

# ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y ANTI VIH-1 DE LA *Alchornea castaneifolia*, "HIPORURO"

Castañeda B. \*, Navarrete J \*\*, Ibáñez L.\*\*\*

## RESUMEN

**S**e evaluó la actividad antitumoral, sobre el sarcoma 180, y la actividad antiviral sobre el virus del VIH-1, de los extractos de las hojas de *Alchornea castaneifolia*, "HIPORURO", aislándose algunos marcadores químicos.

**MÉTODO:** La actividad antiviral sobre la Transcriptasa Reversa (RT) del HIV-1, fue realizada con el Kit Lenti RT TM Activity Assay, usando como control positivo Nevirapine 1 mM. En el ensayo en *Artemia salina* se siguió la metodología del CYTED. Evaluamos el efecto antitumoral, en vivo, del extracto atomizado de las hojas de *Alchornea castaneifolia* "Hiporuro", en ratones albinos hembras, a los cuales se les inoculó, vía subcutánea, 0.5 ml de líquido ascítico con células tumorales de sarcoma 180 (TIB 66) Lot -3582231, donado por el NAMRID. Se evaluó: las metástasis, la diferenciación neoplásica, la viabilidad tumoral y la apoptosis. El fraccionamiento de los extractos bioactivos, se realizó utilizando técnicas espectroscópicas y cromatográficas, búsquedas automatizadas instrumentales (GC-EM) y electrónicas en diferentes bases de datos.

**RESULTADOS:** El extracto de hojas de hiporuro, presentó una inhibición antiviral de 67.64% sobre el VIH-1, similar al alcaloide aislado, en el presente trabajo, y codificado como H5, en comparación con el Nevirapine, fármaco usado en la terapia de pacientes con HIV-1,

\* 1. Dr. En Medicina, Director del Instituto de Investigación \*\* Dr en Medicina, \*\*\*Dra en Farmacia y Bioquímica. Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres. Lima-Perú

el cual presentó 71% de inhibición. En *Artemia salina*, la CL50 fue de 14,95 ppm, con un límite superior e inferior, al 95%, de 25,77 ppm y de 8,67 ppm, respectivamente, con un valor de  $p < 0,01$ . Asimismo, se pudo observar que la cepa de sarcoma P 180 utilizada, presenta un alto grado de indiferenciación, con diseminación a partes blandas y celoma, siendo el estómago el órgano más afectado. La neoplasia cursó con grandes áreas de necrosis que fueron de 60 a 80%. En los grupos de prevención se obtuvieron resultados satisfactorios por el alto grado de necrosis tumoral, pero sin valor significativo. Se observó hiperplasia del tejido linfoide, como probable respuesta a la injuria tumoral. Se comprobó la presencia de FITOL y CANFEROL y se aisló el alcaloide H5. Se aportan los espectros de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  así como los cromatogramas de gases-masas de los compuestos aislados.

**DISCUSIÓN:** El fitol, el canferol, el alcaloide H5 aislado y la presencia de flavonoides, podrían estar implicados en la acción farmacológica del extracto de Hiporuro.

**PALABRAS CLAVE:** fitol, canferol, marcadores químicos, actividad antitumoral, Sarcoma 180, anti HIV-1, *Alchornea castaneifolia*, HIPORURO.

## ABSTRACT

The antitumoral activity of *Alchornea castaneifolia*, "Hiporuro" from leaves over sarcoma 180 and its antiviral activity over the HIV-1 virus were evaluated. Some chemical markers were isolated.

**METHODS:** The antiviral activity over the Transcriptasa Reversa of HIV-1 was performed with the Lenti RT TM Activity Assay kit. Nevirapine, 1 mM, was used as positive control. CYTED methodology was followed on the *Artemia Salina* test. The antitumoral effect was evaluated in vivo from the atomized extract from the *Alchornea castaneifolia* leaves "Hiporuro". Albino female mice were inoculated with 0.5 mL of ascetic liquid with tumor cells of sarcoma 180 (TIB 66) Lot -3582231, donated by NAMRID. Metastasis, neoplastic difference, tumor viability and apoptosis were evaluated. The breaking up of the bioactive extracts was done utilizing spectroscopy and chromatographic techniques. Automated instrumental and electronic search (GC-EM) was done over several databases.

**RESULTS:** The extract from hiporuro leaves presented 67.64% antiviral inhibition over HIV-1. In contrast, Nevirapine presented 71% inhibition. In the *Artemia Salina* test, CL50 had 14.95 ppm, with superior and inferior limits, at 95% confidence, of 25.77 ppm and 8.67 ppm respectively ( $p < 0.01$ ). Sarcoma P 180 presented a high grade of undifferentiation with spreading to soft parts and celoma. Stomach was the most affected organ. Neoplasia had large areas of necrosis (60 to 80 %). Satisfactory results were obtained in prevention groups due to the high grade of tumor necrosis but without significant results. Hyperplasia was observed in the linfoide tissue as a probable response to the tumoral injury. Presence of FITOL and CANFEROL was corroborated and isolated by the H54 alkaloid. Attached are the spectrals from the RMN of  $^1H$  y  $^{13}C$ , as well as the gas-mass chromatograms of the isolated components.

**DISCUSSION:** Fitol, canferol, isolated alkaloid H5 and the presence of flavonoides could be involved in the pharmacological action of the hiporuro extract.

**KEYWORDS:** Fitol, Canferol, chemical markers, antitumoral activity, Sarcoma 180, antiHIV-1, *Alchornea castaneifolia*, Hiporuro

## INTRODUCCIÓN

El Perú, es uno de los cinco países con mayor biodiversidad a nivel mundial, cuenta con 28 climas de los 32 existentes en el planeta y con 84 de las 103 zonas de vida reconocidas en la tierra, sus múltiples pisos ecológicos y ecosistemas permiten encontrar numerosas especies vegetales, de las cuales un alto porcentaje tiene aplicaciones medicinales que podrían ser estudiadas para lograr un desarrollo integral de las comunidades, con la participación de diversos actores: comunidades, universidades, organismos no gubernamentales y gobierno a través de las diversas instituciones de salud, educación y agricultura. Para ello se hace necesario la realización de un diagnóstico de los recursos vegetales, de uso en salud, empleados por las comunidades andino-amazónicas, validar el uso consiguado, de una manera científica, promover el manejo sostenible de estos recursos vegetales medicinales, impulsar su producción y comercialización bajo estándares de calidad y con la debida protección de propiedad intelectual y, sobretodo, difundir el uso racional de plantas medicinales en los profesionales de la salud y en la población, promoviendo la formación y desarrollo de Bancos de germoplasma, la formación de jardines botánicos, el fortalecimiento de las colecciones del herbario nacional, construir viveros e invernaderos, impulsar la implementación de biohuertos familiares, comunales y escolares<sup>1, 2</sup>.

La búsqueda de nuevos agentes terapéuticos, sintéticos y de origen natural, para combatir una serie de enfermedades como: Cáncer, SIDA, enfermedades cardiovasculares y metabólicas, se ha convertido en una preocupación que deriva en un esfuerzo emprendido por instituciones universitarias y compañías farmacéuticas, a nivel mundial, etc.<sup>3, 4</sup>

Para llevar a cabo dicha búsqueda, los screening realizados de extractos o sustancias obtenidas de plantas, mediante ensayos de citotoxicidad, proveen datos (concentración, efecto, etc.) preliminares de gran valor para seleccionar las moléculas con propiedades antineoplásicas potenciales<sup>1</sup>. La citotoxicidad es un parámetro que se define como: la toxicidad de cualquier molécula evaluada, sobre diversas líneas celulares, en cultivos; comprende uno de los mecanismos efectores de determinadas poblaciones de células especializadas del sistema inmunitario, consistente en la capacidad para interaccionar con otras células y destruirlas, tal es el caso de los linfocitos natural killer. Este mecanismo de respuesta interviene en la defensa frente a infecciones víricas y células neoplásicas, así como en la destrucción de células alogénicas en transplante de órganos. Se consideran como prototipos de las células especializadas en dicha función a una subpoblación de linfocitos T (Tc, CTL o cytotoxic T lymphocyte) y a las

células natural killer (NK). Otras células, como los macrófagos, ejercen también una importante función citolítica.<sup>5, 6.</sup>

Las deficiencias inmunológicas secundarias, se presentan como consecuencias de la aparición de enfermedades como: cáncer, malnutrición, enfermedades metabólicas, infecciones virales, etc. o a la administración de drogas (drogas inmunosupresoras). Al igual que las inmunodeficiencias primarias, las secundarias, se manifiestan clínicamente por la aparición de infecciones persistentes o recurrentes. Es la consecuencia lógica de un trastorno del sistema encargado de la defensa del organismo. Numerosas infecciones pueden provocar inmunodeficiencia secundaria, siendo una de la primeras en conocerse, el sarampión, y la más grave e importante, en la actualidad, la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), que produce el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). En enfermos con inmunodeficiencia, se incrementa el riesgo de padecer tumores y enfermedades autoinmunes. Inicialmente, la infección por el HIV, se daba en varones homosexuales y en personas consumidoras de drogas; sin embargo, en la actualidad se presenta en personas heterosexuales y en las que reciben transfusiones sanguíneas o administración de líquidos o concentrados de plasma sin las medidas correspondientes. Después de años de padecer una infección asintomática por el HIV, se presenta súbitamente una inmunodeficiencia predominantemente celular asociada a infecciones por microorganismos que en condiciones normales no son patógenos (los llamados «oportunistas»), consecuencia de la destrucción progresiva de la población de linfocitos T CD4+.<sup>7</sup>

La exposición humana a nuevas sustancias, debe ser siempre acompañada por una valoración del riesgo/beneficio, teniendo en cuenta que este riesgo no puede ser evitado o predecido en forma absoluta, aún por el más cuidadoso y exhaustivo estudio científico experimental. La decisión para introducir una nueva molécula depende, en última instancia, del balance riesgo beneficio. Por otra parte, está bien establecido que los bioensayos pueden manifestar propiedades adversas de una droga, o sus metabolitos en varios sistemas biológicos y que la extrapolación puede ser realizada, considerando la cercanía filogenético del modelo biológico, en estudio, con el ser humano.<sup>4, 8</sup>

Estudio de la acción citostática<sup>9</sup> de cualquier sustancia, puede realizarse por diversos métodos; incluyendo el modelo del Bioensayo de toxicidad en *Artemia salina*<sup>10</sup>.

La globalización, nos da la oportunidad de llevar a cabo alianzas estratégicas, interaccionando entre las diferentes redes, en capacitación de grupos y en una real transferencia de la llamada «economía del conocimiento», mediante el trabajo multidisciplinario, logrando así una

responsabilidad social, buscando la armonización de las legislaciones y denominaciones, que nos permitan exportar un producto inocuo y de calidad, cuyos datos químicos, farmacológicos y analíticos sean semejantes, documentando los posibles efectos adversos, interacciones, incluidas las interacciones alimentarias, con el fin de lograr el estándar deseado como base para garantizar su seguridad y eficacia<sup>11</sup>.

El desarrollo agroindustrial es provisor, con un alto índice de éxito, existiendo especies que pueden ser introducidas en cultivos a gran escala, con un alto grado de confiabilidad y en condiciones socioeconómicas y ecológicas favorables, con beneficios en varios niveles: a) Los pacientes, los que podrán acceder a productos debidamente estandarizados, b) Los fabricantes podrán contar con métodos de control de calidad que les asegure una posición competitiva en el mercado, c) Los exportadores podrán ofrecer un producto que cumpla las normas de calidad exigidas a nivel internacional, y el país que verá incrementar sus divisas<sup>9</sup>

En este sentido, creemos que nuestro país, nos ofrece un patrimonio natural, al que tenemos la obligación de preservar, buscando el desarrollo sostenible del país. Por otra parte, las Organizaciones Internacionales han propuesto estrategias racionales para el uso de los recursos naturales, a fin de evitar la depredación de los mismos; y las autoridades de nuestros países han tomado decisiones como la 523 (Estrategia de Biodiversidad para los países del Trópico Andino) a fin de conservar nuestra biodiversidad y velar por la protección y el fortalecimiento del conocimiento de las comunidades nativas, que merecen un reconocimiento adecuado<sup>12</sup>.

En las diferentes culturas del mundo, y hasta nuestros tiempos, la lucha contra la enfermedad, llegó a mostrar una gran complejidad, de forma que existieron distintos tipos de practicantes de la medicina popular, desarrollando diferentes prácticas curativas, reforzando, muchas veces, el tratamiento básico, mágico y religioso, con otro farmacológico de tipo empírico basado en la observación de sus efectos, acumulación de conocimientos y repetición de tratamientos en casos equivalentes. A lo largo del tiempo, a pesar de mantener buena parte de las creencias y supersticiones de la alquimia, sobre la piedra filosofal y la transmutación de la energía, indujo a sus seguidores a efectuar la búsqueda y preparación de sustancias químicas con aplicación médica<sup>11</sup>.

Hasta comienzos del Siglo XIX, los medicamentos de mayor uso, fueron sustancias naturales, procedentes del reino vegetal, animal y mineral. Posteriormente, se descubrieron y aislaron principios activos

de los medicamentos naturales, siendo el progreso de la Farmacología Experimental la que permitió conocer los diferentes mecanismos de acción de estas sustancias aisladas. Es así que se han aislado: a) la morfina alcaloide analgésico del opio (F.Serturmer,1820), b) la quinina, antipalúdica, de la Corteza de la Quina(Runge,1820), c) la colchicina, antigotosa, del cólchico (J. Pelletier y E. Caventou,1820), d) la atropina, anticolinérgica, midriática y antiespasmódica, de la belladona (Geiger y Hesse, 1833), etc; además, se efectuó la preparación semisintética de muchas sustancias, entre ellas las de los analgésicos y antipiréticos como el ácido salicílico (Kolbe,1860), la aspirina(Gerhard, 1853) y la antipirina (Knorr,1883); y también se descubrieron las actividades antisépticas del yodo (Chatin,1839) y del fenol (Kuchenmeister, 1860), la anestésica del éter (Long, 1942), del óxido nitroso (Wells,1844) y del Cloroformo (Simpson,1847), la diurética de la cafeína (Koschlakoff, 1893), la bacteriostática de las sales de Plata (Von Nâgeli,1893), la sedante y anticonvulsiva del bromuro potásico (Locock, 1857), etc <sup>13</sup>.

Nicolas Monardes, publicó «Historia medicinal de las cosas que se traen de nuestras Indias Occidentales (Américas)» (1565-1574), donde describe más de un centenar de productos americanos como el tabaco, la coca, el girasol, el sasafrás, los bálsamos del Perú y de Tolú, etc. Actualmente, los científicos están interesados en la valoración de medicamentos vegetales lo cual significa identificarlas y determinar su calidad y pureza. La calidad se traduce en su valor intrínseco o lo que es lo mismo en la cantidad de principios activos presentes en ella. La identificación se hace generalmente comparando una muestra representativa del medicamento vegetal problema con un espécimen auténtico, corroborando el resultado con la información suministradas por la literatura científica que describe su identidad, sus propiedades, su uso adecuado<sup>14</sup>.

El uso tradicional asignado a «HIPORURO», está en relación a sus propiedades: antiinflamatoria, antiviral, antimicótica, antitumoral, antibacteriana, inhibidora de la fermentación, antirreumática, antiartrítica, antimigálgica, antidiarreica, antialucinógena, hipoglicemiante, afrodisíaca, analgésica, antihistamínica, antiulcerogénica, así como protectora del estómago e inhibidora de secreción de gastrina y en el tratamiento de la impotencia y la infertilidad femenina y cuya acción antiinflamatoria, analgésica, antiulcerosa ha sido determinada <sup>6, 15, 16, 17</sup>.

*Alchornea castaneifolia* (Wild) Juss, pertenece a la familia de las Euphorbiaceae, la cual cuenta con más de 5000 especies de árboles; el nombre común es Iporuro o Hiporuro, las especies más conocidas son floribunda y castaneifolia, las partes más usadas en medicina tradicional son las hojas, la corteza y la raíz. *Alchornea castaneifolia* es un árbol mediano de hasta 9 m de alto, corteza marrón clara, copa

rala, ramificación distanciada, hojas pequeñas, curvinervadas, bordes levemente dentados, semicoriáceas, alternas, peciolo violáceo. Se distribuye en la Amazonía (Loreto) y Costa Norte<sup>18</sup>.

Su situación es como arbusto silvestre. La corteza es utilizada como antidiarreica, y macerada en alcohol es utilizada como antiartrítica; como antireumático se usa la maceración de la corteza en aguardiente, las hojas en infusión son utilizadas en diabetes y en dolores musculares se usan como emplasto. En Paludismo se usa el cocimiento de la corteza fresca.

La corteza es de color marrón claro, copa rala, ramificación distanciada, hojas relativamente pequeñas, curvinervadas, bordes levemente dentados, consistencia semicoriácea disposición típicamente alterna 10-13 x 5-6 cm, peciolo tierno con ligera coloración violácea, en algunos individuos. Se encuentra distribuida en zonas marginales del Amazonas, Loreto, Pucallpa, Sierra Central y Piura, su cultivo es de preferencia en un clima tropical húmedo, suelo arenoso, arcilloso; la época de siembra es de preferencia en mayor precipitación fluvial y la época de cosecha es durante el cese de lluvias en la temporada seca del Amazonas. Es utilizada en artritis, reumatismo, osteoartritis para aliviar dolores musculares; como antibacteriano, afrodisíaco y geriátrico masculino, algunos le atribuyen propiedades laxantes. La forma de preparación es la tintura alcohólica de la corteza, las hojas y las raíces. Las tribus Candochi Shapra y los shipibos usan la corteza y las raíces para el reumatismo. La forma de uso del Hiporuro como analgésico es frotándose con un emplasto de hojas, en las articulaciones dolorosas. En Pucallpa usan el cocimiento de las hojas en forma oral para la tos y el reumatismo. Las hojas de Hiporuro se usan en áreas cercanas a Piura para aumentar la fecundidad femenina y en aquellos casos donde el hombre sea relativamente impotente, como afrodisíaco y geriátrico para hombres. Dentro de los principios activos encontrados en la *Alchornea castaneifolia* «Hiporuro» mencionan la presencia de Alcaloides como la Alchorneína Yohimbina, etc<sup>1</sup>.

El presente trabajo pretende evaluar la acción antiviral y anticancerígeno del hiporuro, en animales de laboratorio, con miras a obtener un nuevo principio activo que pudiera ser utilizado en el tratamiento de estas patologías.

## MATERIAL Y MÉTODOS:

### MATERIALES

En la realización del presente trabajo, utilizamos el siguiente material:

### BIOLÓGICO:

Hojas de Hiporuro, planta procedente de la selva peruana

33 ratones albinos *Mus musculus*, hembras

Células de Sarcoma 180, llamado también tumor de Croker, obtenidas del NAMRID

### REACTIVOS Y EQUIPOS

Kit Lenti-RT

Láminas de aluminio prefabricadas POLYCHROM de 0,25 mm de espesor, con recubrimiento de gel de sílice con indicador fluorescente UV<sub>254</sub>

Espectrofotómetro

Espectrofotómetro NICOLET Impact 410

Espectrómetro BRUKER AC-200 (200 MHz),

Espectrómetro de Masas HEWLETT PACKARD 5890 series II

Cromatografo

## METODOLOGÍA

### Evaluación de la actividad antiviral

La actividad inhibitoria sobre la TR VIH-1 se realizó mediante el kit Lenti-RT (Cavidi-Tech), método propuesto por Shao et al. (1997). Dicho ensayo es inmunológico-colorimétrico. Se determinó la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdUtp) a un molde de poliadenina (PolyA) cuya reacción fue catalizada por la adición de una transcriptasa reversa recombinante de VIH-1, así como una secuencia iniciadora o primer. La bromodesoxiuridina unida al molde fue reconocida por un anticuerpo monoclonal conjugado a fosfatasa alcalina. La adición del paranitrofenilfosfato ocasionó que la fosfatasa hidrolizara el grupo fosfato a paranitrofenil, provocando una reacción colorida que se leyó a 405 nm.

**Evaluación de la actividad citotóxica en *Artemia salina* según Anderson, Meyer, Thompson .** Se siguió el procedimiento siguiente:



**Día 1:** Se preparó agua de mar (3.8 g de sal de mar comercial en 100ml de agua destilada). Se filtró. Se colocaron aproximadamente 50 mg de huevos de *Artemia salina* en un Erlemeyer con 350 ml de agua de mar. Se les colocó en un lugar con luz artificial o natural y con una bomba de oxígeno con burbujeo lento. **Día 2:** Se transfirieron la mayor cantidad de nauplios vivos a un Erlemeyer con agua fresca. Se pesaron 20 mg de *Alchornea castaneifolia*. **Día 3:** Se disolvieron 20 mg de la muestra en 2 ml de disolvente, 0.5 ml de DMSO y 1.5 ml de agua destilada (lo que hizo un total de 2 mL). A partir de esta solución, se prepararon diluciones de 1000, 100 y 10 ppm transfiriendo a cada vial 500, 50, y 5 ul respectivamente. Siendo 3 viales por cada concentración (9 en total). Se hizo un control por muestra. Como la muestra fue apolar se le agregó al control 50ul de DMSO. Los nauplios estuvieron listos para el ensayo. A cada vial se le agregaron 10 nauplios (30 nauplios por dilución) y la dilución del extracto requerido. Luego, se agregó agua de mar hasta completar 5 mL por vial. A cada vial se le agregó además, una gota de suspensión de levadura (3 mg de levadura seca se disuelven en 5 mL de agua de mar como alimento). **Día 4:** Después de 24 horas, se contó y anotó el número de sobrevivientes en cada dilución. Se analizaron los datos con el programa de computadora Finney (DOS) para determinar valores CL50.

## **Evaluación de la actividad antitumoral in vivo**

### **Fase I**

#### **• Obtención de células de Sarcoma 180**

Se utilizaron células de Sarcoma 180, llamado también tumor de Croker, que fueron obtenidas del NAMRID. Este tumor es indiferenciado, es una neoplasia maligna que se origina de un tejido conectivo o de soporte (origen mesenquimal)

### **Fase II**

#### **• Implante de células cancerosas**

La inoculación del sarcoma a los animales de experimentación se realizó inyectándoles las células con jeringas de tuberculina con agujas Nº 27x1/2 en el área inguinal izquierda, en un volumen de 0,5 ml de líquido ascítico por vía subcutánea. Aproximadamente a los 15 días desarrollaron ascitis y/o tumor.



**Figura 1**  
Desarrollo del sarcoma

### Fase III

- **Administración de Hiporuro (curativo)**

A dos grupos de 11 animales cada uno de *Mus musculus* (ratones) albinos hembra, que mostraron signos de ascitis y tumoración en el área de inoculación, se les administró hiporuro por vía oral a la dosis de 250mg/Kg. y 500 mg/Kg, para evaluar el efecto de tratamiento en el sarcoma desarrollado, observándose diariamente, cualquier cambio de regresión del tumor o prolongación del tiempo de vida.

- **Grupo Control**

Se utilizó, asimismo, un grupo control al cual sólo se le inoculó el sarcoma y se pudo observar el desarrollo del tumor, el cual cursó con abundante proliferación celular acompañado de un incremento en el peso de los animales. Por lo cual, a fin de determinar la ganancia de peso, se registró el peso individual de los ratones con implante celular (grupos experimentales y control), 10 días antes y durante todo el tiempo que duró la investigación.

- **Administración de Hiporuro (preventivo).** A los otros dos grupos de 11 animales cada uno, se le administró previamente por espacio de 15 días el Hiporuro a las dosis de 250 y 500 mg/Kg, por vía oral, utilizando sondas intragástricas, luego de este tiempo se procedió a inocular el sarcoma y se continuó el tratamiento con Hiporuro por espacio de 15 días más. Se comparó los resultados macroscópicos, el peso y los exámenes anatomopatológicos microscópicos.

### Evaluación microscópica del desarrollo del sarcoma

Se tomaron muestras de líquido ascítico de los ratones para evaluar el grado de diferenciación del sarcoma y se determinó si la inoculación fue viable, teniendo en cuenta parámetros histopatológicos. Al momento de la disección de los grupos correspondientes, se extrajeron órganos que se procesaron para estudio histopatológico, tales como hígado, riñones, cerebro, pulmones, corazón y en caso de formación tumoral: el tumor y anexos implicados.

Las variables que se evaluaron en los frotís de líquido ascítico fueron:

- **Células:** Forma, tamaño, características del núcleo; citoplasma: Contorno, yemaciones, vacuolización; anisocitosis, mitosis atípicas, organoides. anisocitosis, mitosis atípicas, organoides, detritus celular, fagocitosis, necrosis, linfocitos, hematíes

#### Diagnósticos histopatológicos

1. Sarcoma diferenciado
2. Sarcoma de moderado grado de diferenciación
3. Sarcoma de alto grado de diferenciación
4. Sarcoma Indiferenciado

### Evaluación de la homogeneidad de los incrementos de peso entre los ratones

- Se reportó el peso con el fin de conocer las variaciones del peso, en los diferentes grupos, de ratones antes de la inoculación; comparándolos con las variaciones después de la inoculación. Asimismo, se registró el tiempo de supervivencia de cada animal.

## **Elucidación estructural de principios activos de la *Alchornea castaneifolia*.**

De los extractos que presentaron actividad antitumoral y antiviral, se procedió a la separación de los principios activos, por métodos convencionales.

Para realizar el estudio sobre la composición química de *Alchornea castaneifolia*, se ha realizado el fraccionamiento de los extractos y de las fracciones que presentaron menor complejidad, llegándose a identificar algunos compuestos, por medio de técnicas espectroscópicas, cromatográficas, búsquedas automatizadas instrumentales (CG-EM) y electrónicas, en diferentes bases de datos.

Se aportan los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  así como los cromatogramas de gases-masas de los compuestos aislados.

La muestra vegetal fue recogida en la selva amazónica y se preparó dos extractos:

1. Extracto metanólico ( 10% peso/volumen)
2. Extracto atomizado, en etanol 70°

## **TÉCNICAS GENERALES**

### **Técnicas Cromatográficas**

#### **Cromatografía en capa fina (CCF)**

Se utilizaron láminas de aluminio prefabricadas POLYCHROM de 0,25 mm de espesor, con recubrimiento de gel de sílice con indicador fluorescente UV<sub>254</sub>. Para el revelado se pulverizó con una disolución de ácido fosfomolibdico al 10%, en etanol, calentando a 110° C durante unos minutos y observando directamente en una lámpara UV<sub>254</sub>.

#### **Cromatografía en columna**

Se utilizó gel de sílice Merck 0,063 a 0,200 mm de diámetro, en proporción 50-60 g de sílice por gramo de sustancia a fraccionar por cromatografía.

#### **Cromatografía en capa fina preparativa**

Se realizó en placas prefabricadas Merck Si254 de 1 mm de espesor y 40 x 200 mm de superficie, con zona de concentración.

#### **Cromatografía de flash**

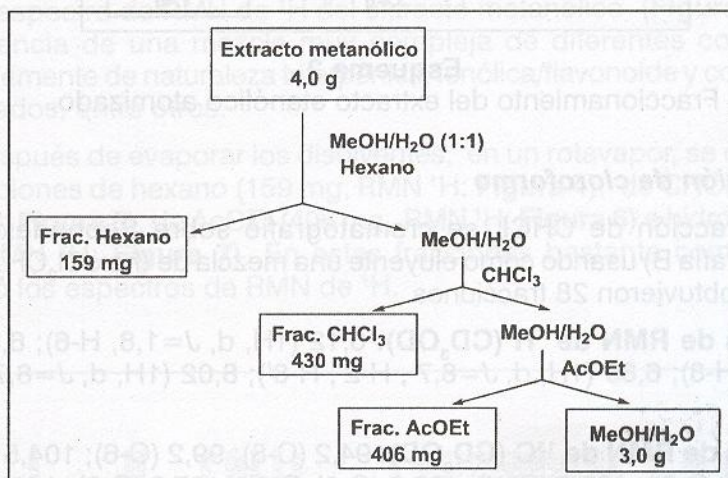
Se utilizó gel de sílice MERCK 60 (0,040-0,063 mm), en proporción 50-60 g de sílice por gramo de sustancia a fraccionar por cromatografía.

## Cromatografía de exclusión.

Se utilizó Sephadex LH-20, FLUKA (25-100  $\mu$ m), en proporción 100 g de sephadex por gramo de sustancia a fraccionar por cromatografía.

### 1. Extracto metanólico

En primer lugar se procedió a fraccionar el extracto de acuerdo al **Esquema 1**. El extracto metanólico se disolvió en una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) y se extrajo sucesivamente con hexano, cloroformo y acetato de etilo.



**Esquema 1**

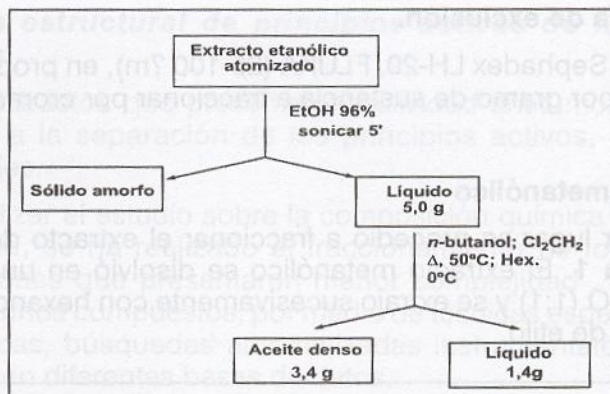
Fraccionamiento del extracto metanólico

### Fracción de cloroformo

La fracción de cloroformo, se cromatografió sobre Sephadex LH-20 (cromatografía B) usando como eluyente una mezcla de (hex/Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>/MeOH 2:2:1), se obtuvieron 28 fracciones.

### 2.- Extracto en etanol de 70°

El extracto etanólico atomizado se fraccionó como se indica en el **Esquema 2**. El extracto se disolvió en EtOH del 96% y se mantuvo durante 5 min en un baño de ultrasonido, posteriormente se separó un sólido muy insoluble en los disolventes habituales que se desechó y el líquido filtrado se trató con mezcla de *n*-butanol/Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>/hexano y se mantuvo a 0°C durante 3 h



### Esquema 2

Fraccionamiento del extracto etanólico atomizado.

#### Fracción de cloroformo

La fracción de  $\text{CHCl}_3$  se cromatografió sobre Sephadex LH-20 (cromatografía B) usando como eluyente una mezcla de (hex/ $\text{Cl}_2\text{CH}_2$ /MeOH 2:2:1), se obtuvieron 28 fracciones.

**Datos de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):** 6,12 (1H, d,  $J=1,8$ , H-6); 6,34 (1H, d,  $J=1,8$ , H-8); 6,85 (1H, d,  $J=8,7$ , H-2', H-6'); 8,02 (1H, d,  $J=8,7$ , H-3', H-5').

**Datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):** 94,2 (C-8); 99,2 (C-6); 104,5 (C-10); 116,2 (C-3', C-5'); 123,6 (C-1'); 130,6 (C-2', C-6'); 137,0 (C-3); 146,0 (C-2); 158,2 (C-9); 160,5 (C-4'); 162,4 (C-5); 165,0 (C-7); 177,3 (C-4).

Estos datos están de acuerdo con los descritos en la literatura (Tsaknis, J., Lalas, S. *J. Agric. Food. Chem.*, **2005**, 53, 6375-6381).

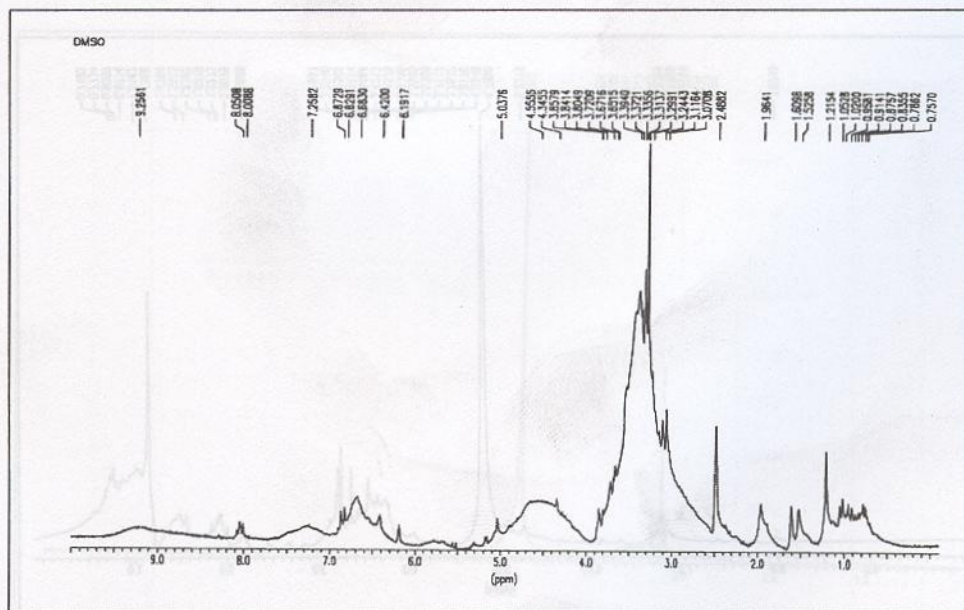
Los espectros de Resonancia Magnético Nuclear Protónica (RMNH1) y los espectros de carbono (RMN13 C) se obtuvieron en el Instituto de Química de la UNAM (MEXICO) y en el Departamento de Farmacia de la USAL (España), utilizando un espectrofotómetro NICOLET Impact 410 en KBr al 1% ó en película, expresando los valores de  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ . Asimismo los espectros de RMN  $^1\text{H}$  se registraron en un espectrómetro BRUKER AC-200 (200 MHz), utilizando TMS como referencia interna. Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) se expresan en ppm y los de las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hz. Los espectros RMN  $^{13}\text{C}$ , se registraron en un espectrómetro BRUKER AC-200 (50,3 MHz), utilizando TMS como referencia interna. Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) se expresan en ppm. Los espectros de Masas se realizaron en un cromatógrafo de Gases acoplado con un Espectrómetro de Masas HEWLETT PACKARD 5890 series II, con potencial de ionización de 70 eV. Los resultados se expresan

como relación  $m/z$ , se utilizó una columna SPB-1 de dimetilsilicona de 12 metros de longitud, 0,2 mm de diámetro interno, con un espesor de pared de 0,33  $\mu\text{m}$ , siendo las condiciones de experimentación las siguientes: una vez inyectada la muestra, el detector se mantuvo a 100°C durante 5 minutos y después se programó un gradiente de 5°C/minuto hasta alcanzar la temperatura máxima de 300°C, temperatura a la cual se mantuvo durante 10 minutos. Se utilizó la Librería : Base de datos Wiley 275.

## RESULTADOS

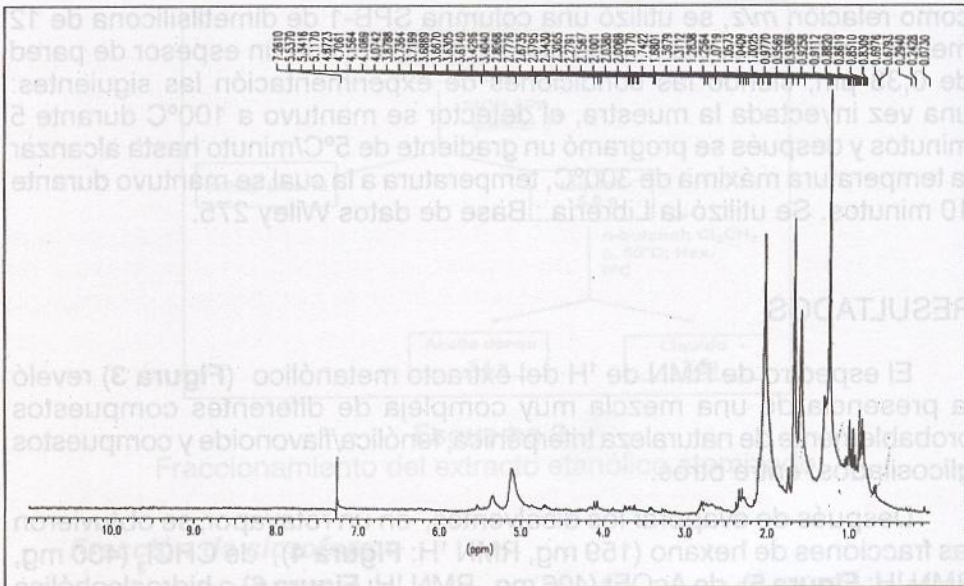
El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del extracto metanólico (**Figura 3**) reveló la presencia de una mezcla muy compleja de diferentes compuestos probablemente de naturaleza triterpénica, fenólica/flavonoide y compuestos glicosilados, entre otros.

Después de evaporar los disolventes, en un rotavapor, se obtuvieron las fracciones de hexano (159 mg, RMN  $^1\text{H}$ : **Figura 4**), de  $\text{CHCl}_3$  (430 mg, RMN  $^1\text{H}$ : **Figura 5**), de AcOEt (406 mg, RMN  $^1\text{H}$ : **Figura 6**) e hidroalcohólica (3 g, RMN  $^1\text{H}$ : **Figura 7**). En estas fracciones bastante complejas, se observó los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ .

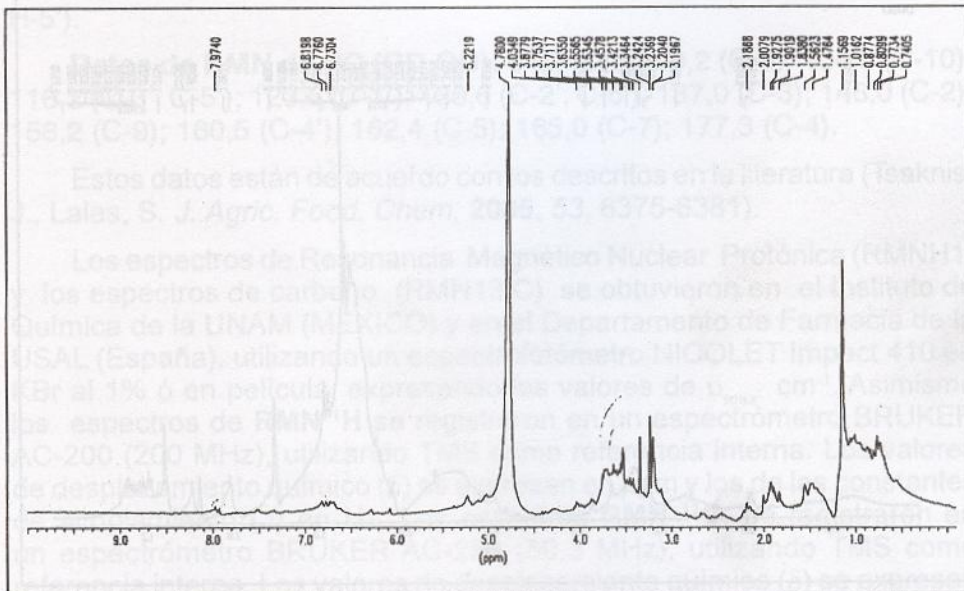


**Figura 3**

Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO) del extracto de MeOH

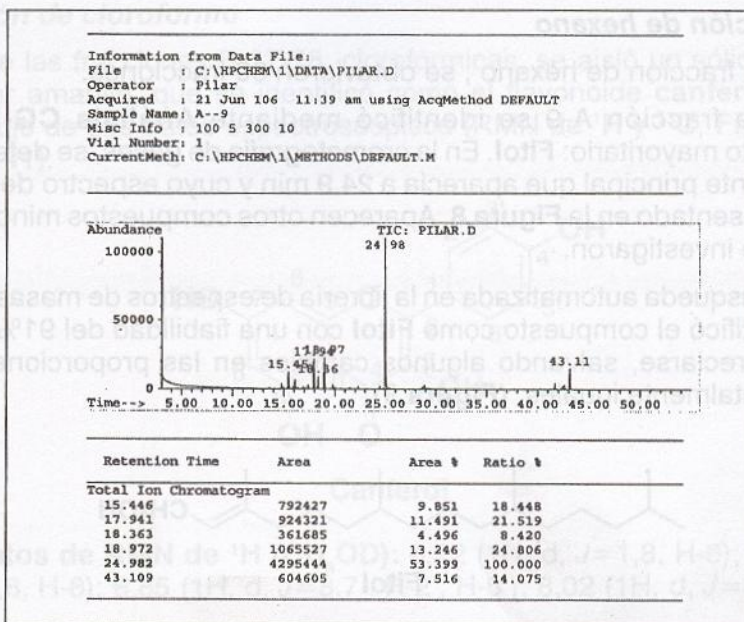


**Figura 4**  
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) de la fracción de hexano



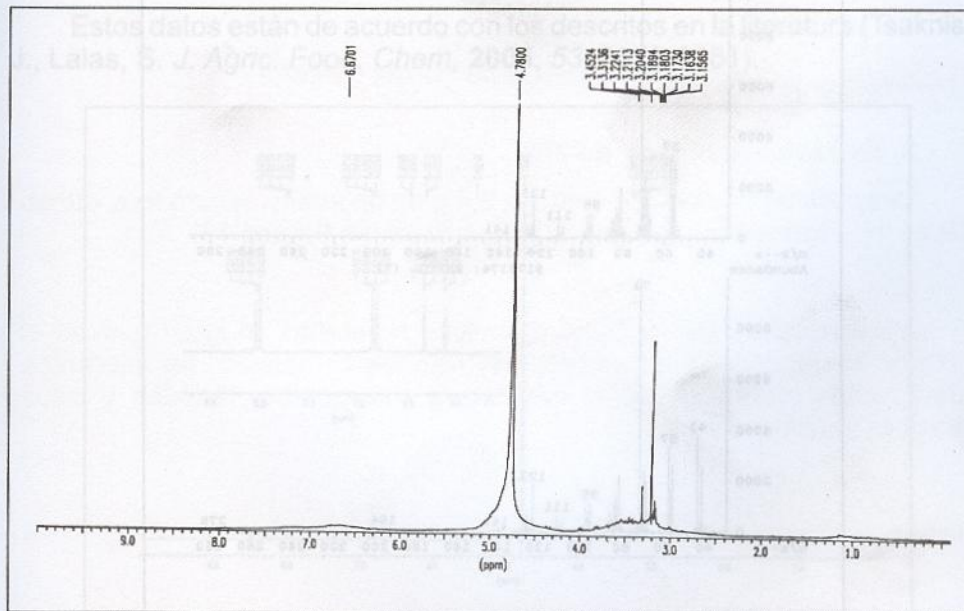
**Figura 5**  
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de la fracción de  $\text{CHCl}_3$





**Figura 6**

Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de la fracción de AcOEt



**Figura 7**

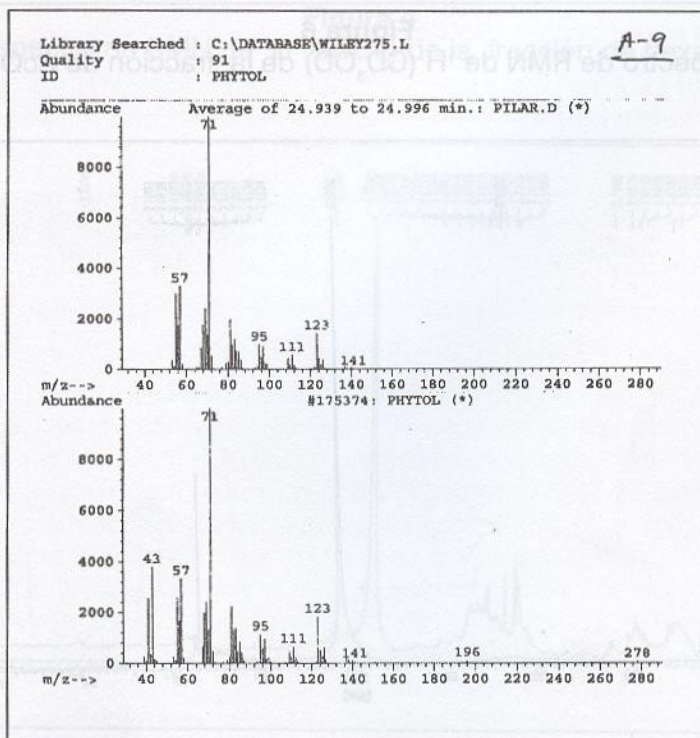
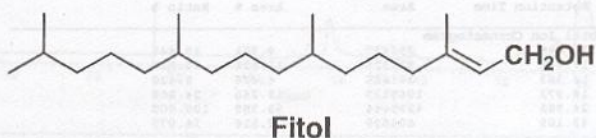
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de la fracción MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$

### Fracción de hexano

De la fracción de hexano, se obtuvieron 30 fracciones.

De la fracción A-9 se identificó mediante **Análisis CG-MS** un compuesto mayoritario: **Fitol**. En la cromatografía de gases, se detectó un componente principal que aparecía a 24,9 min y cuyo espectro de masas está representado en la **Figura 8**. Aparecen otros compuestos minoritarios que no se investigaron.

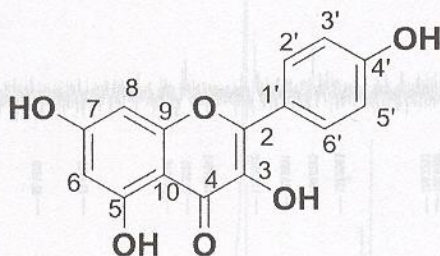
La búsqueda automatizada en la librería de espectros de masas (Wiley 275) identificó el compuesto como **Fitol** con una fiabilidad del 91%, como puede apreciarse, salvando algunos cambios en las proporciones, son fundamentalmente iguales (**Figura 9**).



**Figura 9**  
 Librería Wiley275

### Fracción de cloroformo

De las fracciones B 27-28, clorofórmicas, se aisló un sólido amorfo de color amarillo, que se identificó como el flavonoide **canferol**, según se dedujo de sus datos espectroscópicos (RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , **Figura 10** y **Figura 11**).

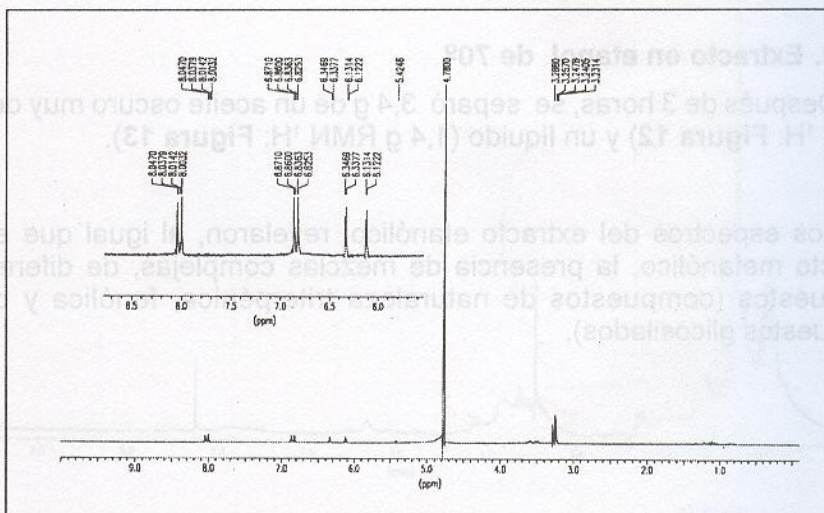


**Canferol**

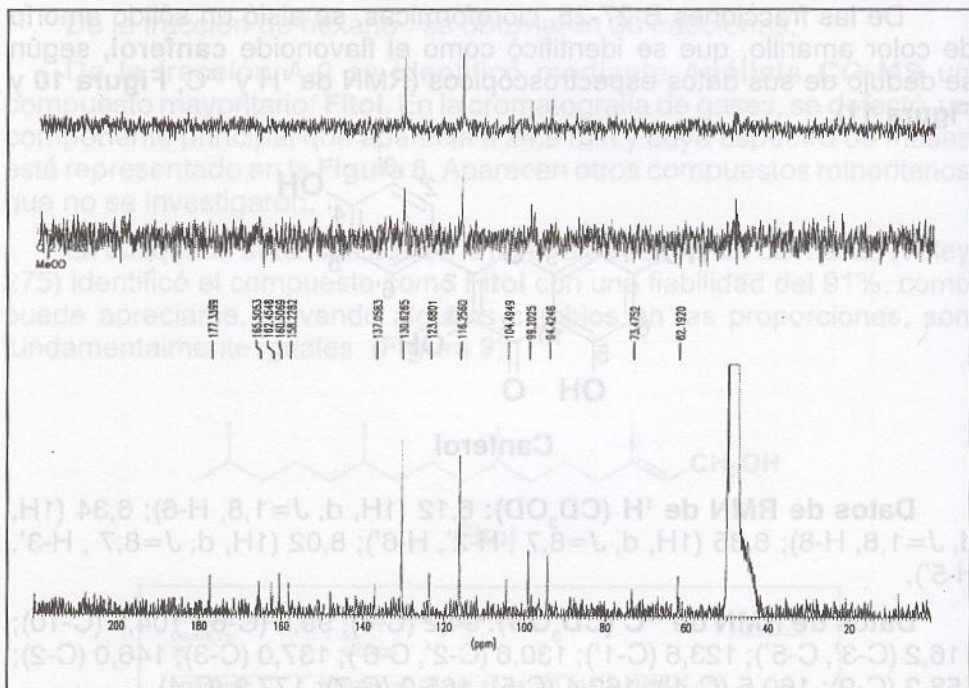
**Datos de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):** 6,12 (1H, d,  $J=1,8$ , H-6); 6,34 (1H, d,  $J=1,8$ , H-8); 6,85 (1H, d,  $J=8,7$ , H-2', H-6'); 8,02 (1H, d,  $J=8,7$ , H-3', H-5').

**Datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):** 94,2 (C-8); 99,2 (C-6); 104,5 (C-10); 116,2 (C-3', C-5'); 123,6 (C-1'); 130,6 (C-2', C-6'); 137,0 (C-3); 146,0 (C-2); 158,2 (C-9); 160,5 (C-4'); 162,4 (C-5); 165,0 (C-7); 177,3 (C-4).

Estos datos están de acuerdo con los descritos en la literatura (Tsaknis, J., Lalas, S. *J. Agric. Food. Chem.*, **2005**, 53, 6375-6381).



**Figura 10**  
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del canferol

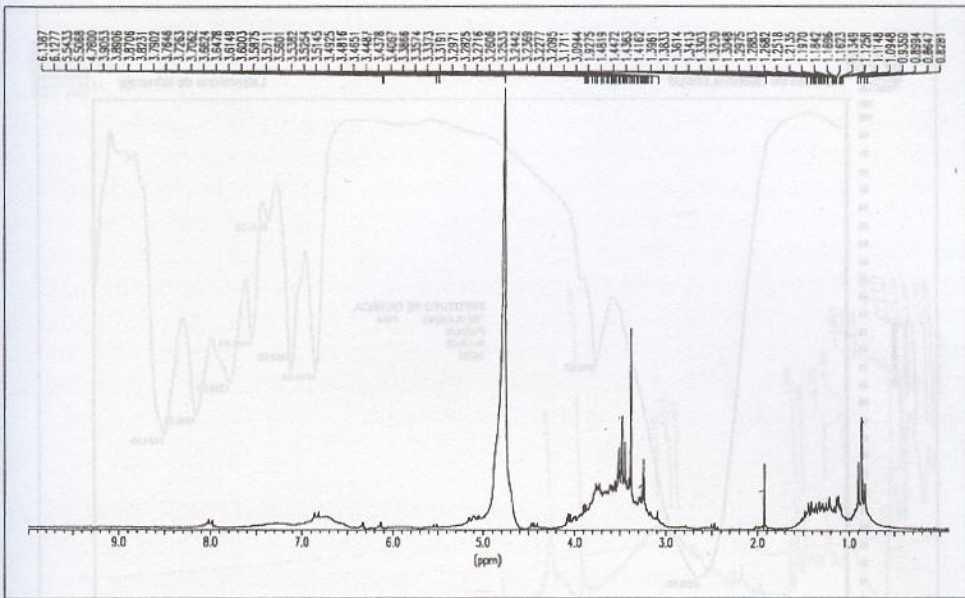


**Figura 11**  
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del canferol

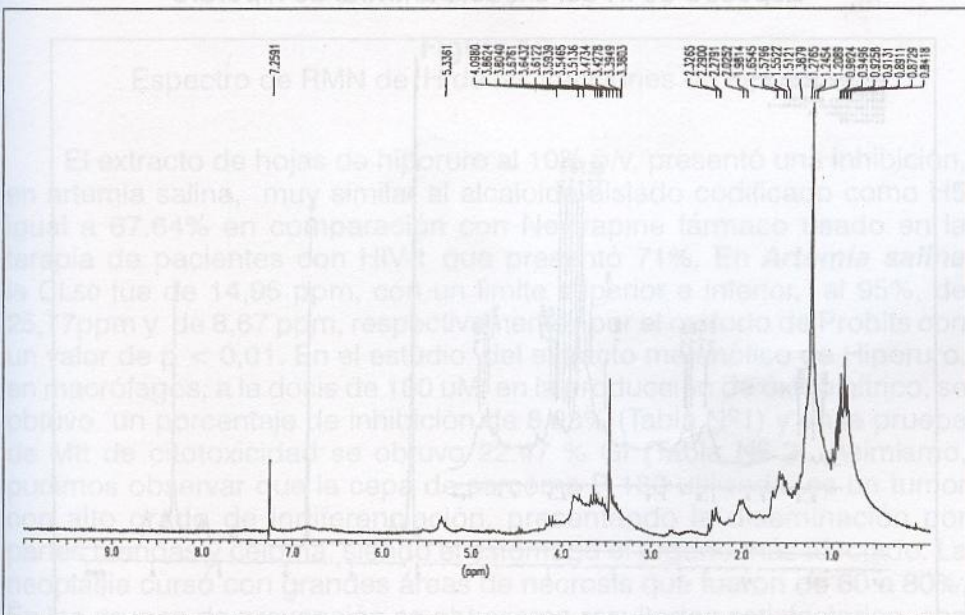
## 2. Extracto en etanol de 70°

Después de 3 horas, se separó 3,4 g de un aceite oscuro muy denso (RMN  $^1\text{H}$ : **Figura 12**) y un líquido (1,4 g RMN  $^1\text{H}$ : **Figura 13**).

Los espectros del extracto etanólico, revelaron, al igual que en el extracto metanólico, la presencia de mezclas complejas, de diferentes compuestos (compuestos de naturaleza triterpénica, fenólica y otros compuestos glicosilados).



**Figura 12**  
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del aceite



**Figura 13**  
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del filtrado

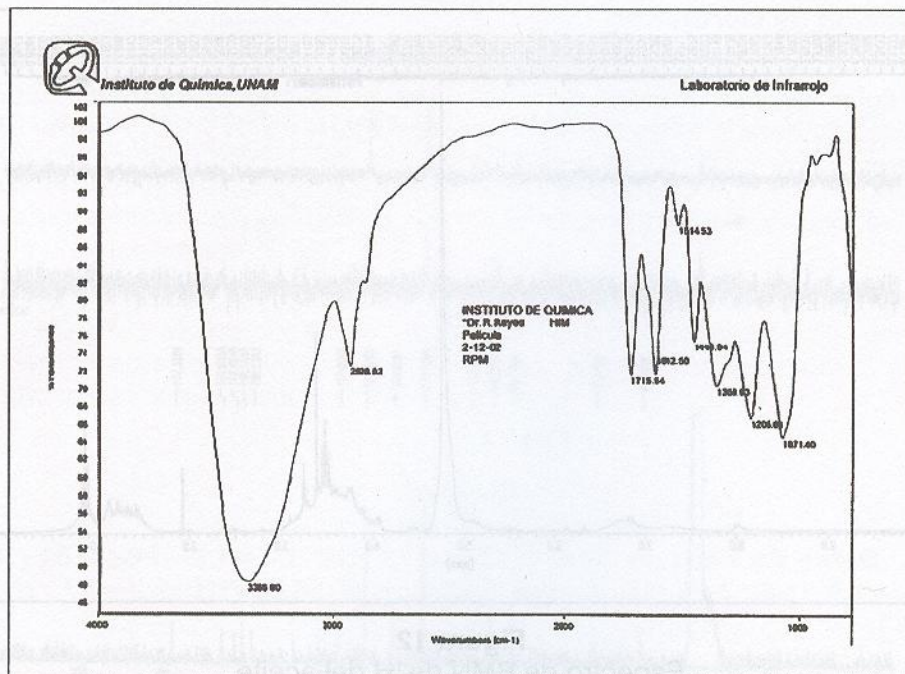


Figura 14  
Espectro de IR del extracto antiviral de hiporuro

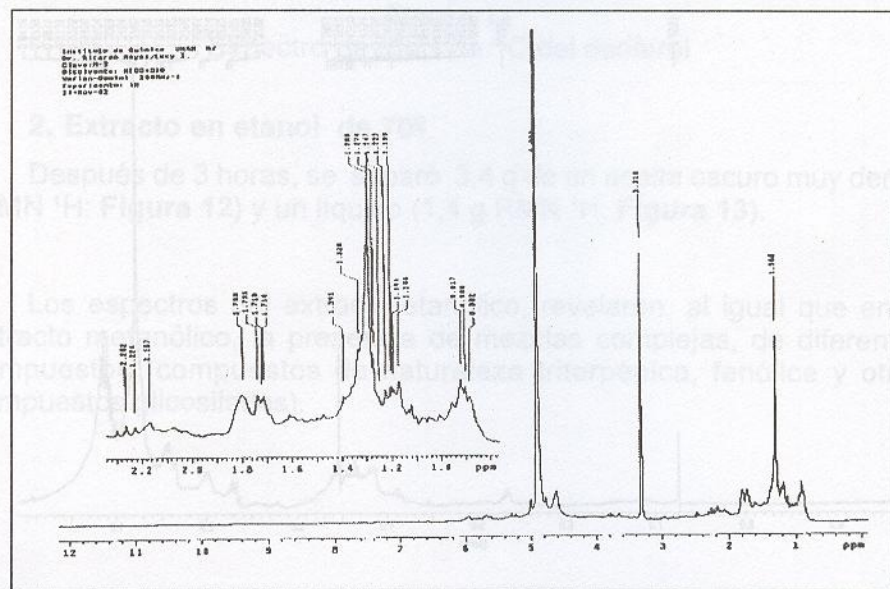
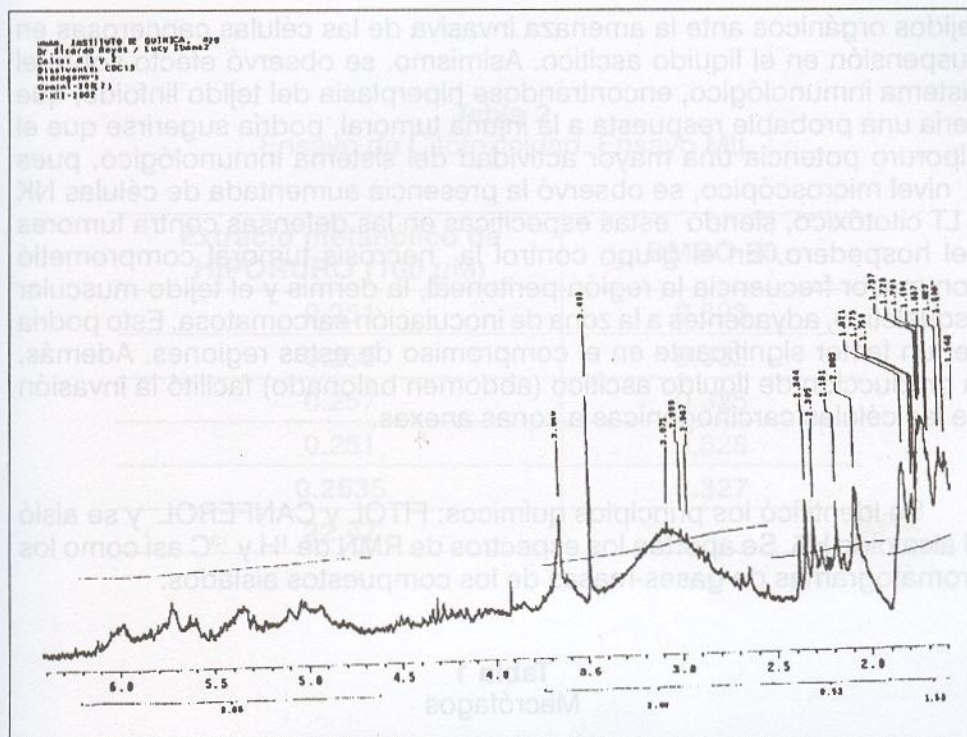


Figura 15  
Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del alcaloide H-3


**Figura 16**

Spectro de RMN de  $^1\text{H}$  de las fracciones de hiporuro

El extracto de hojas de hiporuro al 10% p/v, presentó una inhibición, en artemia salina, muy similar al alcaloide aislado codificado como H5 igual a 67.64% en comparación con Nevirapine fármaco usado en la terapia de pacientes con HIV-1 que presentó 71%. En **Artemia salina** la CL50 fue de 14,95 ppm, con un límite superior e inferior, al 95%, de 25,77ppm y de 8,67 ppm, respectivamente, por el método de Probits con un valor de  $p < 0,01$ . En el estudio del extracto metanólico de Hiporuro, en macrófagos, a la dosis de 100  $\mu\text{M}$ , en la producción de óxido nítrico, se obtuvo un porcentaje de inhibición de 8.28% (Tabla N<sup>o</sup>1) y en la prueba de Mtt de citotoxicidad se obtuvo 22.47 % GI (Tabla N<sup>o</sup> 2). Asimismo, pudimos observar que la cepa de sarcoma P 180 utilizada, es un tumor con alto grado de indiferenciación, presentando la diseminación por partes blandas y celoma, siendo el estómago el órgano más afectado. La neoplasia cursó con grandes áreas de necrosis que fueron de 60 a 80%. En los grupos de prevención se obtuvieron resultados satisfactorios, con alto grado de necrosis tumoral, aunque sin significación estadística; lo que sugiere un posible efecto protector, del hiporuro, en los diferentes

tejidos orgánicos ante la amenaza invasiva de las células cancerosas en suspensión en el líquido ascítico. Asimismo, se observó efecto sobre el sistema inmunológico, encontrándose hiperplasia del tejido linfóide, que sería una probable respuesta a la injuria tumoral, podría sugerirse que el hiporuro potencia una mayor actividad del sistema inmunológico, pues a nivel microscópico, se observó la presencia aumentada de células NK y LT citotóxico, siendo estas específicas en las defensas contra tumores del hospedero. En el grupo control la necrosis tumoral comprometió con mayor frecuencia la región peritoneal, la dermis y el tejido muscular esquelético, adyacentes a la zona de inoculación sarcomatosa. Esto podría ser un factor significativo en el compromiso de estas regiones. Además, la producción de líquido ascítico (abdomen balonado) facilitó la invasión de las células carcinogénicas a zonas anexas.

Se identificó los principios químicos: FITOL y CANFEROL y se aisló el alcaloide H5. Se aportan los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  así como los cromatogramas de gases-masas de los compuestos aislados.

**Tabla 1**  
Macrófagos

Extracto metanólico de HIPORURO	DMSO 60
0.207	0.227
0.207	0.225
0.207	0.226
0.208	0.223
0.207	0.227
0.206	0.225
PROMEDIO: 0.207	PROMEDIO: 0.2255
[ NO 2 ] : 23.30	[ NO 2 ] : 25.41
% INHIBICION : 8.28	



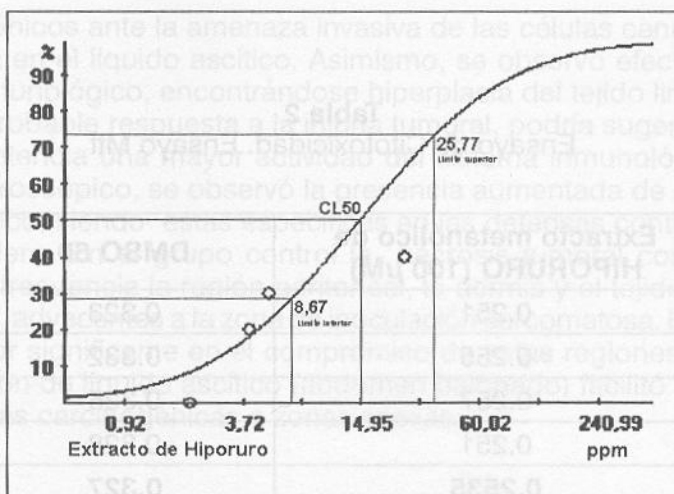
## DISCUSION

**Tabla 2**  
Ensayo de Citotoxicidad. Ensayo Mtt

Extracto metanólico de HIPORURO (100 µM)	DMSO 60
0.251	0.323
0.255	0.332
0.257	0.325
0.251	0.328
<b>0.2535</b>	<b>0.327</b>
<b>22.47</b>	

**Tabla 3**  
Bioensayo en *Artemia salina* (EC50 µg/ml)

Concentración del extracto acuoso de HIPORURO (ug/ml)	Mortalidad de artemias
2	0/10
4	2/10
5	3/10
25	4/10
50	10/10
<b>CL50= 14.95 Límite superior 95% = 25.77 Límite inferior 95% = 8.67</b>	



**Figura 17**  
CL50 de Hiporuro en *Artemia salina*

**Tabla 4**  
Ensayo antitumoral in vivo con Sarcoma P 180

Concentración del extracto metanólico de HIPORURO ( $\mu\text{g/ml}$ )	Presencia de Ascitis	Neoplasia
250 mg/kg de peso (Método curativo)	9.8%	9.8%
500 mg/kg de peso (Método curativo)	22%	22%
250 mg/kg de peso (Método preventivo)	4.9%	14.6%
500 mg/kg de peso (Método preventivo)	9.8%	7.3%

## DISCUSIÓN

Conocemos del amplio uso del Hiporuro, dentro de la Medicina Tradicional, fundamentalmente como analgésico y antiinflamatorio; sin embargo, pocos trabajos científicos se han realizado para sustentar estas acciones. En la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres, dentro de la línea de investigación de plantas con efecto analgésico y antiinflamatorio, hemos demostrado el excelente efecto antiinflamatorio y analgésico de esta planta, comparable al producido por el Diclofenaco, con la ventaja, sobre éste, de no lesionar la mucosa gástrica; por el contrario, la protege de las lesiones producidas por la indometacina, en forma semejante como lo hace la Ranitidina<sup>15</sup>.

El fitol, el canferol, el alcaloide H5 aislado, y la presencia de flavonoides podrían estar implicados en la acción farmacológica del extracto de Hiporuro sobre el virus VIH-1 y su efecto protector en el tumor broker. El grado de inhibición en artemia salina, del extracto total de las hojas de hiporuro, es similar a la inhibición producida por el alcaloide aislado, y codificado como H5, lo que podría indicarnos que es el responsable del efecto biológico y que podría, en caso de confirmarse, constituirse en el marcador biológico válido; siendo indispensable proseguir con los estudios químicos y farmacológicos pertinentes, que confirmen esta presunción.

En los estudios cromatográficos y de resonancia magnética se han aislado el fitol y el canferol, que podrían constituirse en los marcadores químicos de esta importante planta medicinal. Quedaría por confirmar si las acciones analgésica y antiinflamatoria, son debidas al alcaloide aislado en el presente estudio y codificado como H5, o con los principios correspondientes al fitol y canferol. Serán los estudios posteriores los que podrán dar respuesta a estas interrogantes.

**AGRADECIMIENTOS:** A los Drs. Ricardo Reyes Chilpa, Mariano Martínez Vasquez y Mag. María T. Ramírez (UNAM-MEXICO), a los Drs. Arturo San Feliciano M. y Pilar Puebla Ibáñez (USAL-ESPAÑA), a la empresa Peruvian Heritage en la persona del Sr Mark Hein, a los alumnos del tercer año de Medicina Chonate Correa Margarita, Marquez Pinto Diego, Medina Plaza Cristian, Mendoza Vásquez Marco, Merino Zamalloa Yennifer, Mori Gamarra Fátima, Muñoz Orihuela Gabriela, Toledo Valverde Rubén, Torres Maza Yanet, Valenzuela Tasayco Maisa, por haber participado directamente en la investigación antitumoral in vivo y a todos aquellos que hicieron posible la presente investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Brack Egg Antonio. **Diccionario Enciclopédico de Plantas útiles en el Perú**. Centro de Estudios Regionales Andinos «Bartolomé de las Casas». Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, 1999, Cuzco- Perú.
- Desmarchelier C- Witting SF. **Sesenta Plantas Medicinales de la Amazonía Peruana** Ecología, Etnomedicina y Bioactividad. 2000 ISBN:9972-9186-0-2.
- Avendaño C. Introducción a la Química farmacéutica. Edit Mc Graw-Hill. ISBN: 8448603613. ISBN-13:9788448603618.. 2ª edición.
- Industria Farmaceutica . [http://es.wikipedia.org/wiki/Industria\\_farmac%C3%A9utica](http://es.wikipedia.org/wiki/Industria_farmac%C3%A9utica)
- Popoca J, Aguilar A, Alonso D, Villareal ML. **Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine**. Journal of Ethnopharmacology 1998; 59: 173-177.
- Lozano J.M, Tarazona R. Y J.Peña. Citotoxicidad.<http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/tema14/etexto14.htm>
- Page-Curtis S. Farmacología Integrada ISBN :0-7234-2556-6. Impreso en España por Grafos S.A. 1998.
- Tamayo C. PLO7 Fitoterapia basada en la evidencia.. Revista de fitoterapia 2006; 6(S1). [www.fitoterapia.net](http://www.fitoterapia.net)
- Kupchan SM, et al. **Tumor inhibitors. VI. Cissamparcine, new cytotoxic alkaloid from Cissapelos pareira. Cytotoxicity of bisbenzylisoquinoline alkaloids**. J. Pharm. Sci., April, 1965
- CYTED, Programa Iberoamericano de Ciencia Y tecnología para el Desarrollo. Manual de Técnicas de Investigación 1995; Pág 44-45.
- San Feliciano M. A. 1990. Iatroquímica. La creación de sustancias para la medicina. Ediciones Universidad de Salamanca. ISBN 84-7481-548-7 España.
- Monge, A. El descubrimiento de Fármacos a partir de Plantas medicinales. Ciencia e Investigación 6(1), 36-39. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM 2003.
- Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Novena edición, Editorial McGraw-Hill-Interamericana, 1996
- Guillen G. E., Castañeda C.B, Lizaraso C. F. 2006. Plantas medicinales del Perú. Antología I Compilación y notas. Fondo editorial de la Universidad de San Martín de Porres. ISBN: 9972-9768-6-6

Castañeda, B; **Evaluación fitoquímica, toxicológica, analgésica y antiinflamatoria del extracto metanólico de *Alchornea castaneifolia* «Hiporuro», en animales de laboratorio.** Cultur-17, año XXI, Nº 17, 2003: 13-21.

Castañeda, B; Castro de la Mata, R; Manrique, R; Paredes, M; Ibáñez, L. **Evaluación de la acción citotóxica y embriotóxica del extracto metanólico de *Alchornea castaneifolia* «Hiporuro».** Horiz med. Junio 2006. Pagina 22-27. ISSN:1727-558X.

Hiruma-Lima .C A. Roberta C,T, Martins R. Cl,Pezzuto A. FD,Vilegas W. Monteiro Souza B. A.R. . 2006. Antiulcerogenic activity of *Alchornea castaneaefolia* :Effects on somatostatin, gastrin and prostaglandin. Journal of Ethnopharmacology 104 (2006) 215-224. Elsevier.

Brack Egg Antonio. **Diccionario Enciclopédico de Plantas útiles en el Perú.** Centro de Estudios Regionales Andinos «Bartolomé de las Casas». Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, 1999, Cuzco- Perú.

FOTO Nº 2  
NECROSIS

## ANEXOS

### Tumor y anexo pata derecha

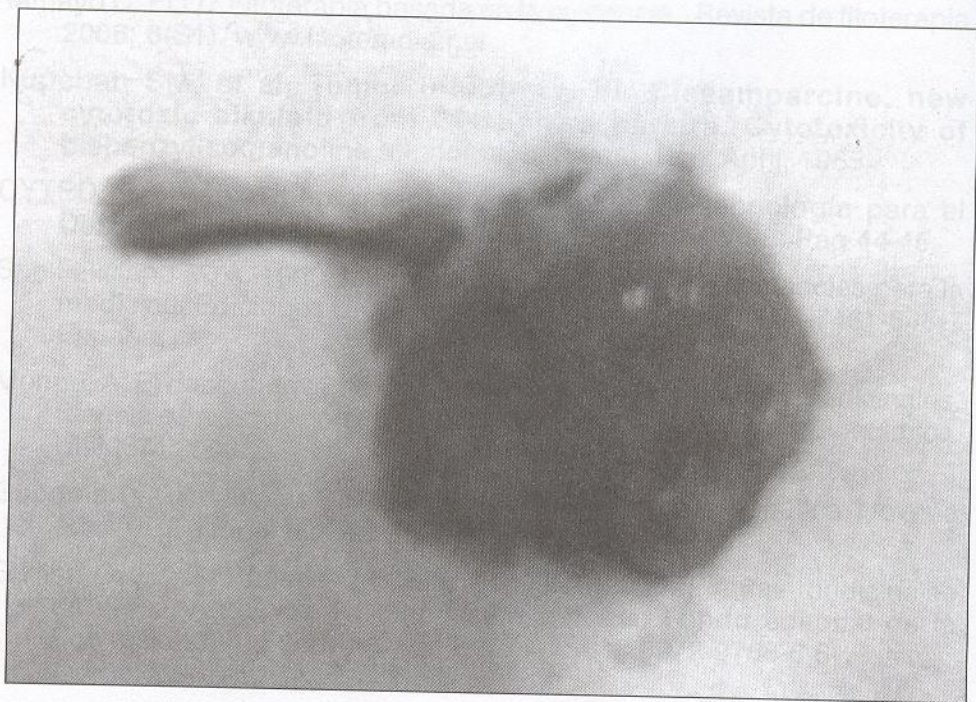


FOTO N°1  
CELULAS SARCOMATOSAS TIPO EPITELIO(20X)

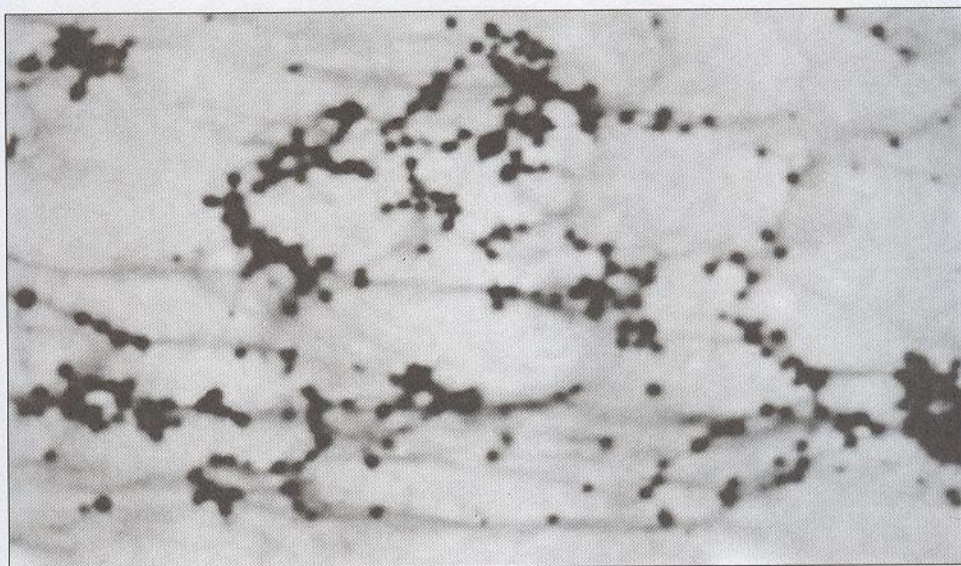


FOTO N°2  
METASTASIS  
NECROSIS

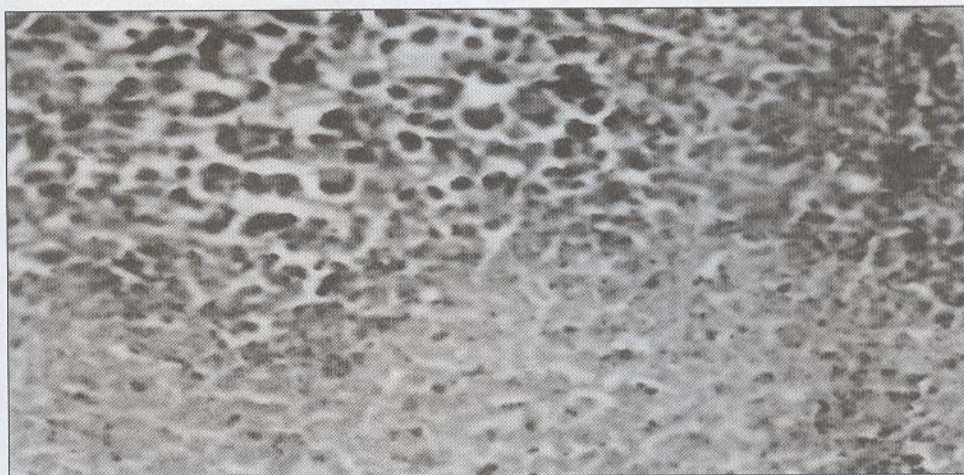


FOTO Nº3  
METASTASIS HEPÁTICA

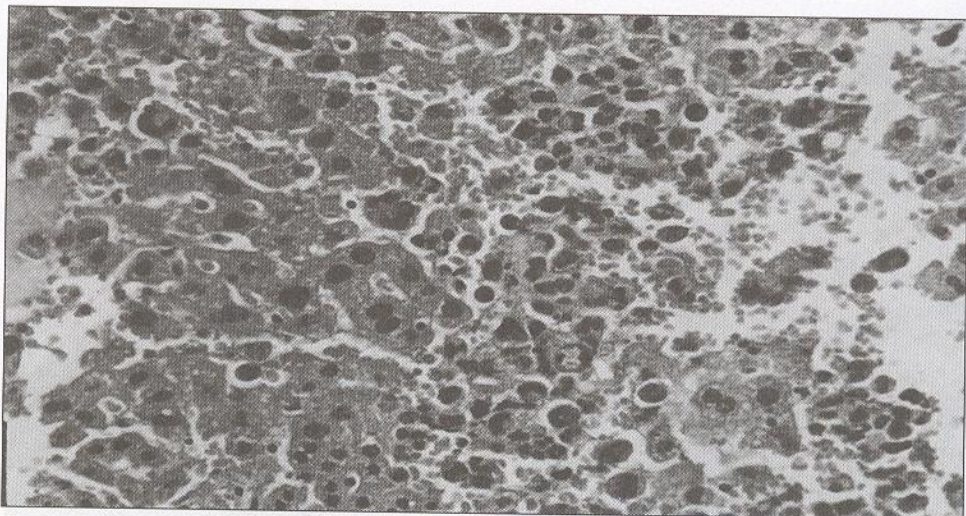


FOTO Nº4  
METASTASIS PULMONAR

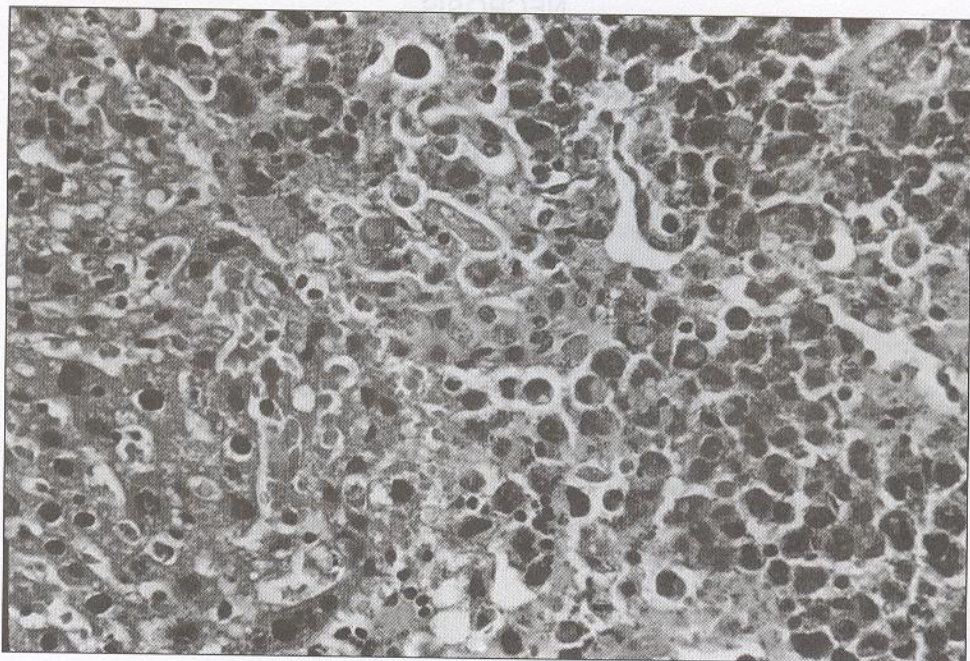




FOTO N°5  
METASTASIS DE PARED GÁSTRICA

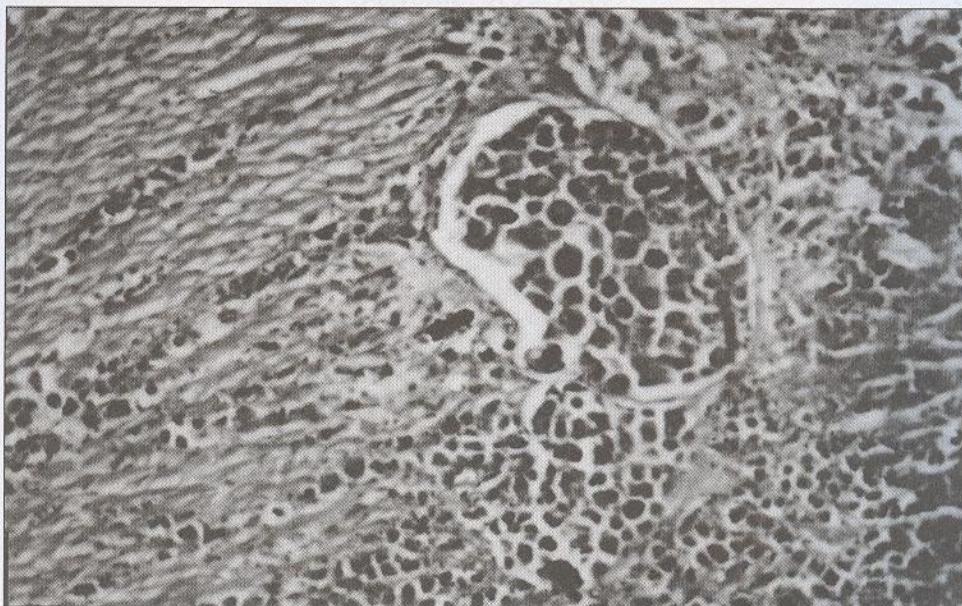


FOTO N°6  
METASTASIS DE SARCOMA DE PARED MUSCULAR(40X)



FOTO N°7  
CITOLOGIA CELULAS GRANDES, MITOSIS, MICROVASCULARIZACION  
CITOPLASMÁTICA  
CELULAS GRANDES GIGANTES

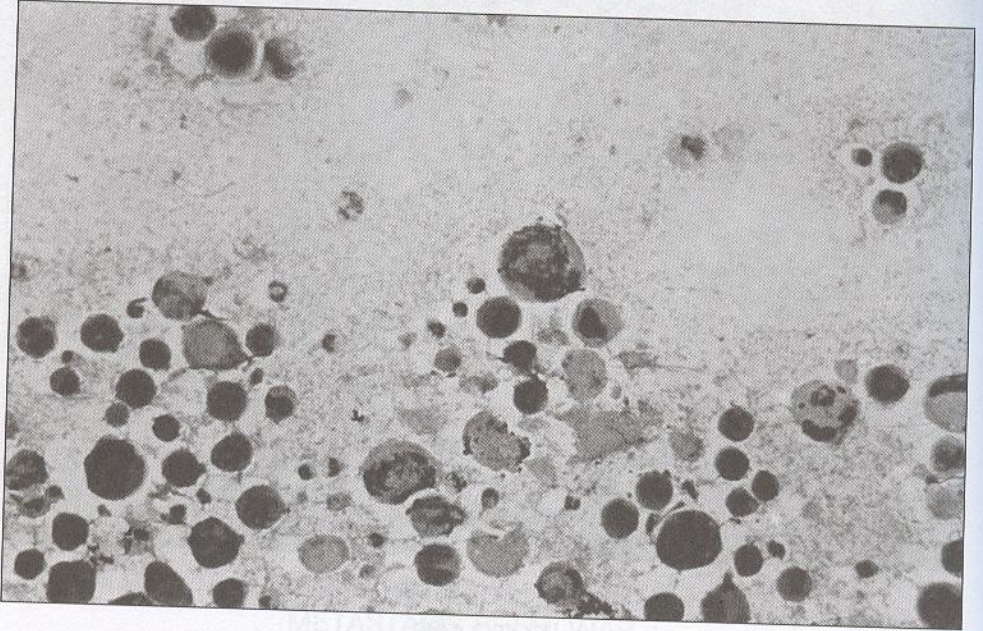


FOTO N°8  
70% NECROSIS TUMORAL, 30% TUMOR VIABLE

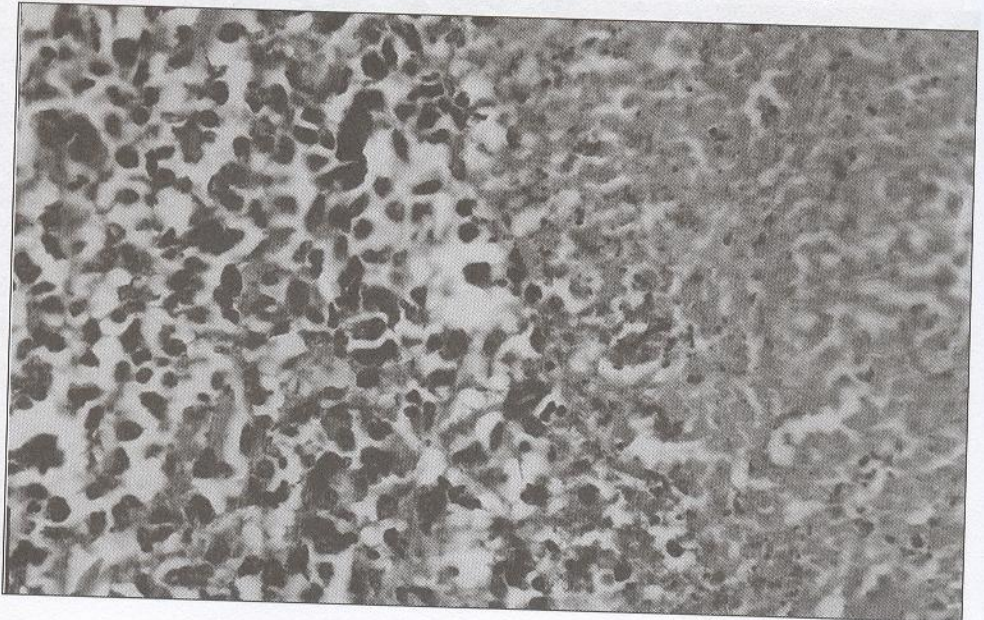


FOTO N°9  
METASTASIS GANGLIONAR

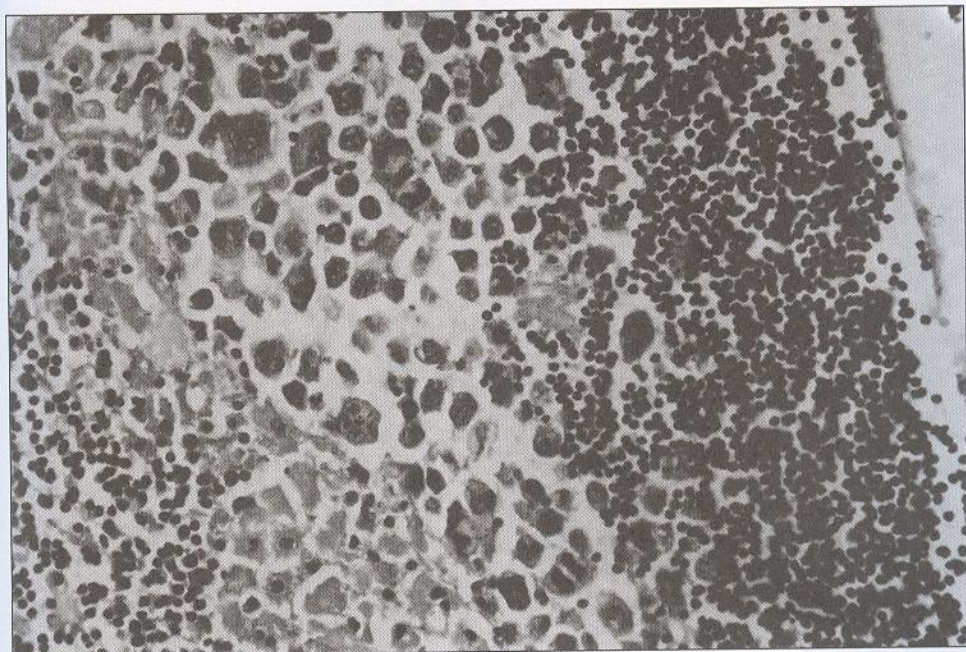


FOTO N°10  
RESUMEN  
GLOMERULONEFRITIS PROLIFERATIVA(20X)

