

Acción de Ro4-6467 en hígado y riñón de ratas tratadas experimentalmente con dosis terapéutica

Dras.: Elvira Estrada Flores y
Silvia Carrasco González*

Resumen

Se utilizaron el hígado y riñones de 10 ratas macho de la especie *Rattus rattus* cepa Wistar tratadas con dosis de 4.2 mg/kg de Natulán. La droga se administró por vía oral (intubación), durante 21 días, al cabo de los cuales, se sacrificaron los animales y el hígado y los riñones fueron fijados, cortados y teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina. Los resultados revelaron daños en hepatocitos tales como formación de masas sinciciales, retracción del citoplasma y aparente ausencia del mismo, así como también núcleos picnóticos. Las alteraciones en riñón se localizaron en túbulos contorneados donde el producto provocó destrucción de la superficie libre de las células y presencia de núcleos de menor tamaño y ligeramente coloreados. En algunos tubos colectores se formaron cilindros urinarios. Los tubos colectores y las asas de Henle se colapsaron y presentaron núcleos picnóticos.

Introducción

En 1963, Bollag y Grunberg fueron los primeros en hacer notar la actividad antitumoral de los análogos de la hidracina en varios

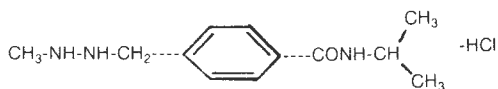
* Lab. de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias, U.N.A.M.

* Profesora de Embriología Humana, Facultad de Medicina, U.N.A.M.

tumores trasplantados en roedores.

Los compuestos eficaces encontrados para la inhibición del área de tumores y baja toxicidad fueron de la fórmula general: R-NH-NH-CH₃; R representa una amplia variedad de radicales orgánicos, particularmente sustituyentes de los grupos bencil, las propiedades biológicas de los compuestos varían en función del radical (Zeller y col., 1963).

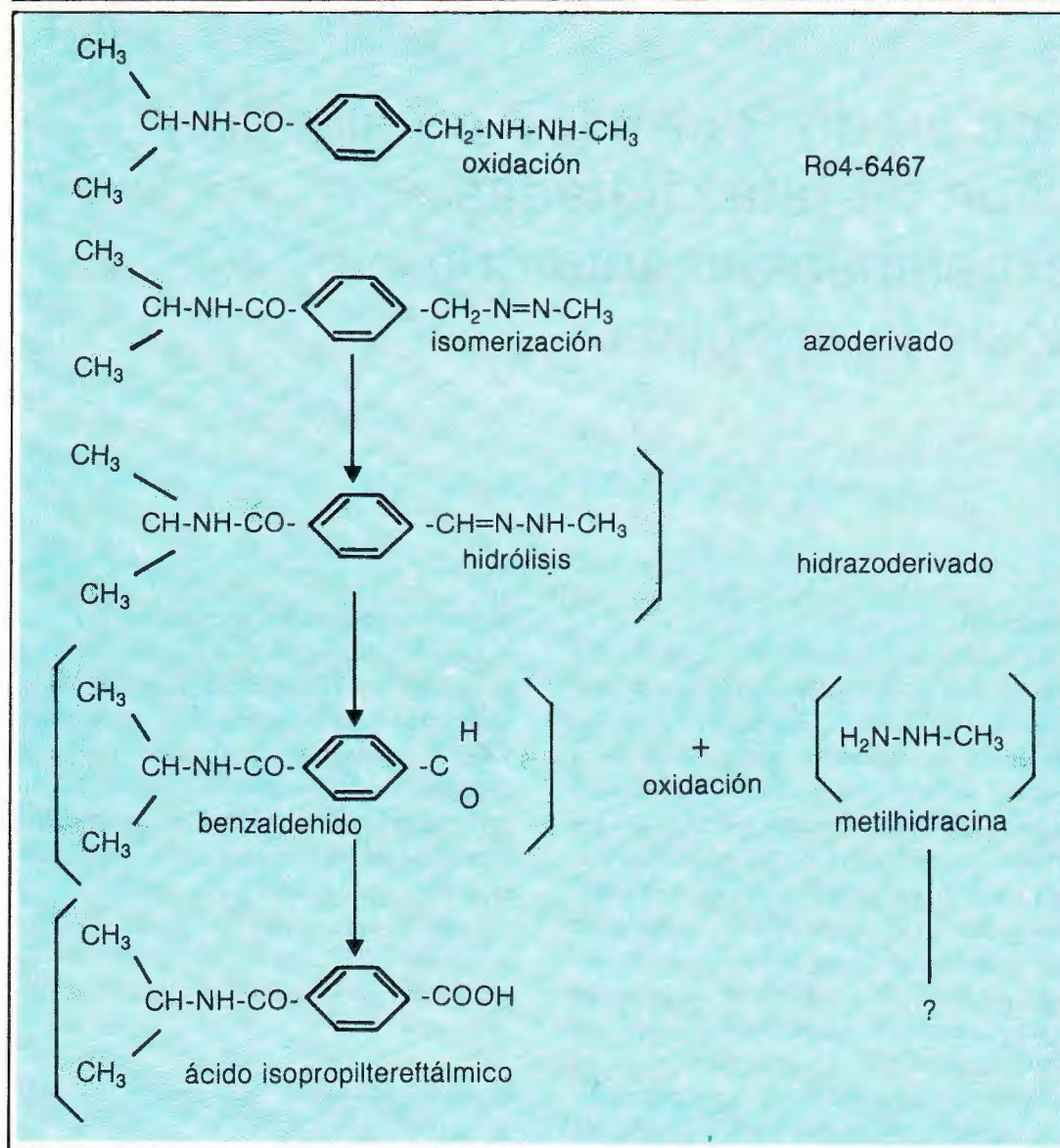
Entre los compuestos efectivos se encontró a la 1-metil-2-p (isopropilcarbamoil) bencilhidracina hidroclicorato (Natulán), cuya fórmula es:



El efecto citostático del Natulán fue probado en varios tumores trasplantados en roedores como el Carcinoma de Erlich, Sarcoma S 180 Crocker, Epitelioma del útero y Epitelioma descrito por Walker (Bollag, 1963a, 1963b, 1964; Bollag y Theiss, 1964).

Mathé y col. (1963), Martz (1964), concluyeron que el Natulán fue de considerable valor en la curación de la enfermedad de Hodgking. Esta droga fue probada en otro tipo de padecimientos, como son: leucemia granulocítica crónica, policitemias y leucemias linfáticas agudas (Gerhartz, 1964), en la leucemia B 1220 implantada intracranealmente y subcutáneamente en ratones (Oliverio y Ke-

Cuadro 1



Ily, 1964).

Todd (1965), consideró al producto efectivo en la curación del linfoma maligno.

En México, el primer estudio clínico al respecto, lo llevaron a cabo Berumen y Franco Guevara (1966), con buenos resultados en pacientes con linfosarcomas.

Estudios realizados por Bollag y Theis (1964), han demostrado que el Natulán no ejerce su actividad en forma selectiva en el tejido del tumor sino que también afecta a otros tejidos de rápida proliferación, princi-

palmente al tejido hematopoyético, a los epitelios germinativos de tubos seminíferos y a los folículos pilosos.

Chaube y Murphy (1964), Tuchmann-Duplessis y Mercier-Parot (1967), en trabajos experimentales realizados con ratas, encontraron que el Ro4-6467, tenía una importante acción teratógena.

Mercier-Parot y Tuchmann-Duplessis (1969), en ratones y Estrada (1982), en ratas, advirtieron una fuerte actividad embriotóxica al administrar el producto.

Fig. 1. Hígado de rata experimental. Presenta masas sinciciales (ms) y núcleos picnóticos (np). 500 X.

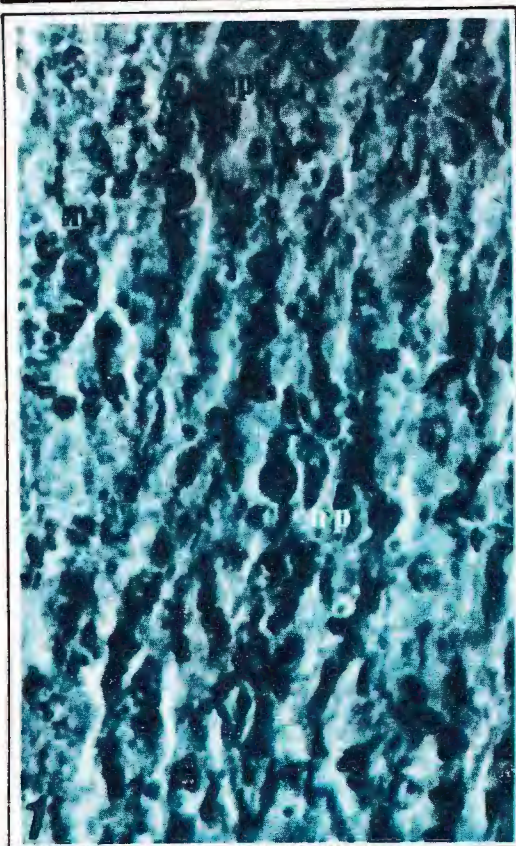
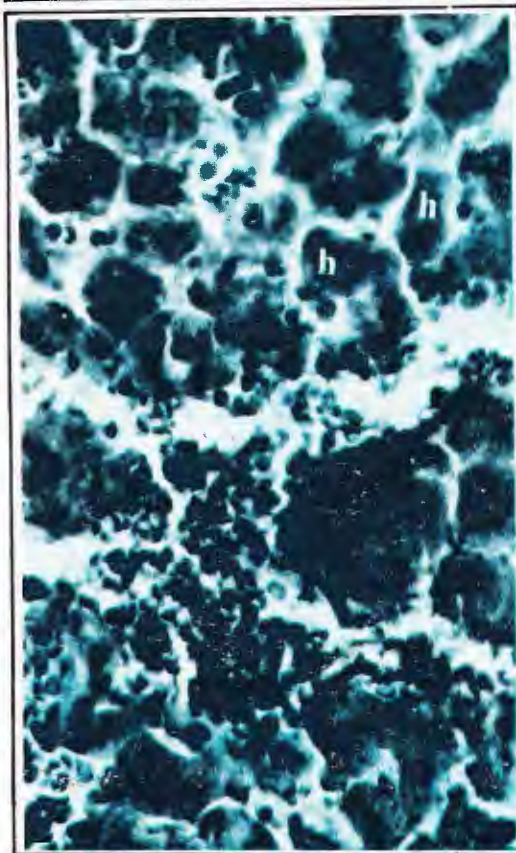


Fig. 2. Hígado de rata experimental. Exhibe retracción citoplásmica en hepatocitos (h). 500 X.



Metabolismo del Natulán

El metabolismo del Natulán fue considerado por varios investigadores. Weitzel y col. (1964), describieron la formación de formaldehído como un producto de la descomposición *in vitro* de la 1-metil-2-p-isopropilcarbamoil-bencilhidracina. Ellos sugieren que el formaldehído así formado actúa potentemente como un agente alquilante.

Zeller y Bollag (1964) y Raaflaub y Schwartz (1965), han postulado que la metilhidracina en solución acuosa (*in vitro*) y en presencia de oxígeno molecular se autooxida fácilmente y forma un compuesto azo con la producción de peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y perhidroxilo, que son responsables directamente del efecto citostático. El compuesto azo se isomeriza resultando un derivado hidrazoico. Posteriormente por hidrólisis se divide la molécula en metilhidracina y un derivado benzaldehído. Este aldehído

es fácilmente acidificado por oxidación dando lugar al ácido isopropiltereftálico que es el metabolito excretado en la orina.

Oliverio y Kelly (1964) y Raaflaub y Schwartz (1965), han encontrado una rápida deshidrogenación de la droga en el plasma y la aparición en la orina de ácido n-isopropiltereftálico. Baggiolini y col. (1965), proponen que la demetilación directa del Natulán es imposible debido a que la droga es rápida y completamente convertida al compuesto azo, el cual todavía lleva el grupo metil, así, el substrato de demetilación puede ser el derivado azo, la hidracina o la monometilhidracina. Esta demetilación parece ocurrir principalmente en el hígado.

Estudios *in vivo* realizados por Reed y Dost (1966), probaron que el mecanismo de acción del Natulán puede estar asociado a la conversión de su grupo metil a metano y CO₂.

Kreis (1970), administró el Natulán a rato-

Fig. 3. Hígado de rata experimental. Manifiesta aparente ausencia de citoplasma en hepatocitos (h). 500 X.

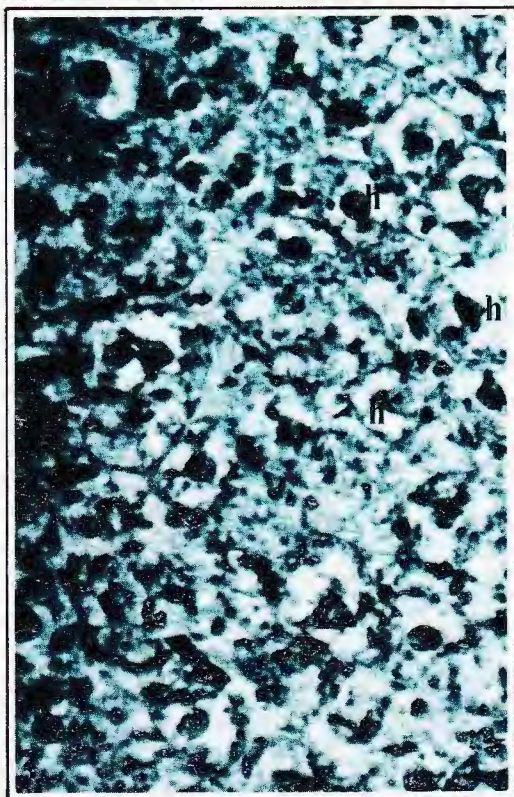
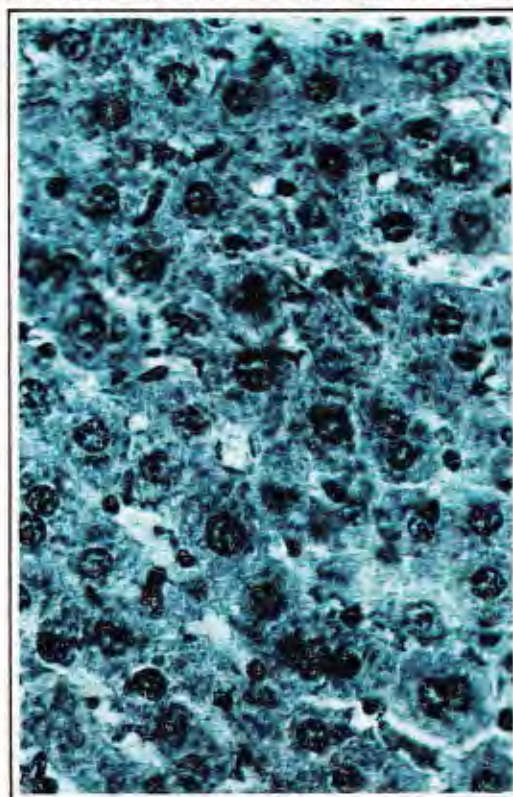


Fig. 4. Hígado de rata testigo. Muestra hepatocitos poligonales con uno o dos núcleos grandes. 500 X.



nes con neoplasma P 815 y observó que el grupo n-metil es parcialmente oxidado a CO_2 y parcialmente usado para metilación del ADN.

Distribución de la droga en el organismo

Bollag (1965), en trabajos experimentales con ratas demostró que la distribución de la droga en el organismo mantiene los mismos niveles en la sangre y en el tejido tumoral; la máxima concentración después se encuentra en hígado y riñón.

Esta droga es absorbida 100 por ciento en el tracto intestinal, una vez en la sangre, su máxima concentración sólo dura 7 minutos, a las 6 horas se ha eliminado por la orina el 55 por ciento a las 24 horas se ha eliminado un 70 por ciento y una pequeña parte es eliminada en las heces fecales (Hidalgo y Montaña, 1967).

Oliverio y Kelly (1964), establecen que en el perro, rata, ratones y en el hombre, aproximadamente un cuarto de la dosis total oral o

parenteral es excretada en la orina como el metabolito ácido n-isopropiltereftálico.

Objetivo de la investigación

Debido a los resultados de Bollag (1965), se propuso aplicar a ratas albinas de la especie *Rattus rattus* cepa Wistar, dosis de 4.2 mg/kg de Natulán considerada como terapéutica para los humanos, con el propósito de detectar mediante la observación de cortes histológicos, si el producto causaba daños en las células de hígado y riñón.

Material y métodos

Se utilizaron 20 ratas macho de 5 meses de edad de la especie *Rattus rattus* cepa Wistar, 10 fueron empleadas como testigo y 10 como experimentales. Los animales del grupo experimental se trataron con dosis de 4.2 mg/kg de Natulán. La droga se administró por vía oral (intubación), durante un período de 21 días, a los testigos se les administró durante el mismo

Fig. 5. Riñón de rata testigo (corteza). Se observan: glomérulo (g), túbulo contorneado proximal (p), túbulo contorneado distal (d). 320 X.

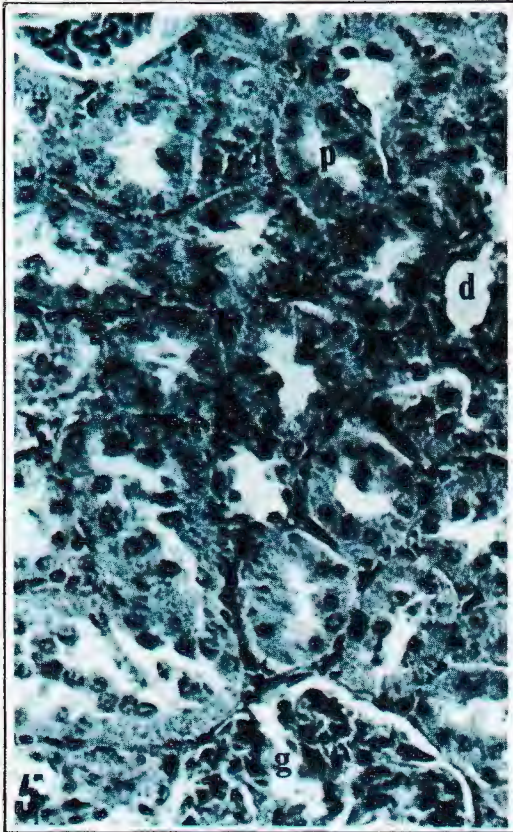
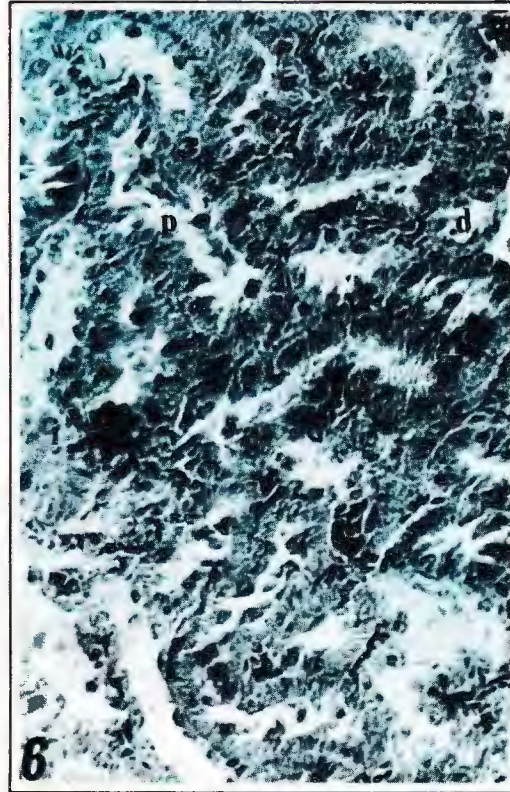


Fig. 6. Riñón de rata experimental (corteza). Presenta: túbulo contorneado proximal (p) y túbulo contorneado distal (d), con estriaciones evidentes, borde libre destruido y luz estrecha. 320 X.



tiempo y por la misma vía agua bidestilada. Al finalizar el tratamiento se sacrificaron los 10 machos testigo y los 10 experimentales para obtener hígado y riñones.

Estos órganos fueron fijados en formol al 10%, incluidos en parafina, cortados de 7μ a 10μ y teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina.

Resultados

Al efectuar la revisión de los cortes histológicos del hígado de los animales tratados se obtuvieron los siguientes resultados:

Los límites celulares de los hepatocitos no son visibles, no se observan cordones celulares clásicos sino masas sinciciales (Fig. 1). Por lo que respecta al citoplasma de los hepatocitos se observan granulaciones basofílicas gruesas, retracción del citoplasma (Fig. 2) y aparente ausencia del mismo (Fig. 3).

Los núcleos observados en los hepatocitos de las ratas experimentales fueron de menor tamaño que los núcleos de los hepatocitos de los animales testigo (Fig. 4), presentaron forma oval o ligeramente triangular. Respecto a la coloración, algunos núcleos presentaron picnosis (Fig. 1). Otros se observaron explotados confundiendo el material nuclear con el citoplásmico.

Al comparar los cortes histológicos del riñón de las ratas testigo (Figs. 5 y 7) con los experimentales se encontró lo siguiente:

Corteza. La superficie libre de las células que forman el epitelio de los túbulos contorneados proximales y distales, se observó destruida. El citoplasma de estas células se presentó acidófilo y con estriaciones evidentes. Los núcleos de las células epiteliales se sitúan en diferentes niveles, se presentan débilmente

Fig. 7. Riñón de rata testigo (médula). Muestra tubos colectores (c) y asas de Henle (a): 320 X.

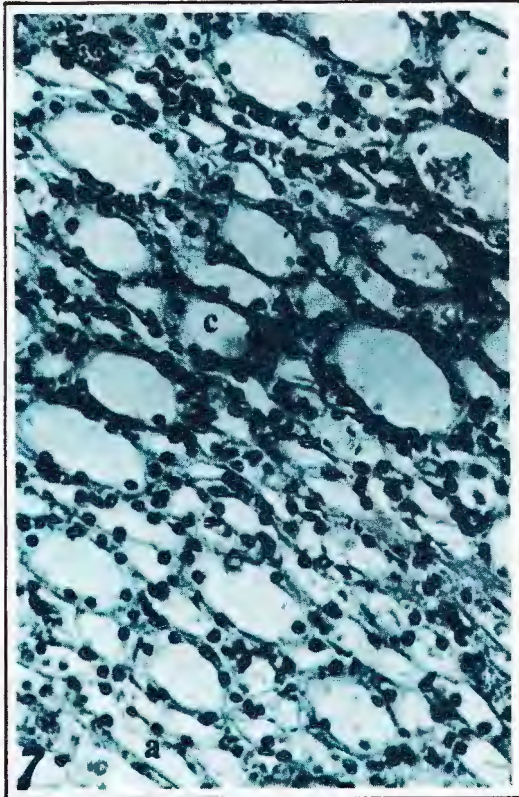
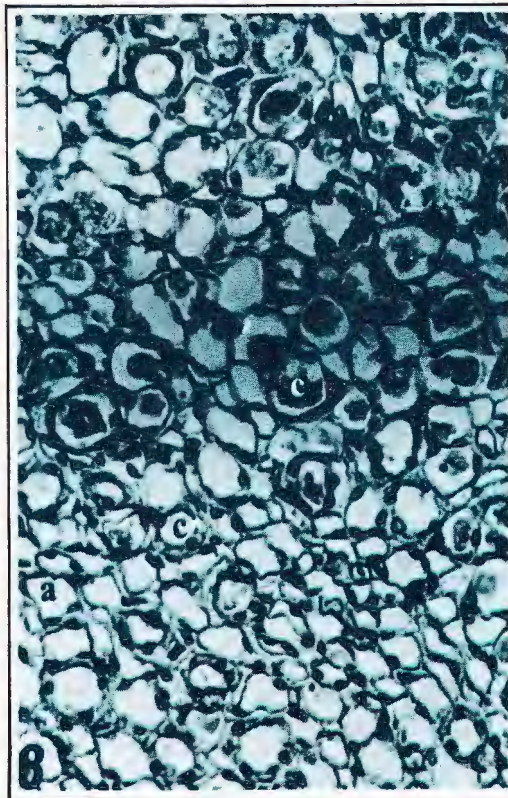


Fig. 8. Riñón de rata experimental (médula). Se aprecia: tubo colector con cilindro urinario (c), asa de Henle (a). Ambos se encuentran colapsados, con núcleos variables en forma y tamaño, algunos picnóticos. 320 X.



teñidos, con tamaños desiguales y formas irregulares. La luz de los túbulos se estrecha en la mayoría (Fig. 6).

Médula. Por lo que se refiere a las asas de Henle y a los tubos colectores se encuentran colapsados. Los núcleos de las células epiteliales de los tubos colectores y asas de Henle son de aspecto variable en forma y tamaño, algunos son picnóticos (Fig. 8). En algunos tubos existen cilindros urinarios que invaden la zona central o luz (Fig. 8).

Discusión

Al efectuar las observaciones en el hígado encontramos daños causados en los hepatocitos que suponemos pueden ser debidos a la alta concentración de la droga en este órgano (Bollag, 1965) y posiblemente a que en este sitio se lleva a cabo la demetilación del Natulán (Baggiolini, 1965).

Las alteraciones encontradas en el riñón del material experimental pueden estar relaciona-

das con la elevada concentración de la droga en este órgano (Bollag, 1965) y de su eliminación por él mismo, ya que de acuerdo con los resultados de Hidalgo y Montaña (1967), se elimina del 55 al 70 por ciento de la droga a través de la orina.

Conclusiones

1. La dosis de Natulán de 4.2 mg/Kg aplicada a las ratas provocó daños en las células de hígado y riñón.
2. Los daños encontrados en el hígado se encontraron a nivel de hepatocitos.
3. Los hepatocitos alterados formaron masas sinciciales, presentaron retracción del citoplasma o ausencia del mismo y núcleos picnóticos.
4. Las alteraciones que se presentaron en el riñón se localizaron en túbulos contornea-

dos, tubos colectores y asas de Henle.

5. En los túbulos contorneados, la droga provocó destrucción de la superficie libre de las células y disminución en el tamaño y coloración de los núcleos.
6. Los tubos colectores y las asas de Henle se colapsaron y presentaron núcleos picnóticos.
7. En algunos tubos colectores se formaron cilindros urinarios.



Bibliografía

1. Baggiolini, M., Bickel, M.H. y Messiha, F.S. Demethylation in vivo of Natulán in tumour inhibiting methylhydrazine derivative. *Experientia* 21, 334-336. (1965).
2. Berumen, L. y Franco-Guevara, G. Ensayo de tratamiento de la enfermedad de Hodgkin y otros linfomas con una metil-hidracina. *Rev. Medicina* 44, 559-564. (1966).
3. Bollag, W. Suppression of the immunological reaction by methylhydrazines a new class of antitumor agents. *Experientia* 19, 304-305. (1963a).
4. Bollag, W. The tumour inhibitory effects of methylhydrazine derivative Ro4-6467. *Cáncer Chemotherapy. Rep.* 33, 1-4. (1963b).
5. Bollag, W. y Grunberg, E. Tumour inhibitory effects of a new class of cytotoxic agents, methylhydrazine derivatives. *Experientia* 19, 130-131. (1963).
6. Bollag, W. Investigations with methylhydrazine derivatives in chemotherapy of cancer. Ed. Plattner, Pl. A. Amsterdam, Elsevier, 191-197. (1964).
7. Bollag, W. y Theiss, E. Methylhydrazine derivatives. *Chemotherapy of Cancer. Ed. Plattner, Pl. A. Amsterdam, Elsevier*, 311-313. (1964).
8. Bollag, W. Cit. por Hidalgo, I. y Montaña, G. (1967). Resultados clínicos de los derivados de la metilhidracina. *Rev. Med. Hosp. Gral. 30, sobretiro.* (1965).
9. Chaube, S. y Murphy, M.L. The teratogenic effects of 1-methyl-2-para (isopropilcarbamoil) benzylhydrazine HCl (MH1). *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* 5, 11. (1964).
10. Estrada, F.E. Estudio experimental sobre los efectos de dosis terapéutica del Natulán en ratas embarazadas. *An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autónoma Méx.* 48. Ser. Biol. Exp. (1): 65-75. (1982).
11. Gerhartz, H. Contributions to the biological and clinical effects of a methylhydrazine derivative. *Chemotherapy of Cancer, Ed. Plattner, Pl. A. Amsterdam, Elsevier*, 215-218. (1964).
12. Hidalgo, I. y Montaña, G. Resultados clínicos de los derivados de la metilhidracina. *Rev. Med. Hosp. Gral. 30, sobretiro.* (1967).
13. Kreis, W. Metabolism of an antineoplastic methylhydrazine derivative in a P 815 mouse neoplasm. *Cancer Res.* 30, 82-89. (1970).
14. Martz, G. Clinical results with a methylhydrazine derivative. *Chemotherapy of Cancer. Ed. Plattner, Pl. Amsterdam, Elsevier*, 198-203. (1964).
15. Mathé, G., Schweisguth, O., Schneider, M., Brule, G., Cattani, A., Schwirzenberg, L. Methylhydrazine in treatment of Hodgkin's disease. *Lancet* 2 1077-1080. (1963).
16. Mercier-Parot, L. y Tuchmann-Duplessis, H. Action embryotoxique et teratogene d'une methylhydrazine chez la souris et le lapin. *Press. Med.* 77, 446. (1969).
17. Oliverio, V.T. y Kelly, M.G. Contribution to the biological and clinical effect of a methylhydrazine derivative. *Chemotherapy of Cancer. Ed. Plattner, Pl. A. Amsterdam, Elsevier*, 221-227. (1964).
18. Raaflaub, J. y Schwartz, D.E. Über den metbolismus eines cytotatish Wirksamen methylhydrazinderivatives (Natulán). *Separatum Experientia* 21-44. (1965).
19. Reed, D.J. y Dost, F.N. Methane and CO₂ formation by rats during metabolism of a methylhydrazine (Natulan). *Proc. Am. Ass. Cancer Res.* 7, 57. (1966).
20. Tood, I.D.H. Natulan in management of late Hodgkin's disease, other lymphoreticular neoplasms and malignant melanoma. *Brit. Med. J.* 1, 628-631. (1965).
21. Tuchmann-Duplessis, M.H. y Mercier-Parot, L. Production chez le rat de malformations oculaires et squelethiques par administration d'una methylhydrazine. *Presse Med.* 75 No. 55, 2843. (1967).
22. Witzel, G. Schneider, F. t Fretzdorff, A.M. Cytostatischer wirkungsmechanismus der methylhydrazine. *Experientia* 20, 38-39. (1964).
23. Zeller, P., Guttman, H., Hegedüs, B., Kaiser, A., Langemann, A., Müller. Methylhydrazine derivatives, a new class of cytotoxic agents. *Experientia* 19 No. 3, 129. (1963).
24. Zeller, P. y Bollag, W. Cytostatischer wirkungsmechanismus der methylhydrazine. *Experientia* 20 No. 38, 1-4. (1964).

