

Aislamiento y acción antimitótica de productos de naturaleza lactónica procedentes del *Podophyllum emodi* *

J. Sánchez-Parareda, A. Llobart, Jr., F. Gaviña y F. Pérez-Mínguez

Departamento de Patología. Servicio de Cancerología Experimental. Facultad de Medicina. Valencia (España)

(Recibido el 10 de febrero de 1970)

J. SANCHEZ-PARAREDA, A. LLOMBART, Jr., F. GAVIÑA and F. PEREZ-MINGUEZ. *Isolation and Antimitotic Activity of Lactones Extracted From the Podophyllum emodi*. R. esp. Fisiol., 26, 257-268, 1970.

Starting from the *Podophyllum emodi*, by means of solubility techniques in chloroform, benzene and ether, three groups of different lactones are extracted. These lactones correspond to total coumarinic lactones (LAC-C), lactones soluble in chloroform and insoluble in benzene (LAC-N), lactones insoluble in chloroform (LAC-E).

The use of thin layer and preparative chromatography permits to take off seven lactonic groups of the LAC-C complex and two of the LAC-N and three of the LAC-E.

Accomplished its extraction and tests of acute toxicity in mice, tolerable dose of the different compounds are administered by intraperitoneal way in the mice bearer of the Ehrlich's Ascitic Carcinoma.

The mitotic cycle is analysed during 72 hours by successive smear and having as a comparative pattern the podofilotoxine.

Appears a very strong mitosis inhibition with metaphasic blockade in the LAC-C group.

The LAC-C, the antimitotic action is very low, lacking of colchicine effect in the metaphasic blockade.

The inhibitory mitotic action of all the lactones extracted is lower to the one found, under similar experimental conditions, with the podofilotoxine.

La acción citostática de extractos de diversas especies de podofilina (*Podophyllum emodi*, *Podophyllum peltatum*, *Podophyllum sikkimensis*) se conoce desde hace un cuarto de siglo (2, 17, 47, 50). Estos efectos citostáticos van acompañados de anomalías celulares (7, 15, 16, 25, 34); asimismo, la podofilina aplicada localmen-

te estimula la incorporación de aminoácidos a las proteínas epidérmicas (10), causando también inhibición en el transporte activo de Na^+ (28).

La importancia de esta acción citotóxica ha motivado la puesta a punto de diversos métodos de análisis para la extracción de los componentes podofilínicos (33, 41, 42, 48).

Algunos componentes de los *Podophyllum*, tales como los ácidos grasos (29, 45, 46) y pigmentos como la quercetina

* Este trabajo ha sido efectuado con una ayuda de la Asociación Española Contra el Cáncer.

(8), en *Podophyllum emodi* y *peltatum* o la isohamnetina (50) en *Podophyllum sik-kimensis*, se conocían ya con anterioridad. En 1880, PODWYSSOTIZKI (30) aisló la podofilotoxina, un lignano que se encuentra en gran cantidad en cualquier podofilina. Sin embargo, su estructura química no se ha conocido hasta 1952 (14, 36), siendo considerada en la actualidad como el más importante principio activo antimitótico de la podofilina. Por esta razón, la podofilotoxina (1-hidroxi, 2-3-lactona-4(3',4',5'-trimetoxifenil), 6-7-dioximetilentetralina) y su isómero, la picropodofilina que se aísla junto con la primera y que en ocasiones ha sido confundida con ésta, han constituido la base de un elevado número de trabajos (11, 18, 27, 35, 37-39, 47) en los que se estudia su campo de acción biológica, así como la posibilidad de obtener diversos derivados con la esperanza de encontrar una mayor actividad antimitótica. De estos derivados merecen destacarse la nitropodofilotoxina, obtenida por AUTERHOFF y THEILACKER (3), y los ácidos podofilínicos, de reconocido carácter citostático, que han sido objeto de estudios recientes (24, 32). Otros investigadores han pretendido la síntesis de productos de estructuras semejantes a la podofilotoxina o picropodofilina (31, 49), pero sus características terapéuticas no han sido tan acusadas.

Estrecha relación estructural con la podofilotoxina guarda las α y β peltatinas, lactonas aisladas por HARTWELL y DETTY del *Podophyllum peltatum* (13) y cuya estructura fue completamente establecida por SCHRECKER y HARTWELL (40). Estas peltatinas también se han revelado citotáticamente activas, como lo muestran los trabajos de AUTERHOFF y MAY (2) y ZOZULYA *et al.* (50), lo que no es extraño dada su semejanza estructural con la podofilotoxina. Por este motivo, posee carácter antimitótico la 4'-desmetil-podofilotoxina, aislada de la *Podophyllum emodi* por WALL (26) y diversos glucósidos de todos estos compuestos (17, 41-44).

La acción biológica de la podofilina ha sido, desde hace años, objeto de estudio en este Servicio de Cancerología, y en 1960 se obtuvo un preparado, denominado LH-22/B, por tratamiento de un extracto podofilínico con glucosamina (12), cuyas propiedades citostáticas fueron comprobadas sobre tumores experimentales (19, 20). Su acción terapéutica sobre tumores humanos ha sido también ampliamente demostrada (1, 21, 22).

Continuando los estudios que sobre los extractos de la planta se vienen desarrollando en este Servicio, concretamente, sobre la variedad *Emodi*, se han investigado en ella productos lactónicos distintos de la podofilotoxina y picropodofilina, que pudieran tener interés desde el punto de vista carcinostático.

Como es conocido, diversas lactonas (concretamente el caso de la podofilotoxina y compuestos afines) poseen propiedades inhibitorias del crecimiento. Cabría, pues, la posibilidad de que estos productos lactónicos aún no identificados y presentes en los extractos podofilínicos, fueran causantes, junto con la podofilotoxina, de sus efectos biológicos. La posible acción antitumoral de las mencionadas lactonas, ha motivado a iniciar una serie de investigaciones con vistas a su separación y análisis antimitótico, tema que constituye el objeto del presente trabajo.

Material y métodos

Para el estudio de estos productos lactónicos se ha partido de un extracto de podofilina *emodi*, suministrado por la casa GEYER, de Stuttgart, con el nombre de *Podophyllum emodi aquos. sicc.*, cuyo procedimiento de obtención nos es desconocido. Los productos lactónicos se han separado atendiendo a su solubilidad en distintos disolventes, obteniéndose así cuatro extractos:

1. Productos solubles en cloroformo y benceno, denominados en principio, lac-

tonas cumarínicas. 2. Solubles en cloroformo y no en benceno. 3. Insolubles en cloroformo y solubles en éter. 4. Insolubles en cloroformo y éter.

Se preparan soluciones inyectables de los mismos, así como de sus diversas subfracciones. Se ha estudiado la actividad antimitótica *in vivo* frente al carcinoma ascítico de Ehrlich, mediante técnicas de recuentos mitóticos puesta a punto por uno de nosotros (23).

A) TÉCNICAS DE AISLAMIENTO

Extracción de lactonas de naturaleza cumarínica. Para su extracción se ha seguido el procedimiento utilizado por ESTÉVEZ y GONZÁLEZ (9) para la separación de cumarinas de la *Ruta pinnata*. Se disuelven 25 g del extracto *Podophyllum emodi* *aquos. sicc.* en caliente, en alcohol de 96°. La solución alcohólica de podofilina se destila con agua hasta eliminación total del disolvente y desaparición del olor aromático en el destilado, con lo que quedan eliminados los aceites esenciales. La solución acuosa que resulta después de arrastrar con vapor de agua, se extrae a reflujo, durante tres horas con cloroformo. La fase clorofórmica se decanta y la fase acuosa se conserva para investigar lactonas de otros grupos que pudieran existir (A). (Véase apartado 3.)

El extracto clorofórmico anterior constituido por lactonas de naturaleza cumarínica y otros productos, se destila a sequedad y el residuo se somete, durante una hora, a un tratamiento hidrolítico en medio ácido, calentando a reflujo con 300 ml de $\text{SO}_4\text{H}_2 \cdot 3\text{N}$. Después de separar por decantación la fase acuosa ácida, del sólido residual, se somete éste a una extracción durante tres horas a reflujo con 150 ml de éter de petróleo, fracción 60-80° C, después de lo cual se decanta el éter de petróleo y se extrae el residuo con benceno, por calentamiento durante tres horas. El producto no soluble se conserva, con el fin de investigar otras lactonas (B). (Véase apartado 2.)

La disolución bencénica anterior se abandona durante doce horas, al cabo de las cuales cristalizan podofilotoxina y picropodofilina juntas (lo que puede comprobarse por cromatografía de capa fina) que se filtran y separan. Los líquidos bencénicos (aguas madres) se extraen, seguidamente con 150 ml de NaOH al 4 %, lavando varias veces con agua hasta obtener reacción neutra de las aguas de lavado. La solución bencénica que contiene los productos neutros se destila a sequedad y el residuo se somete a una hidrólisis alcalina, calentando a reflujo, durante dos horas con 80 ml de agua, tras lo cual se hierve a reflujo con 200 ml de benceno. Se deja enfriar, decanta y separa la fase bencénica.

La fase acuosa se acidifica con SO_4H_2 al 6 % hasta pH 4, dejando reposar durante tres horas a fin de permitir el cierre de anillos lactónicos, después de lo cual se extrae dicha solución con 250 ml de benceno. La solución bencénica se lava con sosa al 5 % para eliminar productos de naturaleza ácida. Posteriormente se lava con agua hasta obtener una reacción neutra de las aguas de lavado y finalmente se concentra a sequedad. El producto resultante, 0,162 g, se presenta como un sólido blanco amarillento constituido por lactonas de naturaleza cumarínica.

Extracción de lactonas solubles en cloroformo e insolubles en benceno. El residuo no soluble en benceno (B) se disolvió en 150 ml de cloroformo, después de lo cual se extrae con 80 ml de NaOH al 5 %. La solución clorofórmica así extraída se destila a sequedad, y el residuo, como en el caso anterior, se somete durante dos horas a hidrólisis con 50 ml de NaOH al 10 %. La solución alcalina residual se extrae con 100 ml de cloroformo y la fase acuosa alcalina se separa y se lleva a pH 4 con SO_4H_2 al 6 % dejándose reposar durante tres horas.

La solución acuosa ácida se extrae con 150 ml de NaOH al 4 % y posteriormente

con agua hasta reacción neutra de las aguas de lavado. Posteriormente se seca y destila el disolvente. Se obtienen 0,06 g de productos lactónicos.

Extracción de lactonas insolubles en cloroformo y solubles en éter. La fase acuosa (A) (ver apartado 1), ya extraída con cloroformo y que, por tanto, contiene productos insolubles en este disolvente, se extrae a reflujo, durante tres horas con 300 ml de éter etílico. Las etapas siguientes se llevan a cabo como con el caso de extracción de lactonas cumarínicas, pero sustituyendo el cloroformo o benceno por éter. Se obtienen 0,02 g de estos productos lactónicos.

Estudio de la fracción insoluble en éter y cloroformo. Se extraen en soxhlet 25 g del extracto *Podophyllum emodi aquos. sicc.*, primero con cloroformo y posteriormente con éter, hasta que ninguno de estos disolventes presentan color. El producto no extraído se somete a hidrólisis ácida durante una hora con 300 ml de $\text{SO}_4\text{H}_2\text{3N}$. Después se separa la fase acuosa, se somete el residuo a hidrólisis básica durante dos horas con 80 ml de NaOH al 10 %, después de lo cual se extrae con éter la solución alcalina. Posteriormente se acidifica esta solución hasta pH 4 y se deja reposar durante tres horas.

La suspensión ácida se filtra y el producto filtrado se trata en frío con 10 ml de NaOH al 4 %, con lo que se disuelve totalmente, lo que prueba la inexistencia de lactonas en esta fracción.

Todos los extractos antes citados se sometieron a estudio cromatográfico tanto analíticos como preparativos, después de lo cual se ensayaron, a fin de comprobar su acción biológica.

B) IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO CROMATOGRÁFICO

Cromatografías de capa fina analítica. Los cromatogramas se llevan a cabo utilizando placas de Kiesselgel G Merk, de

1/4 mm de espesor. Tras diversas experiencias, se comprobó que el mejor sistema eluyente resulta ser cloroformo-éter etílico 1:1. Después de la elución se revelaron las placas con ácido sulfúrico al 50 %. Los productos lactónicos se ponen de manifiesto como manchas de color violeta-rojizo. Los Rf pueden apreciarse en la figura 1.

Cromatografía de capa fina (C.C.F.) preparativa. Se lleva a cabo utilizando placas de 20 × 20 cm con Kiesselgel G, de 2 mm de espesor, como soporte. Las placas se someten a cuatro eluciones sucesivas, utilizando cloroformo puro como disolvente de desarrollo. El revelado se lleva a cabo con luz ultravioleta de 366 mμ, pudiéndose ver cinco bandas fluorescentes: la correspondiente a I, de fluorescencia blanca amarillenta; la de II, de fluorescencia amarilla; la de IV, con fluorescencia blanca intensa; VI, fluorescencia verdosa, y VII, azul. Todas estas bandas se recortaron bajo la luz ultravioleta y se extrajeron por separado, con cloroformo, en frío. Las C.C.F. comparativa de un filtrado de cada uno de estos extractos con el conjunto de lactonas y reveladas con ácido sulfúrico al 50 % demuestran que, efectivamente, las cinco lactonas habían sido aisladas en forma pura inalterada.

La figura 1 muestra un cromatograma correspondiente a la mezcla de lactonas cumarínicas. En la misma figura se puede ver que tanto la podofilotoxina como la picropodofilina (el Rf de ambas en este sistema es idéntico) han sido totalmente eliminadas debido a la casi completa insolubilidad de estas dos lactonas en benceno en frío.

En el cromatograma se han numerado, para hacer referencias a ellas, estas lactonas, de I (la siguiente al origen) a VII (la de mayor Rf). Observadas a la luz ultravioleta de 366 mμ cinco de estas sustancias (I, II, IV, VI y VII) presentan fuerte fluorescencia. Por ello se han elegido estas

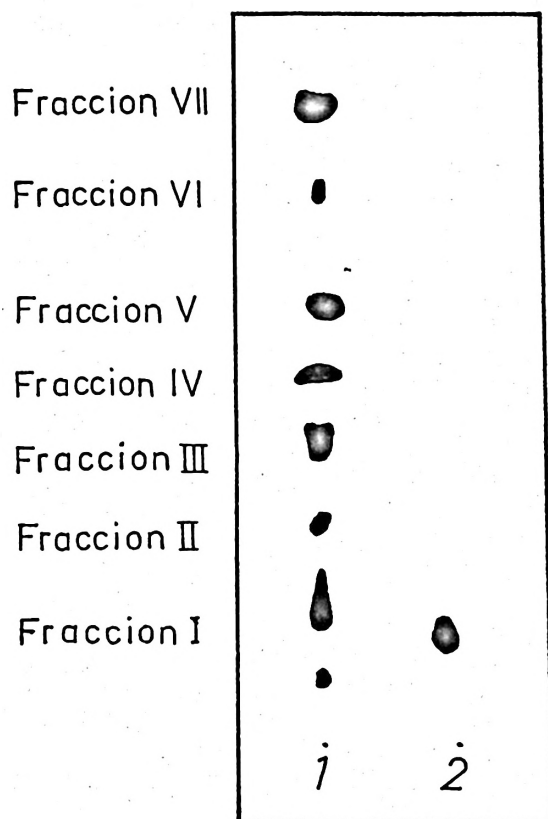


Fig. 1. Cromatografía en capa fina de extractos de *Podophyllum emodi* aquo.

1. Mezcla de lactonas cumarínicas. 2. Podofilotoxina.

cinco lactonas para separarlas en forma pura utilizando la cromatografía preparativa de capa fina. Para tal fin, eluímos la mezcla de lactonas cumarínicas y separamos, observando a la luz ultravioleta, las bandas correspondientes a las ya citadas. Posteriormente, las cromatografías de los productos extraídos de dichas bandas nos confirmaron la pureza de los mismos. En vista de ello, preparamos, para sus estudios biológicos, no sólo el conjunto de las lactonas cumarínicas (lactonas C), sino cada una de éstas, aislada pura.

Los restantes grupos de lactonas también fueron analizados en C.C.F. Las lactonas solubles en cloroformo e insolubles en benceno (lactonas N), nos indican sólo

dos productos (fig. 2), claramente separados y ninguno de los cuales es podofilotoxina o picropodofilina. La C.C.F. de las lactonas insolubles en cloroformo (lactonas E) revela muy bien tres únicas lactonas, cuya posición relativa a la podofilotoxina puede verse en la figura 2.

En estos dos grupos no se ha llevado a cabo ningún intento de separación de lactonas puras (cosa que, por otra parte, sería extraordinariamente sencilla) por la escasa actividad antimitótica que muestran ambas mezclas de lactonas, como puede apreciarse en el apartado siguiente.

C) PREPARACIÓN DE SOLUCIONES INYECTABLES

Tras diversas pruebas en busca de solventes no tóxicos, para poder ser inyectados, utilizamos oleato de etilo. Si bien la

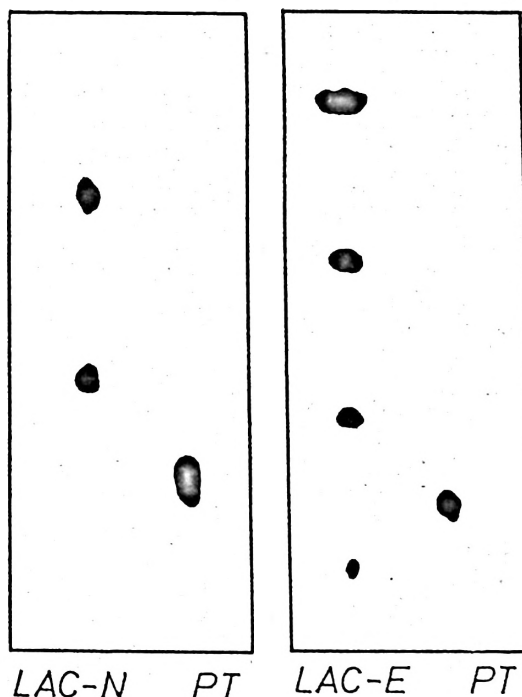


Fig. 2. Cromatografía en capa fina de lactonas cumarínicas de *Podophyllum emodi* aquo. LAC-N: Lactonas solubles en cloroformo e insolubles en benceno; LAC-E: Lactonas insolubles en cloroformo; PT: Podofilotoxina.

solubilidad en este disolvente es buena, la adsorción orgánica resulta ser demasiado lenta para el estudio de los índices de división mitótica. Por ello preferimos emplear la mezcla propilenglicol-agua, 3:7.

Se prepararon suspensiones disolviendo el producto correspondiente en propilenglicol y posteriormente adicionando agua hasta alcanzar la proporción 3:7, con ello se logra una suspensión fina y homogénea. Momentos antes de inyectar esta suspensión se calienta a 80° C y se deja enfriar hasta 38° C, temperatura a la que se aplica.

Las muestras estudiadas biológicamente fueron las siguientes: 1) Lactonas cumarínicas totales (LAC-C). 2) Fracción cromatográfica I de las lactonas C. 3) Fracción cromatográfica II de las lactonas C. 4) Fracción cromatográfica IV de las lactonas C. 5) Fracción cromatográfica VI de las lactonas C. 6) Fracción cromatográfica VII de las lactonas C. 7) Lactonas no cumarínicas, solubles en cloroformo pero no en benceno (LAC-N). 8) Lactonas no cumarínicas insolubles en cloroformo pero solubles en benceno (LAC-E). 9) Podofilotoxina. Esta última la utilizamos como control comparativo de los efectos obtenidos en las anteriores fracciones.

D) ESTUDIOS BIOLÓGICOS

A. *Determinación dosis tolerable-ratón*

Empleamos ratones SWR (grupos de 6 animales) de 20 g. Inyectado por vía intraperitoneal, el oleato de etilo resulta tóxico en las dosis ensayadas (0,5 y 1 ml) en concentración al 0,7 % de lactonas totales.

La mezcla propilenglicol-agua, 3:7 no es tóxica en concentraciones de producto a estudiar de 0,5 mg/20 g de animal.

Todas las muestras investigadas se basan en una dosis única, vía intraperitoneal, de 0,2 ml de solución (propilenglicol-agua) al 0,5 % por 20 g peso ratón.

Comparativamente utilizamos podofilotoxina en proporción 200 γ /20 g, adminis-

trada por vía intraperitoneal en dosis única.

B. *Estudio sobre el carcinoma ascítico de Ehrlich*

Utilizamos ratones S.W.R. machos de 20 g. Se les inyecta 0,5 ml de suspensión ascítica de carcinoma de Ehrlich, dividiéndose en grupos de 6 animales cada experiencia.

A los cuatro días de implantación del tumor se efectúa toma de líquido ascítico por punción abdominal (hora 0) para determinar el número y reparto de divisiones mitóticas sobre 1000 células del exudado.

Seguidamente se inyecta vía intraperitoneal los productos a investigar, efectuándose tomas de líquido ascítico por punción en condiciones asépticas con los siguientes intervalos de tiempo: 2, 4, 8, 12, 18, 24, 36, 48, 60 y 70 horas tras la administración del producto.

Las extensiones han sido teñidas por May Grünwald-Giemsa y Papanicolau. El recuento del índice divisional se efectúa sobre 1000 células, indicándose también el reparto y anomalías de las mitosis en sus distintas fases.

Resultados y discusión

Mediante técnicas de solubilidad en distintos solventes, se han aislado varios grupos de productos lactónicos procedentes de la planta *Podophyllum emodi*. Tanto para los estudios de extracción química como para los análisis biológicos, se ha utilizado como patrón comparativo la podofilotoxina, cuya acción antimitótica es hoy ampliamente conocida.

Los tres grupos de lactonas se han extraído atendiendo a su solubilidad en cloroformo y benceno (LAC-C); cloroformo pero no en benceno (LAC-N) y en éter pero no en cloroformo (LAC-E). El grupo más rico en lactonas corresponde a la fracción LAC-C que está integrado por siete elementos distintos. Ellos se separan

Tabla I. Variaciones del ritmo mitótico en el carcinoma ascítico de Ehrlich a través de recuentos sucesivos producidas por productos lactónicos procedentes del *Podophyllum emodi*.

Lactonas cumarínicas totales (LAC-C); lactonas insolubles en cloroformo pero solubles en benceno (LAC-E); lactonas solubles en cloroformo pero no en benceno (LAC-N); podofilotoxina (PT). Los valores corresponden a las medias totales por mil células.

Producto	Horas								
	0	2	4	8	12	18	24	36	48
LAC-C	43,1	40,1	85,3	58,5	41,2	47,8	38,5	43,8	40,5
LAC-N	35,6	46,6	61,2	39,4	29,2	41,8	41,8	36,2	36,7
LAC-E	47,2	16,5	19,5	41,7	41,0	39,7	35,5	38,5	30,5
PT	30,5	25,0	33,3	41,6	61,3	72,3	72,0	32,3	38,0

mediante cromatografía en capa fina analítica (eluyente, cloroformo éter etílico 1:1) y se hacen visibles en la placa utilizando como revelador ácido sulfúrico al 50 %. Los mismos componentes se aislaron posteriormente por cromatografía de capa fina preparativa.

Aprovechando su distinto Rf se logran extraer las fracciones I, II, IV y VII, que ofrecen fuerte fluorescencia a la luz ultravioleta (fig. 1).

El análisis cromatográfico de las LAC-N y LAC-E demuestra que ellas se encuentran a su vez compuestas respectivamente por 2 y 3 lactonas (fig. 2). Su baja actividad bloqueadora de la mitosis nos ha hecho desistir de su aislamiento individual.

Acción frenadora de la mitosis con lactonas cumarínicas totales (LAC-C)

Muestran fuerte inhibición divisional con bloqueo metafásico, cuya máxima acción aparece a las cuatro horas de administrado el producto, para desaparecer a las doce horas. Este bloqueo viene acompañado de desorganización del huso acromático con aparición de numerosas metafases C (mitosis colchicínicas). Ello condiciona simultáneo descenso del número de anafases y telofases (descenso de un 15,6 ‰ a un 6,8 ‰). Si bien la recuperación divisional es casi completa a las 12

horas, persisten elevadas las metafases C (tabla I, fig. 3).

Comparativamente analizada con la podofilotoxina destaca la más precoz apari-

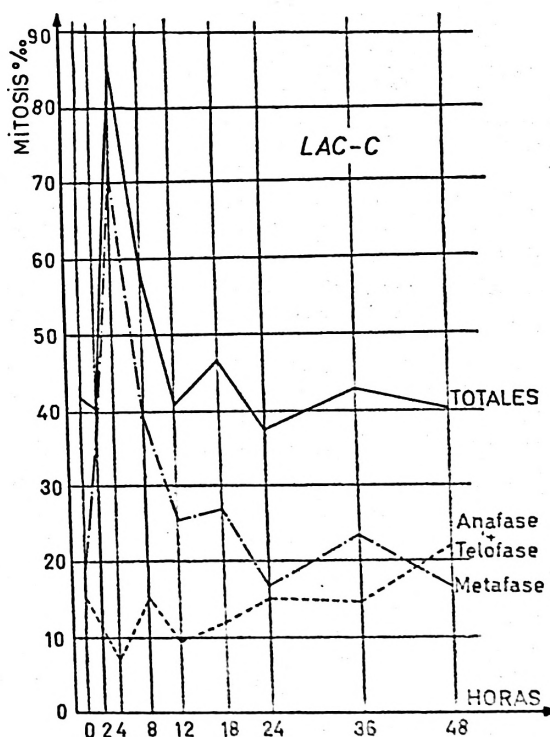


Fig. 3. Evolución del ritmo mitótico del carcinoma ascítico de Ehrlich por la acción de las lactonas cumarínicas (LAC-C).

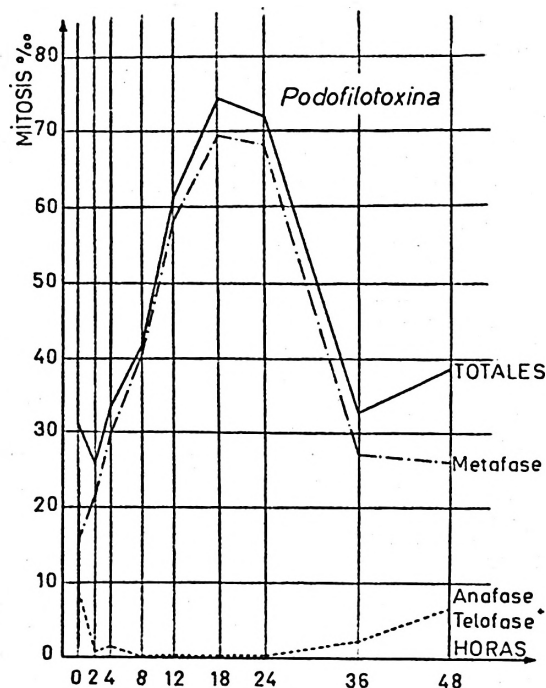


Fig. 4. Variaciones del ritmo mitótico del carcinoma de Ehrlich por la influencia de la podofilotoxina (PT).

ción de metafases C. que alcanza su máximo a las 4 horas. Esto equivale a la hora 18 en la podofilotoxina. El efecto, sin embargo, es más pasajero, ya que a las 12 horas tiende a normalizarse el proceso divisional, situación que en la podofilotoxina ocurre a las 36 horas de administrada una dosis única (200 γ) (tabla I, figura 4).

Se trata, pues, de un veneno metafásico de acción colchicínica con rápida instauración pero de corta duración.

Acción frenadora de la mitosis con lactonas solubles en cloroformo e insolubles en benceno (LAC-N)

También ejercen bloqueo metafásico tipo colchicínico, al igual que las LAC-C. Se instaura a las 4 horas. El número de células en división pasa de 35,6 a 61,2‰.

fundamentalmente a expensas de metafases C.

A las 12 horas de administrado el producto se establece depresión divisional (29,2‰ frente a 35,6‰ en la hora cero) para recuperarse a las 18 horas en su totalidad (tabla I, fig. 5).

Comparativamente analizado con la podofilotoxina y las LAC-C, su acción es menos intensa tanto en bloqueo metafásico como extensión de actividad (sólo 8 horas frente a 36 de podofilotoxina y 12 de LAC-C).

Parecen ejercer estas lactonas una alteración en la formación del huso acromático, rápido pero pasajero y menos efectivo que el conjunto de compuestos que forman las llamadas por nosotros LAC-C.

Acción frenadora de la mitosis en lactonas insolubles en cloroformo (LAC-E)

Su acción bloqueadora de la mitosis se ejerce directamente sobre todo el conjunto de células en división a las 2 y 4 horas

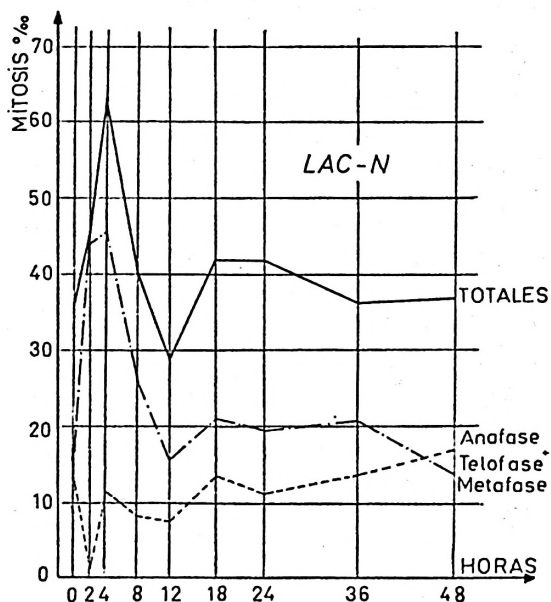


Fig. 5. Modificaciones de la división celular en el carcinoma ascítico de Ehrlich causados por las lactonas solubles en cloroformo e insolubles en benceno (LAC-N).

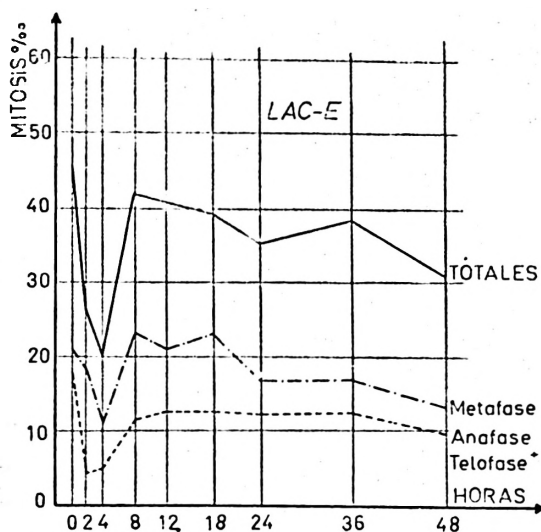


Fig. 6. Acción de las lactonas insolubles en cloroformo sobre el ritmo mitótico del carcinoma ascítico de Ehrlich.

tras la administración del producto; los índices medios descienden de 47,5 mitosis por mil a la hora cero a 16,5 y 19,75 ‰, respectivamente, a las 2 y 4 horas.

Sin embargo, no muestran frenación metafásica del mismo género que la ejercida por las LAC-C y LAC-N. Esporádicamente se encuentran aisladas metafases C.

A las 8 horas de administrado el producto, la media de divisiones de estos seis animales se normaliza (tabla I, fig. 6).

No puede compararse esta acción con la vista por la administración de podofilotoxina. El efecto inhibidor mitótico no sólo es moderado, sino también muy pasajero (4 horas).

Estudio de la actividad antimitótica de las fracciones I, II, IV, VI, VII, de las lactonas cumarínicas totales (LAC-C)
La separación cromatográfica de las LAC-C ha permitido desglosar el análisis *in vivo* de alguna de las fracciones componentes del grupo LAC-C. Su análisis se efectúa independiente sobre respectivos grupos de 6 ratones S.W.R. portadores de carcinoma de Ehrlich.

Destaca la pobre acción antimitótica que presentan estas fracciones independientemente (tabla II). Todas ellas ejercen frenación pasajera del conjunto mitótico a las 2 horas, pero se recupera entre las 4 y 12 horas.

La acción bloqueadora de la metafase es muy discreta, siendo prácticamente nula en las LAC-C I, LAC-C II y LAC-C VI. Por el contrario, las LAC-C IV y LAC-C VII presentan efecto colchicínico. Este aparece más tardíamente (a las 12 horas) que cuando se inyectan en bloque, aproximándose más su actividad a la podofilotoxina.

Como en los otros casos el bloqueo metafásico viene acompañado de mitosis C con desorganización del huso acromático.

Tabla II. Estudio comparativo del ritmo mitótico del carcinoma ascítico de Ehrlich tras la administración de las lactonas cumarínicas totales (LAC-C), así como de las distintas fracciones aisladas por cromatografía.

Fracción	Horas										
	0	2	4	8	12	18	24	36	48	60	72
LAC-C	43,1	40,1	85,3	58,5	41,2	47,8	38,5	43,8	40,5	—	—
LAC-C I	43,2	26,2	29,2	39	39,2	36	43,2	42,2	49,7	46	38,5
LAC-C II	47,5	25,5	24	55,2	47,5	44,2	54,7	38	50,6	45,7	49,7
LAC-C IV	57,2	10	27	37,2	44	43,3	43,7	41	40	44,5	59,7
LAC-C VI	57,2	18	24,5	43	37,5	46	35,2	40,2	39,9	43,7	47
LAC-C VIII	46,2	11,5	20,5	32,2	42,5	27,7	36,5	32,2	40	40,5	39,2

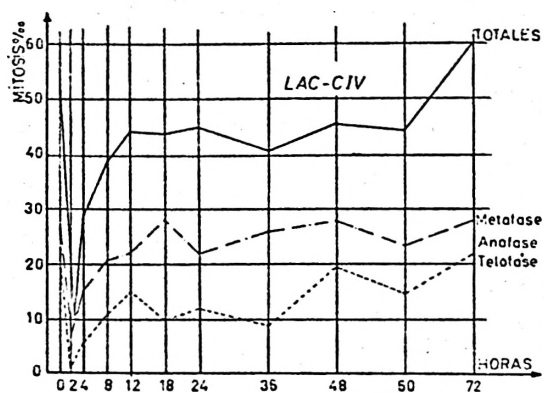


Fig. 7. Acción de la fracción IV de las lactonas cumarínicas sobre el ritmo mitótico del carcinoma ascítico de Ehrlich.

Sin embargo, no inhiben por completo la formación de anafases y telofases, expresión de que el bloqueo metafásico es muy incompleto. En las figuras 7 y 9 se esquematiza la modulación evolutiva del conjunto mitótico en aquellos dos productos cuya acción ha sido más marcada (LAC-C IV y LAC-C VII). El descenso del total de mitosis en la LAC-C IV fue de 57,2 a 10 ‰ a las 2 horas. En la LAC-VII este mismo índice desciende de 46,5 a 11,5 ‰ también dentro de las 2 horas.

A pesar de que el el recuento de los índices divisionales de todo este grupo se

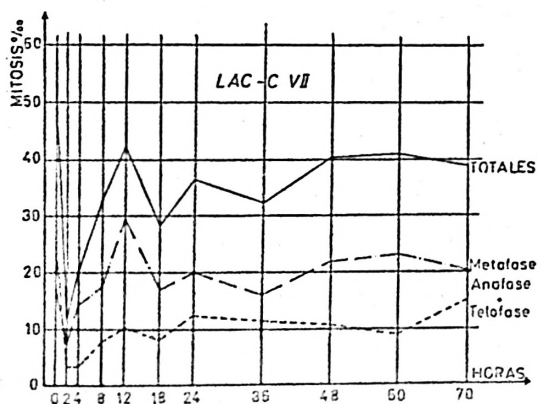


Fig. 8. Acción de la fracción VII de las lactonas cumarínicas sobre el ritmo mitótico del carcinoma ascítico de Ehrlich.

extendió a las 60 y 72 horas, tras la administración de los productos, su resultado fue escaso, ya que normalizado el índice divisional del carcinoma ascítico de Ehrlich entre las 12 y 24 horas, continúa de tal modo con variaciones no significativas en el transcurso de las restantes 48 horas.

Llama la atención esta baja acción de los componentes aislados del complejo lactónico LAC-C. El motivo de su aislamiento fue el seleccionar cuál de todas estas siete lactonas era más activa y por ello causante del efecto colchicínico bloqueador metafásico presente en el conjunto. Parece evidente que la acción frenadora metafásica de las LAC-C no se debe a la actividad de uno de sus componentes sino más bien a la suma de efectos que los siete ejercen entre sí.

Resumen

Partiendo del *Podophyllum emodi*, mediante técnicas de solubilidad en cloroformo, benceno y éter se extraen tres grupos diversos de lactonas que corresponden a lactonas cumarínicas totales (LAC-C), lactonas solubles en cloroformo e insolubles en benceno (LAC-N), lactonas insolubles en cloroformo (LAC-E). El empleo de cromatografía en capa fina y preparativa permite desglosar 7 grupos lactónicos del complejo LAC-C, así como del LAC-N y 3 del LAC-E.

Efectuada su extracción y pruebas de toxicidad aguda en ratones, se administran dosis tolerables de los distintos compuestos por vía intraperitoneal en ratones portadores del carcinoma ascítico de Ehrlich.

Se analiza el ciclo mitótico durante 72 horas mediante frotis sucesivos y tomando como patrón comparativo la podofilotoxina. Aparece fuerte inhibición mitótica con bloqueo metafásico en el grupo de LAC-C. Las llamadas LAC-N también frenan la metafase pero con menor intensidad. En las LAC-E la acción antimitótica es muy baja, careciendo de efecto colchicínico en el bloqueo metafásico.

La acción inhibidora mitótica de todas las lactonas extraídas es inferior al encontrado bajo análogas condiciones experimentales con la podofilotoxina.

Bibliografía

1. ARÉVALO, J.: Tesis Doctoral. Valencia, 1964.
2. AUTERHOFF, H. y MAY, O.: *Planta Medc.*, **6**, 240, 1958.
3. AUTERHOFF, H. y THEILACKER, G.: *Arch. Pharm.*, **297**, 88, 1964.
4. AUTERHOFF, H. y MAY, O.: *Arch. Pharm.*, **291**, 161, 1958.
5. CHATTERJEE, R. y MUKERJEE, S. K.: *Indian J. Physiol. Allied Sc.*, **4**, 61, 1950.
6. CHATTERJEE, R. y MUKERJEE, S. K.: *J. Am. Pharm.*, **41**, 415, 1952.
7. CORTINI, C.: *Caryologi*, **7**, 72, 1955.
8. DUNSTAN, W. R. y HENRY, T. A.: *J. Chem. Soc.*, **73**, 209, 1898.
9. ESTÉVEZ, R. y GONZÁLEZ, A.: *An. Real Soc. Fis. Quim.*, **59-b**, 765, 1963.
10. FREEBERG, I. M.: *J. Invest. Dermatol.*, **45**, 539, 1965.
11. GREGOR, H. P., DOLAR, D. y HOESCHELE, G. K.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 3674, 1955.
12. HADHANYI, A. y LLOMBART, A., JR.: *Med. Española*, **258**, 13, 1960.
13. HARTWELL, J. L. y DETTY, W. E.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 246, 1950.
14. HARTWELL, J. L. y SHRECKER, A. W.: *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 2909, 1951.
15. KAMINETZKY, H. A., GREW, E. A. MC. y PHILLIPS, R. L.: *Obstet. Gynecol. Survey*, **14**, 1, 1959.
16. KLINE, T. S.: *And. J. Pathol.*, **41**, 477, 1962.
17. KUHN, M. y WARBURG, A. V.: *Helv. Chim. Acta*, **46**, 2127, 1963.
18. KUTTEL, D.: *Gyogyszereszet*, **7**, 131, 1963.
19. LINDNER, J., BECKER, K., LLOMBART, A., JR. y HADHANYI: *Rev. Clin. española*, **86**, 3, 1962.
20. LLOMBART, A., JR. y HADHANYI, A.: *Med. Española*, **263**, 5, 1961.
21. LLOMBART, A., JR., ESPINOSA, J. y JUAN MARCO, A.: *Rev. Clin. Española*, **83**, 1, 32, 1961.
22. LLOMBART, A. y LLOMBART, A., JR.: «Simposium sobre mitosis e inhibidores en la quimioterapia oncológica». Madrid, junio de 1964.
23. LLOMBART, A., JR.: *Rev. Medicina Española*, **385**, 404, 1962.
24. MEIER-RUGE, W., KALBERER, F. y GRAUWILER, J.: *Klin. Wochschr.*, **42**, 1024, 1964.
25. MILES STANDISH, S. y SHAFER, W. G.: *Arch. Pathol.*, **72**, 166, 1961.
26. NADKARNI, M. V., HARTWELL, J. L. MAURY, P. B. y LEITER, J.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 1308, 1953.
27. NEUKOMM, S. y DE TREY, M.: *Oncología*, **14**, 219, 1961.
28. PHILLIPS, R. A., LOVE, A. H. G. MITCHELL, T. G. y NEPTUNE, E. M.: *Nature*, **206**, 1367, 1965.
29. PODWYSSOTZKI, V.: *Arch. Exper. Path. u. Pharmacol.*, **13**, 29, 1880.
30. PODWYSSOTZKI, V.: *Pharm. Z. Russl.*, **20**, 793, 1881.
31. REEVE, W. y MYERS, H.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 4957, 1953.
32. RENZ, J., KUHN, M. y WARTBURG, A. V.: *Ann. Chem.*, **681**, 207, 1965.
33. RUETTIMANN, O. y FLUECK, H.: *Pharm. Acta. Helv.*, **39**, 417, 1964.
34. SEIDLOVA, V., MASINOVA, MALINSKY, J. y SANTAY, F.: *J. Nat. Cancer Inst.*, **18**, 359, 1957.
35. SEREBRYAKOVA, A. P., FILITIS, L. N. y UTKIN, L. M.: *Zhur. Obstrchei Khim.*, **31**, 1731, 1961.
36. SCRECKER, A. W. y HARTWELL, J. L.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 5916, 1963.
37. SCHECKER, A. W. y HARTWELL, J. L.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 752, 1954.
38. SCHRECKER, A. W., MAURY, P. B., HARTWELL, J. L. y LEITTER, J.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 6565, 1955.
39. SCRECKER, A. W., GREENBERG, G. Y. y HARTWELL, J. L.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 1182, 1954.
40. SCHRECKER, A. W. y HARTWELL, J. L.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 5924, 1953.
41. SHIBATA, S., MURATA, T. y FUJITA, M.: *Yakugaku Zasshi*, **82**, 777, 1962.
42. STAHL, U. y KALTENBACH, U.: *J. Chromatog.*, **5**, 478, 1961.
43. STOLL, A., RENZ, J. y WARTBURG, A. V.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 3103, 1954.
44. STOLL, A., WARTBURG, A. V., ANGLIKER, E. y RENZ, J.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 5004, 1954.

45. TANZEN, H.: *Arch. Pharmazie*, **254**, 44, 1916.
46. UMNEY, J. C.: *Pharm. J. & Trans.*, **23**, 994, 1892.
47. VHAKKAVORTY, R. C., SAFKAR, S. K., SEN, S. y MUKERJ, B.: *Brit. J. Cancer*, **21**, 33, 1967.
48. VICENT, D. y SEGONZAC, G.: *Ann. Pharm. Franc.*, **23**, 53, 1965.
49. WALKER, G. N.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 3391, 1953.
50. ZOZULYA, R. N., KUZNETSOVA, G. A., MEL' NIKONA, T. A. y YAKIMOV, P. A.: *Tr. Leningr. Khim. Farmatsevt. Ins.*, **13**, 245, 1961.