
12. Las respuestas más significativas en la experimentación clínica en animales se han obtenido en el tratamiento de carcinomas escamosos y melano-sarcomas en caballos y en sarcomas en perros.
13. Se han iniciado algunos tratamientos en casos humanos desesperados, con respuestas de interés, especialmente en sarcomas óseos y con supervivencia de varios pacientes sin que hasta el momento se hayan producido nuevas metástasis.

Como este tipo de experimentación clínica ofrece muchas dificultades y no contamos hasta el momento con estudios estadísticos suficientes, nos abstenemos por ahora de hacer una descripción de los casos tratados.

REFERENCIAS

British Medical Bulletin. Vol. 14, N^o 2, mayo de 1958.

Cantarow Schepartz. Bioquímica. Ed. Interamericana S. A. México. 3^a Ed. 1964.

CHABEREK, MARTELL. Organic Sequestering Agents. John Wiley Sons. London. Ed. 1964.

Cheronis-Entrikin Semimicro Cualitative Analysis. The Systematic Identification of Organic Compounds Interscience Publishers, Inc. New York. Ed. 1960.

- DRUCKREY, HERMANN. "Mustron". Posibilidades y límites de terapia desde el punto de vista de la investigación experimental. Universidad de Freiburg (Alemania). 1964.
- GILMAN. Organic Chemistry. John Wiley and Sons. New York, Ed. 1963.
- GOODMAN and GILMAN. The pharmacological Basis of Therapeutics. The MacMillan Company. New York. 3ª Ed. 1965.
- Integral Industrial N° 21 - 22. Enero, 1966.
- Japan Medical Gazette. Vol. 2, N° 12. Diciembre de 1965.
- LITTER, MANUEL. Farmacología. Ed. Ateneo. Buenos Aires, 2ª Ed. 1963.
- Organic Syntheses. Publicación anual de métodos para la preparación de sustancias químicas orgánicas. John Wiley and Sons. New York. Ed. 1930 - 1956.
- Osaka University. Abstracted from "Sanka to Fuzunka". The treatment of Clorionepithelioma (Chemotherapy). Vol 20. números 7 - 8.
- Unidia. Revista Médica. Vol. VII. N° 3, noviembre, 1960.
- WOOLFE, G. and MACDONAL, A. D. - J. Pharmacol. Exper. Therap. 1944.
- HAFNER, F. - Dtsch. Med. Wschr. 1929.