

Evaluación primaria de las acciones farmacológicas de la apodina, un alcaloide nuevo

R. ROJAS, M. L. ARRUAZABALA, H. PÉREZ SAAD, A. ESTÉVEZ,
R. GONZÁLEZ Y M. GARCÍA RODRÍGUEZ

Dpto. de Farmacología del Centro Nacional de Investigaciones Científicas,
Dpto. de Farmacología de la Facultad de Ciencias Médicas
de la Universidad de La Habana e Instituto Nacional de Oncología
y Radiobiología, La Habana, Cuba

Recibido: 14 de enero de 1976

ABSTRACT. Pharmacological evaluation of apodine, a new indolic alkaloid extracted from leaves of *Tabernaemontana armeniaca* Areces Sp. nov., was done. It was utilized a scheme of primary screening constituted of in vivo and in vitro techniques. Apodine produced the following effects: reduction of mobility and capacity of reaction in mice, weak relaxation of the isolated rat trachea contracted by a depolarized solution, weak antagonism to acetylcholine, bradiquinine, histamine, nicotine and serotonin in isolated guinea pig ileum, depression of the frequency and amplitud of contractions of isolated guinea pig auricles, and a moderate arterial hypotension in cats. Some aspects related to the utilization of different techniques into a pharmacological screening are discussed.

RESUMEN. Se evaluó la acción farmacológica de la apodina, alcaloide indólico obtenido de las hojas de la *Tabernaemontana armeniaca* Areces Sp. nov., mediante un esquema de "screening" primario compuesto de técnicas en animales in vivo y en preparaciones aisladas. Se encontró que la apodina disminuyó la movilidad y capacidad de reacción de los ratones, relajó débilmente la musculatura lisa de tráquea aislada de rata contraída por una solución despolarizante, antagonizó débilmente las respuestas a la acetilcolina, la bradiquinina, la histamina, la nicotina y la serotonina en el ileon aislado de cobayo, deprimió la frecuencia y la amplitud de las contracciones de las aurículas aisladas de cobayo y produjo moderada hipotensión arterial en gatos. Se discute algunos aspectos relacionados con el empleo de las técnicas de un "screening" farmacológico.

INTRODUCCION

La búsqueda de nuevas substancias que ofrezcan interés desde el punto de vista farmacológico plantea la necesidad de disponer de técnicas capaces de evidenciar dicha posible actividad.

Cuando al comenzar el estudio de una substancia se desconoce cuál es el tipo de acción que pudiera ejercer se enfrenta un problema que puede ser abordado por el llamado "screening ciego". Este consiste en un conjunto de pruebas que yendo de observaciones generales a las más particulares permite acumular cierta información relativa a la substancia en estudio, y que constituye la base sobre la cual se debe tomar una decisión respecto a si la misma merece continuarse investigando, y en ese caso, orientar hacia qué tipo de efecto se debe dirigir la investigación ulterior. Su objetivo se limita así a cubrir una etapa inicial en el estudio de una posible futura droga.

Las técnicas que constituyen el "screening" deben ser sencillas, rápidas y económicas debido al carácter masivo que generalmente tiene este tipo de estudio, a la vez que razonablemente eficientes y seguras, de modo que sea mínimo el error que se pueda cometer al decidir el destino de una substancia.

En este trabajo se reportan los resultados del estudio de la apodina (*Iglesia y Diatta, 1975*) mediante un "screening" farmacológico llevado a cabo en nuestro laboratorio. La apodina fue suministrada por el Laboratorio de Fitoquímica del Cenic en forma de base. Se trata de un alcaloide indólico extraído de las hojas de la Tabernaemontana armeniaca *Arcos* sp. nov. el cual no había sido reportado en la literatura.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron las siguientes técnicas:

Test de observación neurofarmacológica (Turner, 1965).

Descrito por Irwin (1964), este test permite detectar alteraciones en el comportamiento general del animal y su forma de reacción. Se tomaron 6 grupos de 3 ratones cada uno (machos, 19 a 21 g de peso) a los cuales se administró el producto en estudio por vía intraperitoneal a las dosis de 10, 30, 100, 300 y 1000 mg/Kg, utilizando aceite vegetal como vehículo

y en un volumen no mayor de 2 ml. Al grupo control se le administró el vehículo en el volumen máximo empleado. Inmediatamente después de inyectado cada animal fue sometido a una observación cuidadosa mediante 40 indicadores previamente establecidos en una secuencia determinada, la cual se repitió a los 30, 60 y 90 minutos.

Se ha señalado que esta técnica permite evidenciar múltiples y disímiles acciones farmacológicas (*Brejman y Dobriakov, 1971; Turner, 1965 y Vane, 1965*). Ensayos preliminares en nuestro laboratorio demostraron que efectivamente era capaz de detectar acciones farmacológicas diversas.

Una vez terminado el test, a los ratones muertos en un período de 12 horas se les hizo necropsia para determinar alteraciones en vísceras a simple vista y mediante microscopía estereoscópica.

Determinación de dosis letal media (DL 50).

Se utilizaron 76 ratones en total (machos, 19 a 21 g, vía intraperitoneal) según la técnica de Litchfield y Wilcoxon, (1949). El período de observación se extendió hasta 24 horas después de administrado el producto.

Preparaciones aisladas.

Se utilizaron las siguientes:

Ileon aislado de cobayo; conducto deferente de rata y recto abdominal de rana.

Estas tres se desarrollaron según la descripción de Turner (1965).

Se realizó registro quimográfico con palanca isotónica de inscripción frontal.

Tráquea aislada de rata, según la técnica de disección helicoidal de Constantine, (1965) y aurículas aisladas de cobayo, según la descripción de Perry y cols., (1970).

En estas dos últimas se registró la contracción isométrica mediante transductores fuerza-desplazamiento acoplados a registradores potenciométricos.

En las experiencias con preparaciones aisladas la apodina se utilizó en disolución de ácido cítrico. La concentración final de ácido cítrico en

el baño fue de 0.01% mantenida uniformemente en el transcurso de las experiencias.

Registro de presión arterial de gato.

Se procedió según la descripción de Turner, (1965). La Fig. 6 muestra un experimento típico. En estas experiencias se utilizó clorhidrato de apodina.

Acción insecticida.

La similitud estructural de la apodina con algunas substancias reportadas como insecticidas (Iglesias, comunicación personal) indujo a que se evaluara esta posible actividad. Se utilizó la técnica descrita por Nemec y cols., (1973). Las moscas *Drosophila melanogaster* fueron gentilmente suministradas por el Departamento de Genética de la Escuela de Biología de la Universidad de La Habana.

Evaluación de actividad antitumoral e inmunodepresora.

Se estudió la posible acción citostática de la apodina frente a tres tipos de tumores experimentales del Servicio de Transplantes de Tumores del I.N.O.R.: el sarcoma 180 (S-180), en ratones albinos machos (18-20 g de peso); el sarcoma 37 (S-37), en ratones albinos machos (20-23 g), y el adenocarcinoma mamario 755 (A-755), en ratones C57B1 (18-20 g)..

Se utilizaron grupos de 8 animales (grupos de control y de tratamiento) a los cuales se administró el producto por vía intraperitoneal según el esquema de tratamiento que se muestra en la Tabla IV, para una dosis total por animal de alrededor de 400 mg/kg distribuidos en 4 ó 6 días (DL 0 = 100 mg/kg).

La apodina se utilizó en solución etanólica al 5% (v/v), en concentración final de 1.34 mg/ml. Las concentraciones y dosis se refieren a base libre del alcaloide. A los animales controles se les inyectó sólo el solvente.

Al terminar los tratamientos todos los animales fueron sacrificados mediante un anestésico y se procedió a la exéresis de los tumores, los cuales se pesaron en balanza analítica para obtener el peso promedio de los tumores tratados (T) y los de control (C), expresándose el resultado en el

índice % (T/C) para cada tratamiento. A partir de este índice se calculó el % de inhibición del crecimiento de los tumores (% I) haciendo 100-% (T/C). También se determinó la sobrevivencia en cada grupo mediante la relación de animales sobrevivientes en el grupo al terminar el tratamiento partido el total de animales tratados en el grupo, y multiplicado por 100.

Los ensayos de crecimiento de tumores *in vivo* se complementaron con estudios *in vitro* sobre la capacidad inmunodepresora del principio activo, por ser ésta una propiedad característica de los agentes quimioterápicos del cáncer. Se utilizaron células linfoides de ratones inmunizados con eritrocitos de carnero y tratados con el alcaloide, según la técnica descrita por Fedyuk y Estévez, (1974).

RESULTADOS

Test de Irwin.

Las mayores alteraciones sin que se produjera la muerte de ningún animal se observaron a la dosis de 100 mg/kg, apreciándose ya fácilmente las mismas a la hora de haber sido inyectado el alcaloide. Estas consistieron en disminución de los movimientos activos, reducción del tono muscular, disminución de la agresividad, disminución de la reactividad frente a estímulos dolorosos externos, disminución de frecuencia respiratoria, incoordinación motora. En el análisis global el patrón de respuesta parece corresponder con un cuadro de depresión general del sistema nervioso central. A la dosis de 300 mg/Kg la depresión fue mucho más marcada y produjo la muerte de los tres animales en un lapso de 90 minutos. No se apreciaron alteraciones en la necropsia.

Dosis letal media.

Los resultados se exponen en la Tabla I. Todas las muertes se produjeron en un intervalo menor de 8 horas luego de la administración.

Ileon aislado de cobayo.

a. Acción de la apodina sobre el tono basal del íleon aislado.

A concentración final en el baño de 1 y de 15 mcg/ml no se apreció modificación en la actividad espontánea del íleon aislado ni en su tono.

b. Acción de la apodina frente a los diversos agonistas utilizados.

Los resultados se resumen en la Tabla II. Las técnicas empleadas se comprobaron en su validez para detectar los efectos buscados mediante el empleo de drogas antagonistas conocidas. La Fig. 1 muestra un ejemplo de estas experiencias.

TABLA I

Dosis Letales

Dosis letal	mg/kg	Intervalo de confianza (5%)
DL 50	204	238-174
DL 84	270	316-230
DL 16	153	179-131

TABLA II

*Acción de la apodina frente a diversos agonistas
en el íleon aislado de cobayo
Apodina (10 mcg/ml)*

Agonista	Tiempo de contacto (minutos)			Recuperación
	5	10	15	
Acetilcolina	82.7	78.6	90	110
Histamina	44.8	57.7	64.1	91.8
Serotonina	47.5	40.5	36	86.8
Nicotina	47	58.5	63.5	93.2
Bradiquinina	82	82.5	82.5	100

Los valores indican la magnitud de la respuesta obtenida en % tomando como 100% el promedio de los controles respectivos para cada experiencia. Cada valor es la media de por lo menos tres determinaciones realizadas en preparaciones diferentes.

Tráquea aislada de cobayo.

La Fig. 2 muestra los resultados obtenidos. A partir de este gráfico se estimó la potencia relajante de la apodina respecto a la papaverina mediante el cociente de la dosis de cada alcaloide que produjo un 50% de relajamiento de la tira contraída por una solución despolarizante (100 mM/l de ClK). La apodina fue 4.75 veces menos activa que la papaverina en estas condiciones experimentales. El propranolol (1 mcg/ml) no bloqueó la relajación producida por la apodina.

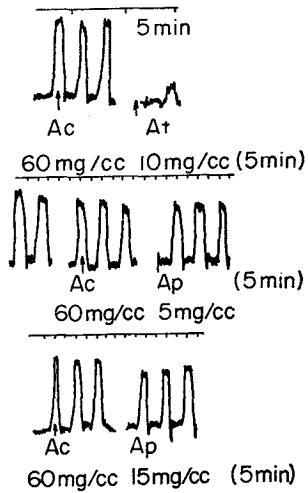


Fig. 1

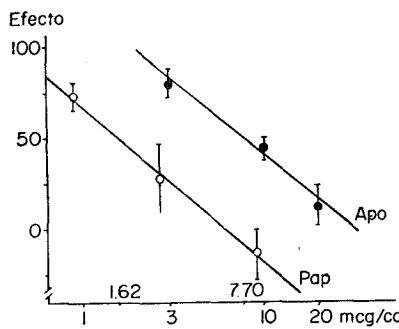


Fig. 2

Fig. 1. Acción de la apodina frente a la cetilcolina. Concentraciones utilizadas: acetilcolina (Ac), 60 ng/ml; atropina (At), 10 ng/ml; apodina (Ap), 5 y 15 mcg/ml.

Fig. 2. Acción de la papaverina y la apodina sobre la tráquea aislada de rata. Cada punto es la media de 3 a 9 determinaciones (\pm desviación típica). Se tomó como 100% la magnitud promedio de las contracciones controles obtenidas en ausencia de antagonista. Las concentraciones se expresan en base libre de ambos alcaloides. La DE 50 de la papaverina y de la apodina fueron respectivamente 1.62 y 7.70 mcg/ml.

Conducto deferente de rata.

La Fig. 3 muestra una experiencia típica. La apodina a concentración de 5 mcg/ml actuando cinco minutos no modificó la respuesta de esta preparación a la noradrenalina.

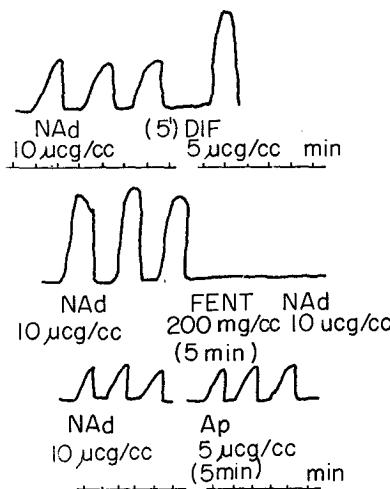


Fig. 3. Acción de la apodina sobre el conducto deferente de rata. Concentraciones utilizadas: noradrenalina (NAd), 10 mcg/ml; difenhidramina (Dif), 5 mcg/ml; fentolamina (fent), 200 ng/ml; apodina (Ap), 5 mcg/ml.

Recto abdominal de rana.

La Fig. 4 muestra una experiencia típica. La apodina no demostró acción curarizante sobre la placa neuromuscular.

Aurículas aisladas de cobayos.

La apodina no mostró acción cardiotónica en preparaciones sometidas a concentraciones reducidas de calcio en la solución. Por el contrario, en

solución normal redujo la amplitud y frecuencia de las contracciones y a concentraciones mayores de 10 mcg/ml produjo arritmia. Estos efectos desaparecieron mediante lavado de las aurículas, recuperándose dichas preparaciones (Fig. 5). La atropina (200 ng/ml) no modificó la cardio-depresión.

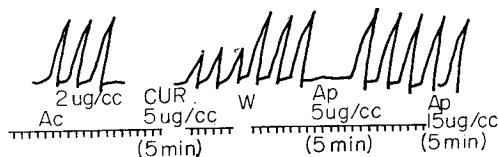


Fig. 4. Acción de la apodina sobre el músculo recto abdominal aislado de rana. Concentraciones utilizadas: acetilcolina (Ac), 2 mcg/ml; tubocurarina (Cur), 5 mcg/ml; apodina (Ap), 5 y 15 mcg/ml.

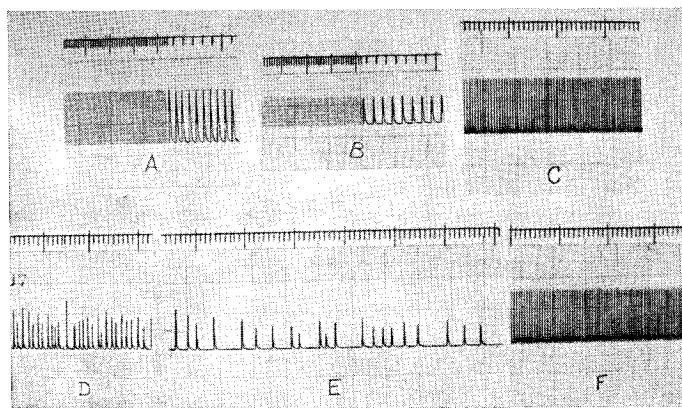


Fig. 5. Acción de la apodina sobre las aurículas aisladas de cobayo. A. Registro control. B. Apodina (10 mcg/ml durante 10 minutos). C. Recuperación. D. Apodina (30 mcg/ml durante 1 minuto). E. Apodina (30 mcg/ml durante 10 minutos). F. Recuperación. Las marcas en la parte superior indican los segundos transcurridos.

Presión arterial de gato.

La apodina (10 mcg/kg) produjo una hipotensión de aproximadamente 35 mm de Hg, relativamente fugaz (Fig. 6).

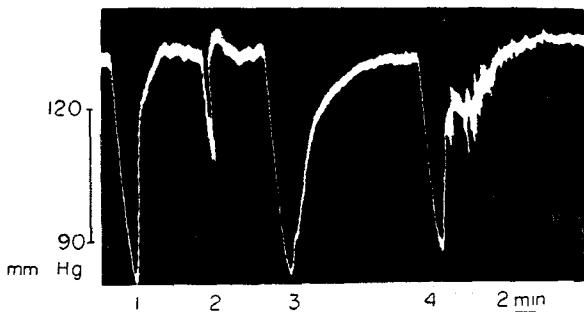


Fig. 6. Acción de la apodina sobre la presión arterial de gato. En 1 se inyectó acetilcolina (10 mcg); en 2 se estimuló eléctricamente el cabo periférico del vago; en 3 se inyectó histamina (3 mcg) y en 4, apodina (10 mcg/kg).

Acción insecticida.

Los resultados se muestran en la Tabla III. La apodina no mostró acción insecticida.

Acción sobre el crecimiento de los tumores y la respuesta inmunológica.

Los resultados sobre el crecimiento de los tumores experimentales se muestran en la Tabla IV. En el adenocarcinoma 755 se observó un aumento del peso de los tumores de los animales tratados en relación a los controles. En los demás se apreció una ligera inhibición del crecimiento tumoral. Esta inhibición no rebasó el 55% fijado como de posible valor terapéutico, (Estévez, comunicación personal) por lo cual se concluyó que la apodina no mostró acción citostática. La prueba de la immunodepresión fue también negativa.

TABLA III

Estudio de la acción insecticida de la apodina

GRUPO	% DE MORTALIDAD
A. Control (Butanol + acetona)	20
B. Testigo (Disco seco de papel de filtro)	15
C. D.D.T. 0.33 mg/ml	100
D. Apodina 3 mg/ml	26
E. Apodina 5 mg/ml	30

Cada grupo contenía de 10 a 15 moscas.

TABLA IV

Acción de la apodina sobre los tumores experimentales

TUMOR	TRATAMIENTO	% SOBRE-VIVENCIA	% (T/C)	% I
$(\text{Veces} \times \text{Volumen} \times \text{Días de})$ al día inyectado tratamiento				
A-755	3 × 0.5 ml × 4	100	117	No
S-37	2 × 0.5 ml × 6	100	93.0	7.0
S-37	3 × 0.5 ml × 4	87.5	87.3	12.7
S-180	2 × 0.5 ml × 6	90.0	90.0	10.0

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Sobre la apodina.

Los resultados obtenidos con las técnicas utilizadas indicaron que la apodina produce los siguientes efectos:

Depresión de la actividad general y de la reactividad en ratones.

Débil relajamiento de la musculatura lisa traqueal.

Débil antagonismo frente a diversas drogas agonistas tomado como órgano efector la musculatura lisa intestinal aislada. El hecho de que la respuesta a la histamina, la nicotina y la serotonina se haya reducido en mayor grado sugiere que debe investigarse una posible selectividad de la apodina frente a estos agonistas, o eventualmente una acción anestésica local, (*Smith, 1961*).

Depresión cardíaca, que no es de origen colinérgico pues no fue modificada por la atropina.

Hipotensión arterial.

La apodina produjo una hipotensión arterial comparable a la obtenida mediante diversos procedimientos (Fig. 6). Debe estudiarse el mecanismo de producción de esta hipotensión. No se descarta la posibilidad de que se deba a una acción depresora directa sobre el miocardio.

En conclusión, sobre la base de las experiencias realizadas se debe estudiar con más detalle de la acción de la apodina sobre sistema nervioso central, la acción relajante de la musculatura lisa y la acción hipotensora.

Sobre el esquema general de "screening".

La selección de las técnicas que constituyen un "screening" depende de los objetivos que se persigan. En principio mientras mayor sea el número de preparaciones distintas que se utilicen mayor es la posibilidad de detectar una acción (*Vane, 1965*). Sin embargo, teniendo en cuenta la diversidad de acciones farmacológicas que existen así como el gran número de modelos experimentales que se pueden utilizar es necesario escoger un grupo de técnicas que se ajusten a las posibilidades materia-

PERRY W. L. M. (Prefacio). Colectivo del Departamento de Farmacología de la Universidad de Edimburgh, "Pharmacological experiments on isolated preparations", 2a. ed., Livingstone, Edimburgh and London, 1970.

SMITH W. G. "Pharmacological screening tests" en "Progress in medicinal chemistry", Ellis G. P. and West G. B. (Ed.), 1-33, Butterworths, London, 1961.

TURNER R. A. Screening methods in pharmacology, Academic Press, New York and London, 1965.

VANE J. R. "A plan for evaluating potential drugs" en "Evaluation of drug activities: Pharmacometrics", Laurence D. R. and Bacharach A. L. (Ed.) 23-45, vol. 1, Academic Press, New York and London, 1965.