

2 Ej No. 98



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

**“BIOSINTESIS Y FARMACOLOGIA DE LOS
ALCALOIDES DE CATHARANTHUS ROSEUS
DERIVADOS DEL INDOL”**

TRABAJO MONOGRAFICO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

Primitivo Romero Castillo



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

R E S U M E N

El cáncer es un importante problema de salud pública en México. Desde 1954 las neoplasias malignas ocupan uno de los diez principales sitios como causa de mortalidad. Algunas estimaciones indican que es probable que el número de defunciones por cáncer en México sea de aproximadamente 50,000 muertes anuales.

Los tratamientos terapéuticos están dirigidos hacia la inhibición de la nueva formación anormal, permitiendo que el resto del organismo quede sin daño. Estos pueden ser de tres tipos: radiactivos, quimioterapéuticos y quirúrgicos, los que ocasionalmente se les emplea en forma simultánea aunque generalmente se les utiliza en forma alternada.

La quimioterapia del cáncer implica el empleo de productos capaces de localizar, identificar y destruir células y tejidos malignos, sin dañar a los normales.

Dentro de estos productos se encuentran algunos alcaloides aislados de la planta Catharanthus roseus entre los cuales se encuentran principalmente la vincristina (VCR) y la vinblastina (VBL) que han sido empleadas con éxito, desde 1963, en el tratamiento de la leucemia y de otros cánceres humanos.

Estas sustancias se presentan en las plantas en muy pequeñas

proporciones (0.00025%), por lo que se requiere de grandes cantidades de ella para una producción comercial del medicamento; de VBL y de VCR se obtienen 1.0 g. y 20 mg/1000 Kg. de planta respectivamente. Debido a esta baja producción de los alcaloides se han realizado intensos estudios biosintéticos para conocer los intermediarios y las enzimas que actúan en la biosíntesis de estos dos alcaloides dinéricos, para que se pueda controlar ésta y se aumente el rendimiento haciendo así mas rentable la obtención de estos alcaloides para uso farmacéutico.

Hasta ahora se tienen elucidados la mayor parte de los intermediarios de la vía de biosíntesis de los alcaloides diméricos, pero varias de las enzimas aún no se conocen.

Hasta hace poco la investigación farmacocinética de la VBL y de la VCR habfa estado severamente limitada por la falta de técnicas analíticas suficientemente sensibles, hasta el desarrollo del radioinmunoensayo para estos alcaloides, lo que ha permitido medir los niveles en suero en tiempos más prolongados.

ABREVIATURAS

- TMN - Tasa de mortalidad por neoplasias
- VCR - Vincristina
- VBL - Vinblastina
- EP - Eritrosa 4-fosfato
- PEP - Fosfoenolpiruvato
- DAHP- 7-fosfo-2-ceto-3-doxi-D-arabino-heptonato
- DHQ - 3-dehidrocinato
- DHS - 5-Dehidroshikimato
- SHK - Shikimato
- SHKP- Shikimato 3-fosfato
- EPSP- 3-fosfo-5-enolpiruvilshikimato
- CHA - Corismato
- PP - Prefenato
- FP - Fenilpiruvato
- HFP - p-Hidroxifenil piruvato
- AN - Antranilato
- PRA - Fosforribosil antranilato
- CPDP- Carboxifenil amino-deoxi-ribulosa 5-fosfato
- INGP- Indol-3-glicerol fosfato
- VLR - Vinleurosina
- VRD - Vinrosidina
- MNC - Células multinucleadas
- HPFC- Células formadoras de placas de hemólisis
- DBH - Dopamina- β -hidroxilasa

DVBI - Dehidrovinblastina

Vc - Compartimiento central

Vdss - Volumen aparente de distribución en el estado constante

AIA - Acido indol acético

I N D I C E

	Página
Introducción.....	1
Biosíntesis de los Alcaloides de Catharanthus Roseus derivados del Indol.....	9
Farmacología de los Alcaloides de Catharanthus Roseus derivados del Indol.....	50
Conclusiones.....	88
Bibliografía.....	94

INTRODUCCION

El cáncer es un importante problema de salud pública en México. Desde 1954 las neoplasias malignas ocupan uno de los diez principales sitios como causa de mortalidad. De 1968 a 1975 han sido la causa de mortalidad de la población general; la tercera causa de mortalidad en la población de 25 a 44 años; la segunda en la población de 45 a 74 años y la cuarta en la población mayor de 75 años. En los estados de Sinaloa y Tamaulipas las neoplasias malignas ocuparon el cuarto lugar en mortalidad en 1974.

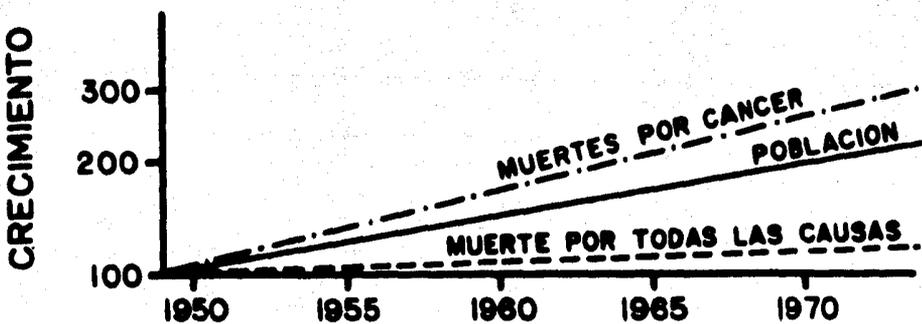
Al hablar del problema del cáncer en México, un hecho cardinal negativo es la deficiencia de la información estadística. Con excepción de algunas escasas publicaciones sobre prevalencia de cáncer cérvico-uterino (1, 2) y la información clínica, no uniforme, que existe en los archivos de hospitales institucionales, en consultorios y en los nosocomios privados, el conocimiento epidemiológico principal que se tiene respecto al cáncer, se basa en las tasas de mortalidad.

En los últimos años se han registrado aproximadamente 20,000 muertes anuales por cáncer en el país, lo que produce una tasa que fluctúa entre 36.5 y 37.6 defunciones por cada 100,000 habitantes en los años de 1970 a 1973.

En los últimos 50 años se han observado cambios de gran im-

portancia en la mortalidad en México. La tasa de mortalidad global descendió de 2400 a 750 por cada 100,000 habitantes. En ese mismo período la tasa de mortalidad por neoplasias (TMN) ascendió de 14 a 37.5 por cada 100,000 habitantes. En la actualidad las neoplasias malignas ocasionan el 5% de las muertes en México; es decir uno de cada 20 mexicanos muere por cancer. En 1975 fallecieron 21,674 mexicanos por cáncer, y en 1974 se reportaron 20,912 defunciones por cáncer.

En la gráfica I se muestra la tendencia del crecimiento en la población, la mortalidad general y las defunciones por cáncer en 24 años, de 1950 a 1973. Se observa que la tendencia al incremento de las muertes por cáncer es mayor proporcionalmente a la tendencia del crecimiento de la población y más aún que la tendencia de la mortalidad general (3).



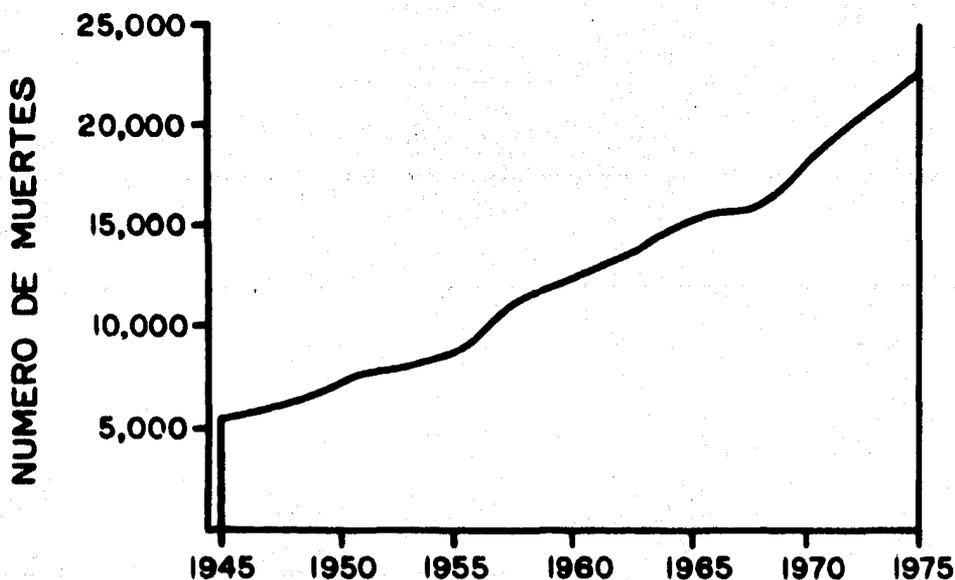
Gráfica No. 1 Fuente: Dirección General de Estadística - S.I.C.

La gráfica II muestra las defunciones por cáncer en México de

1945 a 1975.

Las principales neoplasias malignas detectadas en el hospital de Oncología del Centro Médico Nacional del IMSS de 1960 a 1975 son: a) cáncer del cérvix, b) mama, c) linfoma, d) pulmón, e) piel, f) estómago y g) laringe (4, 5).

Un hecho evidente es que el número de casos de cáncer aumentan año tras año. Algunas estimaciones indican que es probable que el número de defunciones por cáncer en México sea de aproximadamente 50,000 anuales.



Gráfica II. Defunciones por cáncer en México. Período 1945-1975
Estos son los datos Estadísticos sobre enfermedades oncológicas más recientes.

El cáncer afecta indistintamente al hombre y a la mujer, y aunque hasta hace pocos años se había considerado una enfermedad casi exclusiva de la edad adulta y de la vejez, las investigaciones clínicas y epidemiológicas demuestran que los niños, aún los recién nacidos y los jóvenes, son también víctimas del padecimiento con cierta frecuencia.

El cáncer es una enfermedad en algunos casos evitable. Es curable si se diagnostica a tiempo, cuando principia. Lo es menos en fases avanzadas, y mortal si no se trata, o si el tratamiento no es el adecuado.

Los tratamientos terapéuticos están dirigidos hacia la inhibición de la nueva formación anormal, permitiendo que el resto del organismo quede sin daño. Estos pueden ser de tres tipos: radiactivos, quimioterapéuticos y quirúrgicos, los que ocasionalmente se les emplea en forma simultánea aunque generalmente se les utiliza en forma alternada (6).

La quimioterapia del cáncer implica el empleo de productos capaces de localizar, identificar y destruir células y tejidos malignos, sin dañar a los normales.

Dentro de estos productos se encuentran algunos alcaloides aislados de la planta Catharanthus roseus entre los cuales se encuentran principalmente la vincristina (VCR), (antes conocida como leurocristina) y la vinblastina (VBL), (antes conocida

como vincalencoblastina) que han sido empleadas con éxito, desde 1963, en el tratamiento de la leucemia y de otros cánceres humanos (7, 8). Estos dos fármacos son más eficaces en las neoplasias hematológicas, en especial en la leucemia linfoblástica aguda y en los linfomas, y tienen un menor efecto en los tumores sólidos.

La respuesta que producen estos dos fármacos en las leucemias es de un 30 a un 50% y en los tumores sólidos de un 10 a un 30%. Cuando se combinan con otros medicamentos anticancerígenos dan una respuesta del 60 al 90% en los pacientes tratados.

Estas sustancias se presentan en las plantas en muy pequeñas proporciones (0.00025%), por lo que se requiere de grandes cantidades de ella para una producción comercial del medicamento; de VBL y de VCR se obtienen 1.0 g y 20.0 mg/1000 kg de planta respectivamente. Para satisfacer la demanda mundial dicha especie se colecta tanto de fuentes naturales como cultivadas, localizadas en Madagascar, Australia, Sudáfrica, Antillas Británicas, Sudamérica, Europa, la India y el Sur de los E. U. A.

En México, la VCR y la VBL se utilizan en forma bastante amplia para tratar algunos tipos de leucemia y varias neoplasias. En el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional se utiliza la VBL en dosis de 0.1 mg/Kg una o dos veces a la semana y la VCR en dosis de 2.0 mg/Kg cada 3 ó 4 semanas. En México estos

dos compuestos son de importación y se obtienen de la compañía Eli Lilly.

En México se ha tratado de producir estos dos fármacos, en Ramos Arizpe Coahuila producían VCR, pero dada la elevada neurotoxicidad que se presentó en algunos pacientes, debido posiblemente a una purificación deficiente, se ha suspendido su producción.

La VBL es ampliamente usada en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin (9, 10) y en el neoplasma testicular (11), mientras que la VCR exhibe actividad contra el linfoma de Hodgkin (12), la leucemia linfoblástica aguda (13, 14), el tumor de Wilmsy y el rhabdomyosarcoma (15, 16). La neuropatía ha sido más frecuentemente observada después de la administración de VCR, mientras que la mielosupresión ha sido la limitante de la VBL.

Catharanthus roseus es una planta pantropical que probablemente se originó en Madagascar o en las partes tropicales del viejo mundo; se dispersó por cultivo a la India, Indochina, Indonesia, Las Filipinas, Australia, Sudáfrica y el Oriente, América, Las Indias Occidentales, Europa y a Rusia.

En México se distribuye en las zonas tropicales de Jalisco, Yucatán, Puebla, Veracruz, Oaxaca, Baja California Sur y en otros estados; se le conoce con los nombres vulgares de maravilla, teresita, vicaria, ninfa, pata de perro, maravilla de

España y pervinca.

Es una planta subarborescente de 40 a 80 cm de alto por término medio, de rápido crecimiento, leñosa en su base, con ramas erectas, hojas simples, enteras, sin estípulas, opuestas, siempre verdes, coriáceas, mucronadas y obtusas. Existen en la naturaleza tres especies: albus (blanca), roseus (rosa) y acellatus (mezcla de blanco y rosa) (17).

OBJETIVO

El objetivo de esta tesis es realizar una revisión bibliográfica actualizada y lo más completa posible sobre los alcaloides de C. roseus, incluyendo la biosíntesis de éstos a partir de sus precursores más lejanos hasta la formación de las moléculas dimericas tales como las de la VBL y la de la VCR, pasando por todos sus intermediarios y enzimas que catalizan los pasos de formación, así como su farmacología, ya que estos alcaloides son de suma importancia actualmente para el tratamiento de varios neoplasmas malignos.

La importancia de este estudio radica en el hecho de que la biosíntesis de los alcaloides derivados del indol es bastante nueva y la elucidación de los intermediarios y de las enzimas que actúan en su formación apenas se están descubriendo y algunas de las enzimas aún no se describen todavía, asimismo la farmacocinética de la VBL y la VCR apenas se está estudiando

do debido a que no había las técnicas analíticas que pudieran medir la concentración en el suero de estos alcaloides después de 24 horas de su aplicación en los pacientes.

Así mismo, el conocimiento de los mecanismos de biosíntesis de estos compuestos junto con el trabajo experimental que se está realizando en el laboratorio permitirá probar los modelos de síntesis y obtención de dichos alcaloides con el fin de obtener mejores rendimientos.

CAPITULO I

BIOSINTESIS DE LOS ALCALOIDES DE
CATHARANTHUS ROSEUS DERIVADOS DEL INDOL

Catharanthus roseus es una planta que contiene casi todos los tipos de alcaloides derivados del indol, y que ha sido estudiada en forma muy significativa en los últimos 25 años.

En 1971, Kempis, Hesse y Schmid discutieron un interesante nuevo enfoque para la clasificación de los alcaloides del indol basado en el establecimiento de su biosíntesis (18). De este modo los alcaloides fueron divididos en 5 clases y dentro de cada clase se desarrollaron varias subclases. Esta clasificación se muestra en la figura I. Nótese que el sistema numerado de los alcaloides indólicos es consistente internamente; así el carbón 3 en un esqueleto es el mismo carbón, numerado 3, en un esqueleto diferente, ya que no es posible que un gran número de transposiciones complejas puedan llevarse a cabo al convertirse un esqueleto en otro, o que su formación pueda ser de un tercer esqueleto diferente.

El triptofano es el precursor biosintético de todos estos alcaloides, pero excepto para los alcaloides más simples, es raro que sea la única fuente de carbono. Frecuentemente varios de los carbonos son suministrados por otra fuente de carbono, tal como una unidad de monoterpeno. Es la diversidad

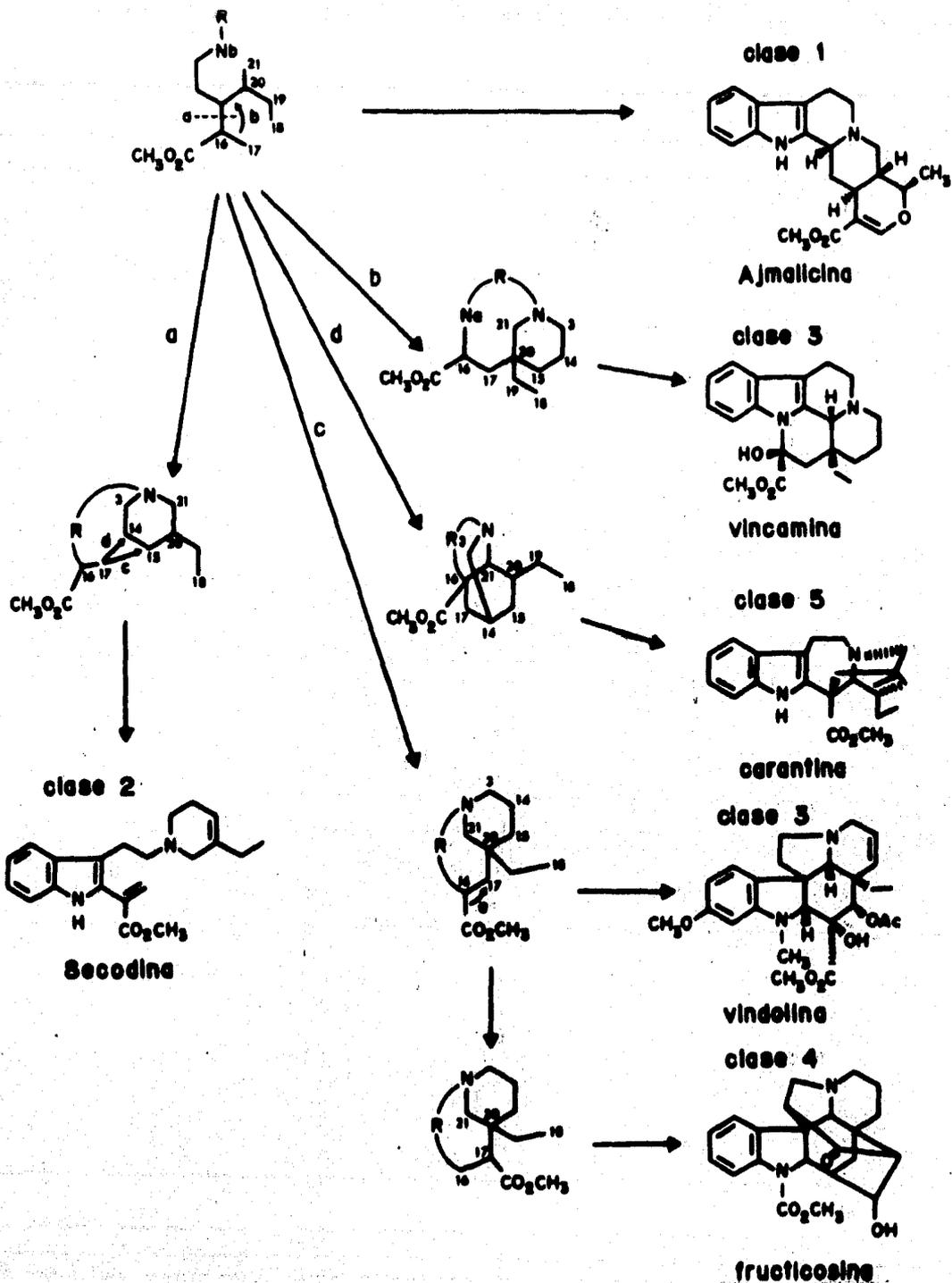


Figura 1. Clasificación de los alcaloides derivados del indol según Kempis, Hesse y Schmid (18)

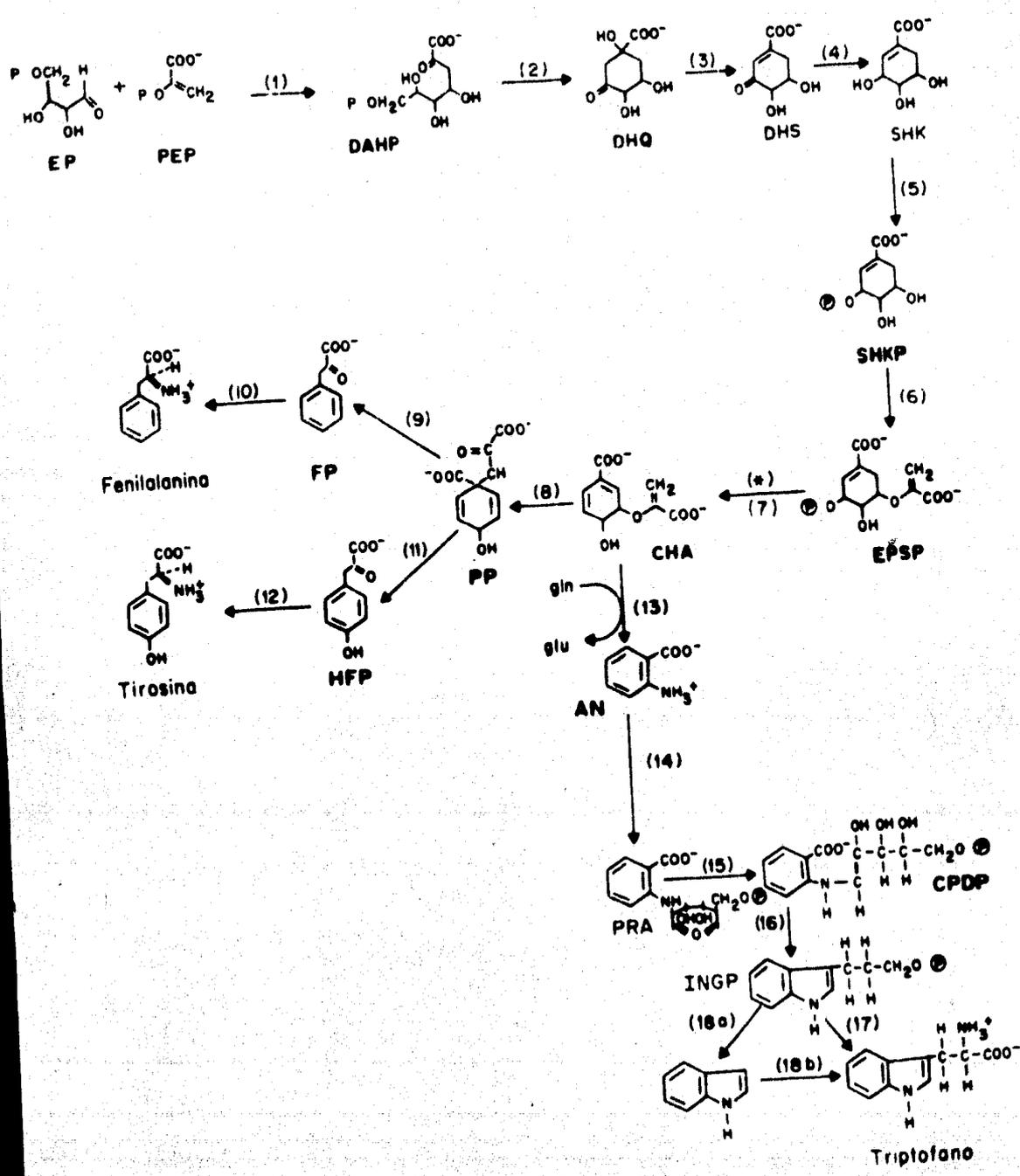


Figura 2. Biosíntesis del triptófano.

de estructuras resultante de es proceso la que ha sido responsable del gran interés en la biosíntesis de los alcaloides indólicos durante los últimos 15 años.

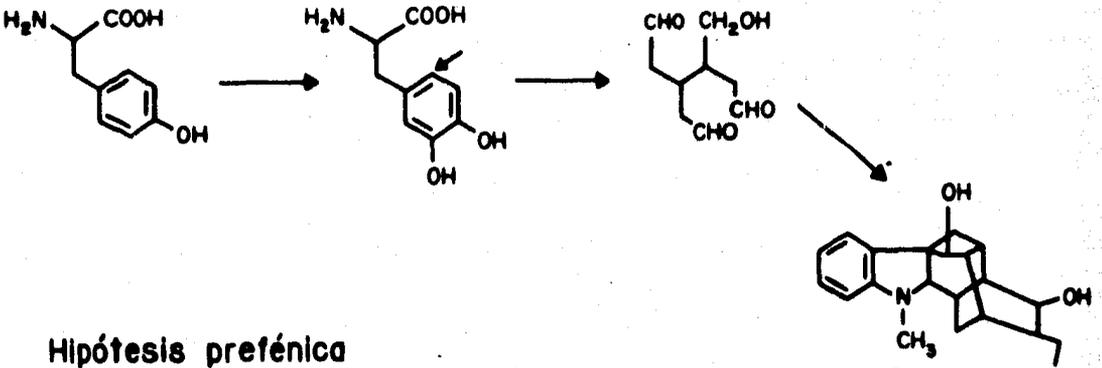
La biosíntesis del triptofano diverge de los precursores de la fenilalanina y de la tirosina en la conversión del corismato a antranilato. Estos precursores provienen a su vez de la eritrosa-4-fosfato y el fosfoenolpiruvato. La vía biosintética desde la eritrosa-4-fosfato y el fosfoenolpiruvato hasta la formación del triptofano se muestra en la figura 2.

El triptofano es descarboxilado por medio de la triptofano descarboxilasa para dar la triptamina. La triptofano descarboxilasa es la primera enzima que canaliza al metabolito primario L-triptofano hacia la síntesis de los metabolitos secundarios. Esta enzima ha sido extraída de C. roseus y ha sido parcialmente purificada por precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel (19). La actividad de la triptofano descarboxilasa parece ser uno de los factores que regulan la biosíntesis de los alcaloides en C. roseus (20-22).

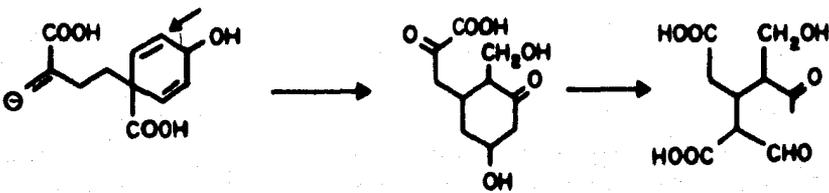
A partir de 1960 se han propuesto cuatro hipótesis para explicar el origen del fragmento no triptamínico de los alcaloides indólicos: a) Hipótesis de Woodgard (Berger-Hahn) (23); b) Hipótesis de Wenkert o prefénica (24); c) Hipótesis de Leete o acetilénica (25); d) Hipótesis terpénica (26, 27). Figura 3.

En la actualidad se han descartado las tres primeras hipótesis

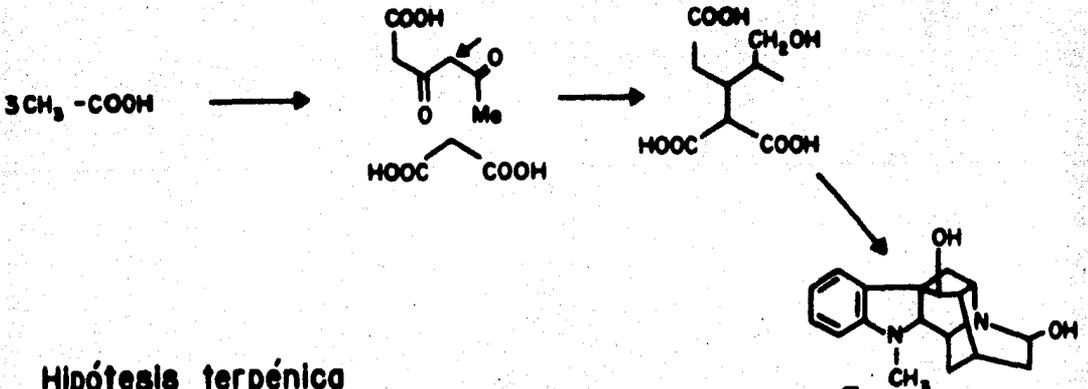
Hipótesis de woodgard



Hipótesis prefénica



Hipótesis acetilénica



Hipótesis terpénica

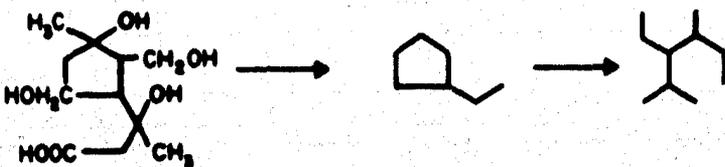


Figura 3. Hipótesis para explicar el origen del fragmento no triptamínico de los alcaloides indólicos.

(28, 29), debido a que proponen la intervención de una unidad en C-1, lo cual es incorrecto como se demostró recientemente (30, 31).

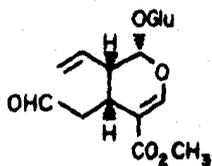
Para la hipótesis terpénica se propuso una trayectoria general cuya secuencia se dividió en tres puntos. En el primer punto se propuso que un glucósido de la secologanina se convertía al vincósido correspondiente. En el segundo punto se propuso una transformación del vincósido en alcaloides de los tipos Corinante y Estricnos. Finalmente, en el tercer punto se desarrollaron las familias *Aspidosperma*, *Iboga* y *Eburna*.

Thomas y Wenkert (26, 27), propusieron que existía una relación entre la unidad de 9 ó 10 átomos de carbono de la unidad no triptamínica y un esqueleto ciclopentanoide monoterpénico (32-36). Se realizaron experimentos de incorporación con precursores marcados con ^{14}C y los resultados aportaron pruebas que comprobaron la validez de esta hipótesis. Diferentes mevalonatos de sodio marcados con ^{14}C en las posiciones 2, 3, 4 y 5 se administraron sucesivamente a plantas de *C. roseus*, *Rhazia*, *Stricta* y *Rauwolfia* y los alcaloides aparecieron marcados en las posiciones previstas por la hipótesis terpénica (37, 38).

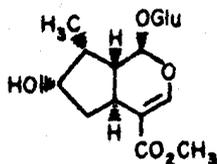
En estudios recientes se ha demostrado que en la biosíntesis de los alcaloides monoterpénicos, la porción de monoterpeno de los alcaloides proviene el glucósido seco-iridoide secol-

ganina (I) (39, 40) el cual proviene a su vez de la vía derivativa del ciclopentanoide loganina (II) (36), a partir de los monoterpenos acíclicos geraniol (III) y nerol (IV) (41-43).

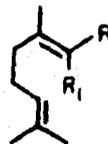
La vía metabólica exacta entre el geraniol, el nerol y la loganina, de cualquier forma aún permanece incierta. Previamente, estudios con trazadores han establecido que el 10-hidroxi-geraniol (V) y el 10-hidroxinerol (VI) fueron incorporados a loganina y a los alcaloides derivados del indol en C. roseus (44, 45). Más recientemente, mezclas consistentes de 10-oxogeraniol (VII)/10-oxonerol (VIII), 10-hidroxigeraniol (IX)/10-hidroxineral (X), y 10-oxogeraniol (XI)/-oxonerol (XII), también se incorporaron (46), mientras que los derivados tales como el 10-hidroxicitronelol (XIII), el 10-hidroxicitronelal (XIV), el 10-oxocitronelol (XV), el citronelol (XVI), el citronelal (XVII), el linalool (XVIII), el 10-hidroxilinalool (XIX) y el iridodial (XX) no lo fueron (43, 45, 47). Estos resultados concuerdan con la observación de que una marca isotópica en el C-9 del geraniol se encuentra entre el C-9 y el C-10 en la conversión a loganina (33, 34, 44) sugiriendo que la biosíntesis de loganina involucra la conversión del geraniol y el nerol por medio de varios pasos oxidativos (e isomerización apropiada) a 9,10-dioxonerol (XXI). La ciclización de (XXI) para producir (XXII), es seguida por una elaboración subsiguiente que entonces daría loganina (44, 48), figura 5.



I

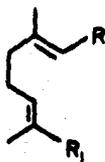


II



III R = CH₂OH, R₁ = H

IV R = H, R₁ = CH₂OH



V R = R₁ = CH₂OH

VI R = CH₂OH, R₁ = CHO

VII R = CHO, R₁ = CH₂OH

XI R = R = CHO

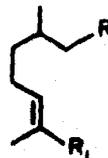


VII R = R₁ = CH₂OH

VIII R = CH₂OH, R₁ = CHO

IX R = CHO, R₁ = CH₂OH

XII R = R = CHO



XIII R = R₁ = CH₂OH

XIV R = CHO, R₁ = CH₂OH

XV R = CH₂OH, R₁ = CHO

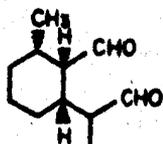
XVI R = CH₂OH, R₁ = CH₃

XVII R = CHO, R₁ = CH₃



XVIII R = CH₃

XIX R = CH₂OH



XX

Figura 4. Metabolitos usados para determinar la vía biosintética entre el geraniol y la loganina.

A pesar de la evidencia obtenida, falta información definitiva que considere la importancia geométrica del doble enlace o evidencia directa que aporte la importancia de los derivados del geraniol 9,10-dioxigenado (o del nerol).

Con el desarrollo de cultivos celulares de plantas, lo cual ofrece ventajas sobre el uso de plantas intactas, ya que se tienen menos problemas asociados con el transporte de metabolitos y hay un mayor control de las condiciones experimentales (49), se espera que estas incertidumbres puedan ser resueltas. Recientemente se ha determinado que suministrando una mezcla de 10-hidroxigeraniol y de 10-hidroxinerol marcados con deuterio a cultivos en suspensión de C. roseus se encuentra hasta un 80% de alcaloides marcados (50). Esta incorporación fue superior a la observada cuando se usaron plantas intactas para los estudios traza y dió buenas perspectivas para estudios posteriores. Posteriormente se prepararon varios compuestos 9- y/o 10-oxigenados derivados de geraniol, geranial, nerol y neral marcados con deuterio en el C-1 (51).

Los resultados al suministrar la mezcla de los compuestos mencionados en el párrafo anterior son consistentes con el esquema de la figura 6.

La vía metabólica propuesta incluye la hidroxilación del geraniol para producir 10-hidroxigeraniol el cual a su vez es

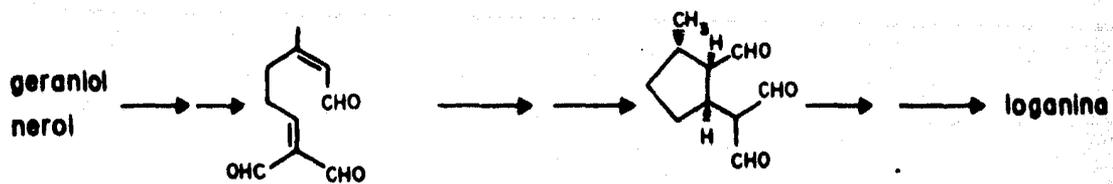


Figura 5. Intermediarios de la vía del geraniol o el nerol para dar loganina

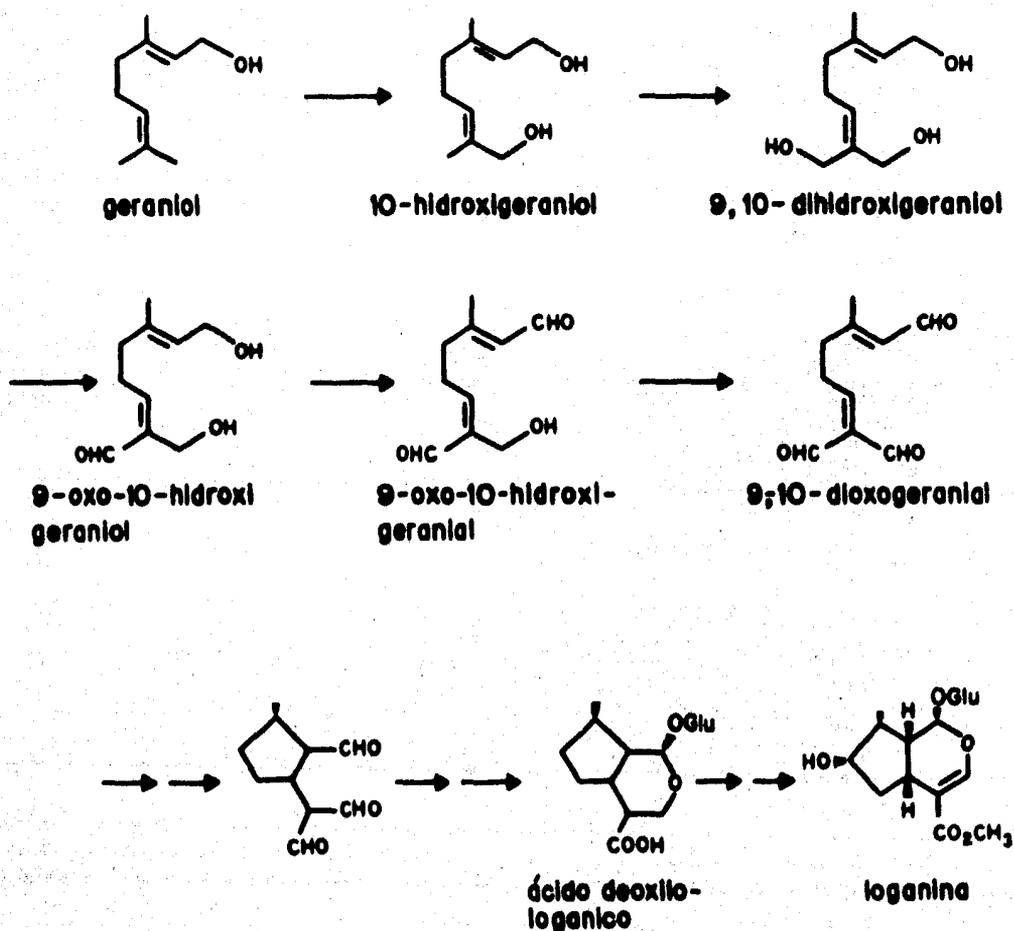


Figura 6. Camino biosintético propuesto entre el geraniol y la loganina.

hidroxilado en el C-9 para dar 9,10-dihidroxigeraniol. La importancia del 9,10-dihidroxigeraniol como un precursor fue deducida por su incorporación en la ajmalicina, mientras que la importancia de la geometría E acerca del doble enlace 2,3 fue mostrada por la pobre incorporación del 9,10-dihidroxinerol en la ajmalicina (la geometría E es aquella geometría en la que la E proviene de la palabra alemana entgegen-opuesto, indicando que dos grupos químicos de peso molecular prioritario están en una posición espacial opuesta en un doble enlace).

El hecho de que el C-10 es específicamente hidroxilado antes de poder seguir siendo metabolizado fue establecido por la nula incorporación del 9,10-hidroxigeraniol en la ajmalicina.

Los siguientes pasos en la vía metabólica envuelven oxidaciones sucesivas de los grupos hidroxilo del 9,10-dihidroxigeraniol para dar 9,10-dioxogeraniol (o un derivado equivalente, tal como un hidrato). Específicamente, los resultados de rastreo, aunque no concluyentes, sugieren la secuencia de oxidaciones procediendo en el orden C-9, C-1 y C-10. La sugerencia de que el 9-oxo-10-hidroxigeraniol es el primer intermediario aldehídico, está basada en la mejor incorporación de la mezcla del 9-oxo-10-hidroxigeraniol y del 9-hidroxi-10-oxogeraniol. La importancia de la geometría E acerca del doble enlace 2,3 fue de nuevo corroborada por la falta de incorporación significativa del 9-oxo-10-hidroxinerol y del 9-hidroxi-10-oxonerol.

La propuesta de que el siguiente intermediario en la vía metabólica es el 9-oxo-10-hidroxigeranial, está basada en la pobre incorporación del 9,9,10,10-tetraetoxigeranial y la buena incorporación del 9,9,10,10-tetraetoxigeranial, lo cual implica que el 9,10-dioxogeranial (o un derivado correspondiente tal como un hidrato) es el precursor y sugiere que el C-10 es oxidado después del C-1. La importancia de la geometría E acerca del doble enlace 2,3 fue de nuevo ilustrada por la falta de incorporación del 9,9,10,10-tetraetoxinerol. La validez de usar derivados del 9,10-diacetal como substratos en lugar de los aldehidos correspondientes está basada en la observación de que el 10,10-dimetoxigeranial fue tan buen precursor como el 10-oxogeranial. Los pasos restantes en la vía a loganina incluye la reducción del doble enlace 2,3 del 9,10-dioxogeranial y la ciclización (no necesariamente en ese orden) seguida por una posterior modificación para dar ácido deoxilogánico y finalmente loganina. La deoxiloganina y el ácido logánico han sido previamente implicados como precursores (52, 53).

Mientras que se mostró que es importante la geometría E del doble enlace 2,3 de los derivados 9,10-dioxigenados, ésta no fue la situación con los derivados 9-oxo ó 10-oxigenados ya que todos los derivados probados mostraron ser buenos precursores. Este resultado puede ser explicado en la base de que estos derivados son precursores indirectos, los cuales pueden ser canalizados en la vía biosintética de los alcaloides del

indol a través de una secuencia apropiada de oxidación y/o isomerización y/o reducción, figura 7. Similarmente, también se sugiere que el nerol, el neral, el geraniol y el geranial con la secuencia apropiada de oxidación y/o isomerización y/o reducción e hidroxilación (en el C-10) también pueden ser canalizadas en la biosíntesis de los alcaloides a través de la vía del 10-hidroxi geraniol.

Ya hay varios precedentes para las conversiones e interrelaciones delineadas en la figura 7. Se ha demostrado que el geraniol y el nerol se oxidan (en la presencia de NAD^+ y NADP^+) a geranial y neral en un extracto libre de células de C. roseus. La reacción inversa, la reducción de geranial y neral a geraniol y nerol se ha mostrado que ocurre en la presencia de NADH ó NADPH (48). Considerando la relación entre los derivados del geranial y el neral no se necesita una catálisis enzimática, ya que los aldehídos son rápidamente isomerizados bajo condiciones ácidas ó básicas, con el equilibrio en favor de los derivados del geranial; la utilización subsecuente de solo los isómeros del geranial en la biosíntesis representaría entonces el medio para el cambio del equilibrio en esa dirección. Similarmente, la buena incorporación de los derivados 9-oxo pudo ser informada por su rápida isomerización a los isómeros 10-oxo correspondientes. El equilibrio para la isomerización es buena en los isómeros 10-oxo (51). La reducción del 10-oxo produce entonces el compuesto 10-hidroxi correspondiente. Considerando la hidroxilación del grupo metilo en el

C-10, se ha obtenido una preparación enzimática a partir de un cultivo en suspensión de C. roseus, así como también de la planta intacta, la cual es capaz de convertir al geraniol y al nerol en 10-hidroxigeraniol y 10-hidroxinerol respectivamente (54,55).

Para obtener una corroboración posterior para el papel indirecto de los derivados 9-oxo y el 10-oxigenado, se llevaron a cabo experimentos de rastreo en los que mezclas de citral no marcado (una mezcla de geranial y neral) y varios de los derivados marcados con deuterio se usaron como substrato asumiendo que, ya que el citral y varios de los derivados del geraniol, geranial, nerol y neral son precursores indirectos los cuales son introducidos en la vía de los alcaloides indólicos a través del 10-hidroxigeraniol, debería haber una competencia directa entre ellos, disminuyendo significativamente la proporción de la ajmalicina marcada producida. Por el contrario, la presencia del citral no marcado no debía afectar significativamente la incorporación del precursor directo marcado. Los resultados de los experimentos de competencia comprobaron las expectativas anteriores. Las incorporaciones del 9-oxogeranial, del 10-oxonerol, y del 10-oxonerol en la ajmalicina fueron casi completamente inhibidos por el citral, mientras que la incorporación del 9,10-dihidroxigeraniol no fue afectada significativamente. Debe notarse también, que existen además otras vías posibles para la canalización de los precursores indirectos en el 10-hidroxigeraniol y la vía de los al-

caloides del indol, y no todas éstas necesitan ser operativas, más aún, varios de los precursores indirectos no son necesariamente producidos por las células sino más bien pueden ser solo utilizados por ellas. Así por ejemplo, la catalización ácida de la isomerización del 9 ó 10-oxoneral daría el 10-oxogeraniol el cual sólo requiere la presencia de una reductasa no específica para ser convertido en 10-hidroxigeraniol.

La vía biosintética de la secologanina a partir de la mevalonolactona con los intermediarios ya determinados específicamente se muestra en la figura 8.

Las enzimas que catalizan la biosíntesis de la secologanina son: a) la geraniol-nerol hidroxilasa, b) la geraniol-nerol oxidoreductasa y c) la S-adenosil-L-metionina: ácido logánico metiltransferasa.

A) Geraniol nerol hidroxilasa. Es la enzima que hidroxila tanto al geraniol como al nerol para dar sus derivados 10-hidroxilados. Es una oxigenasa del grupo citocromo P₄₅₀. La electroforesis en geles de acrilamida de esta enzima muestra dos bandas, una con un peso molecular de 63,000 daltons y la otra de 78,000 daltons. En donde la banda más ligera pudiera ser el producto de degradación proteolítica de la de 78,000 daltons. Su actividad es estimulada por FMN exógeno, sugiriendo que es una flavoproteína. El espectro visible confirmó el carácter de flavoproteína de

BIOSINTESIS DE ESTRICTOSIDINA

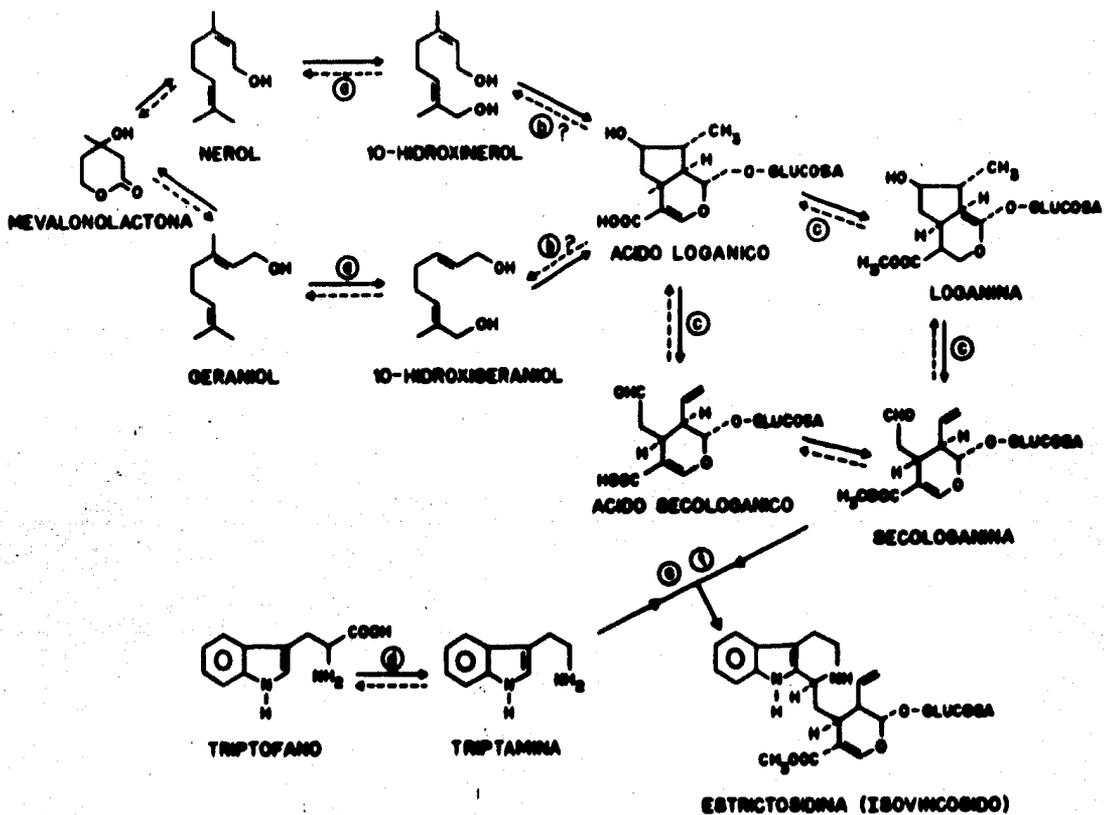


Figura 8.

la enzima (56).

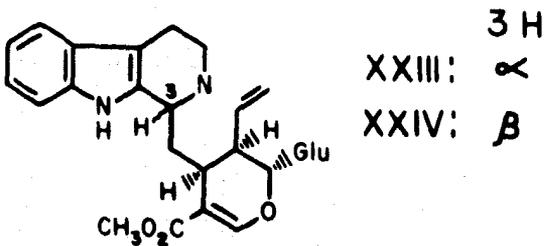
Esta reductasa transfiere electrones al ferricianuro y al 2,6-diclorofenolindofenol, así como al citocromo c. No es inhibida por actinomicina A, dicumarol, superóxido dismutasa o catarantina, pero si es inhibida por NADP^+ y por p-cloromercuribenzoato. Es altamente específica para la hidroxilación de los metilos C-10 del geraniol y del nerol y su acción es dependiente del NADH y no hidroliza los pirofosfatos. Esta enzima se localiza en las vacuolas o provacuolas.

B) Geraniol nerol oxidoreductasa. Cataliza la conversión del geraniol a geranial y del nerol a neral, en la presencia de NAD^+ ó NADP^+ y la reacción inversa cuando se utiliza el NADH ó el NADPH (57, 58). Esta oxidación puede estar involucrada en la biosíntesis, quizás como un intermediario entre el 10-hidroxigeraniol (o el nerol) y el ácido logánico.

C) S-Adenosil-L-metionina: ácido logánico metiltransferasa. Esta enzima convierte el ácido logánico y al ácido secologánico a loganina o secologanina (sus metilésteres) y ha sido parcialmente purificada por Baxter en 1972 y Coscia en 1971 (59, 60).

La condensación de triptamina y secologanina producen dos

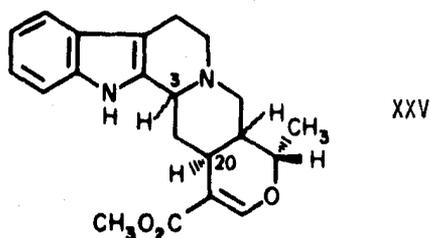
alcaloides diastereoisoméricos (XXIII, XXIV), los cuales se encuentran en la naturaleza, pero sólo uno de ellos actúa como precursor biogénico de los alcaloides representativos de los tipos Corinante, Iboga y Aspidosperma. En experimentos de rastreo en C. roseus (61) se consideró que el isómero activo era el vincósido epímero (XXIV), mientras que el epímero 3- α -estrictosidina (XXIII) no era incorporado aparentemente en estos alcaloides. De aquí surgió una anomalía, ya que uno de los productos, la ajmalicina, poseía una estereoquímica 3- α - y por lo tanto debería haber



una inversión del hidrógeno 3 si derivaba del vincósido. Experimentos posteriores indicaron que la configuración del hidrógeno 3 era retenida.

En estudios recientes se llevaron a cabo conversiones biomiméticas de la estrictosidina y del vincósido a alcaloides heteroyohimbina (62, 63). El tratamiento del primero en buffer acuoso a pH 5 a 6.5 con β -glucosidasa en la presencia de borohidruro de sodio dió sólo dos alcaloides: la

tetrahidroalstonina (XXXIV), y la ajmalicina (XXXI), en tanto que el vincósido produjo el isómero 3- β -acuamicina (XXV). Esto indica claramente que la strictosidina es un precursor de los alcaloides 3- α -Corinantes bajo las condiciones fisiológicas normales de la planta.



Una condensación no enzimática de la triptamina con la secologanina produce una mezcla del vincósido y del isovincósido (64).

La evidencia anterior sugiere que en la planta C. roseus se produce enzimáticamente sólo un epímero, el C-3 (S)- α -isovincósido o strictosidina.

La aplicación de strictosidina a explantes de C. roseus demostró que era incorporada a tetrahidroalstonina, ajmalicina, catarantina y vindolina, pero como se esperaba no dió el alcaloide 3- β -acuamicina.

Por todo esto se ha asumido que la strictosidina es el compuesto clave en la intrincada vía metabólica que lleva a los alcaloides indólicos con diferentes estructuras,

La enzima que sintetiza la estrictosidina a partir de la triptamina y la secologanina es la estrictosidina sintetasa, figura 8.

La estrictosidina sintetasa ha sido obtenida a partir de extractos libres de células de C. roseus por precipitación con sulfato de amonio, redisolviendo en buffer a pH 7,6 y tratándola con dextran recubierto con carbón (65).

La enzima pura es menos estable, perdiendo la mitad de su actividad en una semana a 4°C. Tiene un amplio rango de pH óptimo, entre 5 y 7.5 y valores de Km de 0.46mM para la secologanina y 0.83 mM para la triptamina. El peso molecular obtenido por filtración en gel fue de 38,000. Su actividad no es inhibida por los reactivos que se unen a los grupos sulfhidrilo, ni por algunos alcaloides derivados de la estrictosidina; lo que sugiere que no hay regulación por retroalimentación (66).

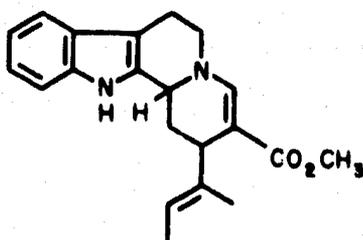
Recientemente se ha detectado que la estrictosidina (67, 69) y la catenamina (XXXIV) (70) son intermediarios pivotes en la formación enzimática de los alcaloides monoterpénoides del indol del tipo heteroyohimbina (XXXV-XXXVII: ajmalicina, 19-piajmalicina y tetrahydroalstonina) en extractos libres de células.

Las reacciones inicial y final están catalizadas por la es-

trictosidina sintetasa (68) y la catenamina reductasa (70) respectivamente.

El complejo de la ajmalicina sintetasa convierte a la secolongina y a la triptamina en ajmalicina y a alcaloides relacionados y fue estudiada primero por Scott y Lee en 1975 (19). El pH óptimo de la enzima es 6.5 y acepta un amplio número de triptaminas substituidas como substratos; los inhibidores fueron metales de transición y la δ -D-gluconolactona. El sistema parece consistir al menos de la estrictosidina sintetasa, de la β -glucosidasa y de una reductasa dependiente de nucleótidos de piridina (71).

La ajmalicina sintetasa produce también vallesiachotamina (XXVI) además de los alcaloides ya mencionados. Entre éstos, la 19-epiajmalicina presenta un problema ya que no ha sido encontrada en C. roseus (72).

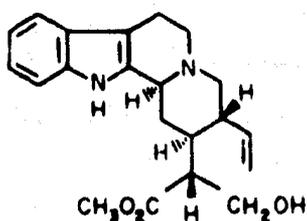


XXVI

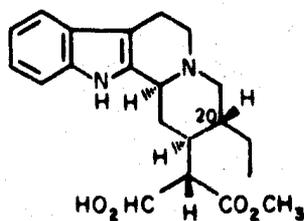
El paso enzimático inmediatamente inicial, envuelve la acción de una β -glucosidasa la cual hidroliza al glucósido alcaloidal de la estrictosidina (XXIII) para dar una aglicona inestable (XXIX) la cual se abre para dar un dialdehído (XXX) (64)

con una configuración 3- α (S). Este compuesto altamente reactivo (XXX) sufre una transformación posterior para dar la catenamina (XXXIV) como precursor de los alcaloides ajmalicina, 19-ajmalicina y tetrahidroalstonina. En un esfuerzo por elucidar esta secuencia de reacciones y por atrapar al precursor de la catenamina para su identificación, se incluyó BH_4^- en la mezcla de reacción enzimática para reducir el dialdehído proveniente de la strictosidina y evitar así una conversión posterior.

En presencia de BH_4^- una preparación enzimática de *C. roseus* de un cultivo de células transforma a la strictosidina en sitsirikina (XXVII) y 16-iso-sitsirikina (XXVIII) las cuales son derivados del aldehído 4,21-dehidrocorinanteína (XXXII), un intermediario en la formación de los alcaloides del tipo heteroyohimbina.



XXVII



XXVIII

La aparición de este par de isómeros (XXVII, XXVIII) bajo las condiciones de las reacciones antes dichas demuestra que el dialdehído (XXX) es tan reactivo que no puede atraparse con BH_4^- pero que sufre un cierre intramolecular del anillo D para

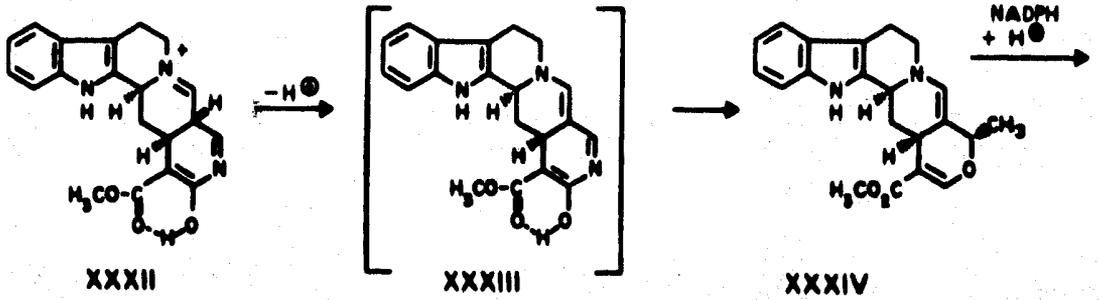
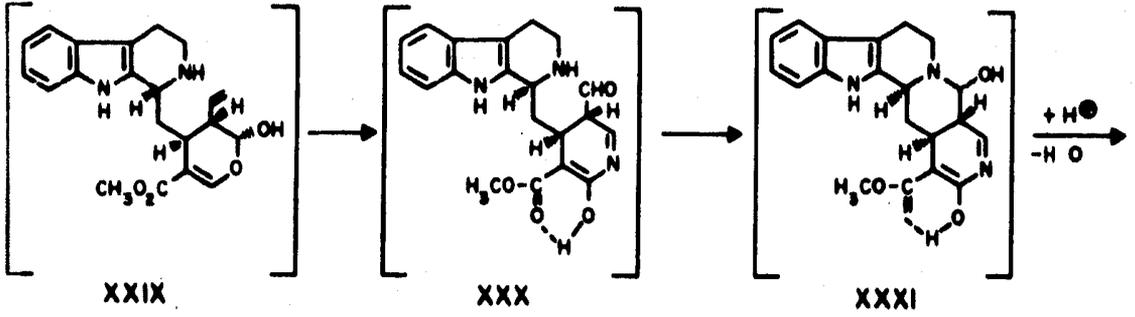
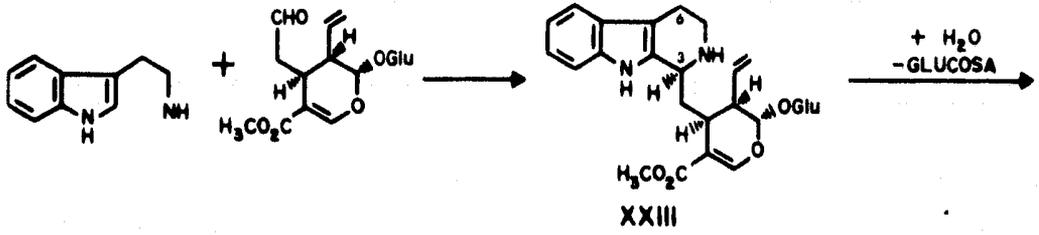
dar el ion imonium (XXXII) o su forma polar.

Es este intermediario, el aldehído 4,21-dehidrocorinanteína (XXXII) el que está envuelto en la biosíntesis de los alcaloides monoterpénoides (XXXV-XXXVII), lo que es demostrado por la reducción con BH_4^- que da (XXVII), XXVIII). En ausencia de BH_4^- la estrictosidina es transformada a catenamina (70, 73). La estrictosidina es hidrolizada por la β -glucosidasa obtenida de la almendra dulce o por tratamiento ácido que da vallesia-chotamina (62, 74), mientras que bajo las condiciones dadas en un extracto libre de células el aldehído 4,21-dehidrocorinanteína (XXXII) es el intermediario crucial; esto indica que existen enzimas específicas involucradas en la secuencia metabólica desde la estrictosidina hasta la catenamina.

Se ha propuesto (64) que el compuesto (XXXII), entre otros, está envuelto en la biosíntesis de los alcaloides monoterpénoides derivados del indol.

La vía biosintética propuesta que produce los alcaloides del tipo Corinante (XXXV-XXXVII) con actividad hipotensiva se muestra en la figura 9.

La primer enzima que actúa sobre la estrictosidina en la vía metabólica para producir ajmalicina es la β -glucosidasa. La filtración en gel del sobrenadante de 37,000 g de las semillas de C. roseus muestran la presencia de cuatro isoenzimas de la



aldehído 4, 21-dehidro-
 corinanteína

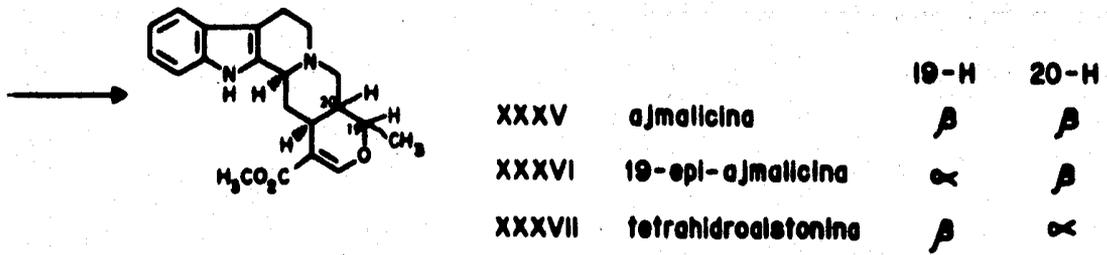


Figura 9. Biosíntesis de la ajmalicina y sus isómeros a partir de la estrictosidina.

β -D-glucosidasa cuando se analizaron con p-nitrofenil- β -glucosidasa (75). Dos de estas hidrolasas fueron obtenidas de igual manera a partir de cultivos de callos. Una de éstas a partir de planta completa y otra de callos, ambas con peso molecular de 50,000 daltones y ambas pudieron sintetizar ajmalicina, pero esta capacidad se pierde rápidamente.

La inhibición de esta deglucosilación por la adición de ϵ -D-gluconolactona, un inhibidor de la β -glucosidasa, confirmó su participación en la secuencia (71).

En un sistema libre de células de C. roseus la β -glucosidasa convierte a la triptamina y a la secologanina, así como a la geisoschisina (XXXIX) en ajmalicina (XXXV). Stockigt y Zenk (76) confirmaron después, la conversión de la triptamina y la secologanina en ajmalicina más dos alcaloides diastoméricos: la 19-epiajmalicina (XXXVI) y la tetrahydroalstonina (XXXVII).
Figura 10.

Para clarificar la intermediación de la geisoschisina (XXXIX), la cual ha sido ya apoyada por experimentos in vivo (77-78) e in vitro (19), se llevó a cabo el estudio (79) de la cinética de incorporación de una mezcla de (2-¹⁴C)-triptamina y (aril-³H)-geisoschisina en la ajmalicina en un sistema libre de células (19). Los datos demostraron claramente la intermediación de la geisoschisina en la biosíntesis de la ajmalicina y de la tetrahydroalstonina. No se formaron cantidades sig-

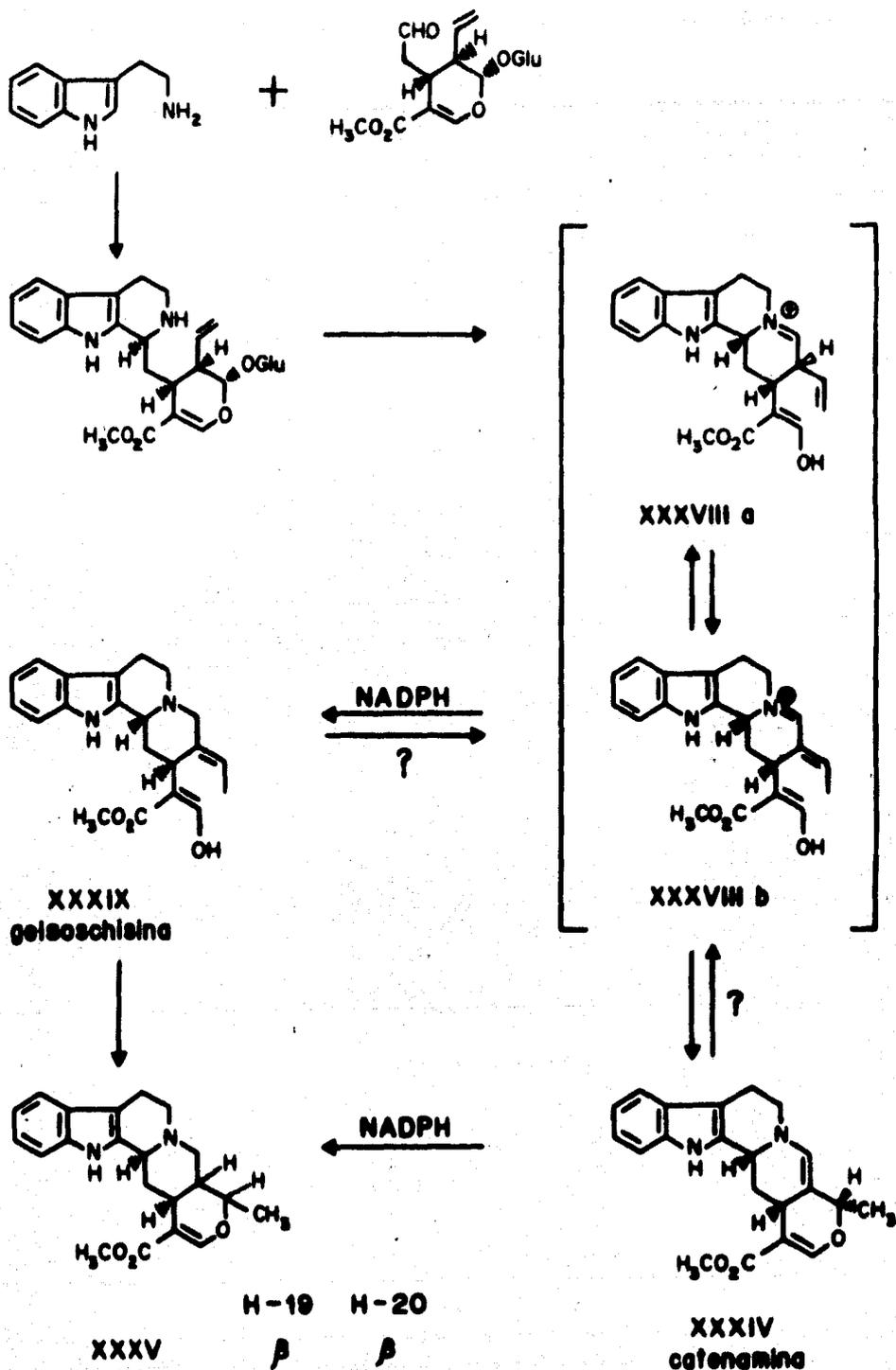


Figura 10. Intermediación de la geissoschizina en la biosíntesis de la ajmalicina.

nificativas de 19-apiajmalicina en estas incubaciones. La ciclización del anillo E parece así ser llevada a cabo por el ataque de un protón al C-20 en la cara "si" para dar ajmalicina, o a una velocidad mucho más reducida en la cara "re" para dar tetrahydroalstonina generando un nuevo ion carbonio en el C-19 el cual a su vez es estabilizado por el enolato de la cara "si". La geisoschisina no es convertida en ajmalicina en la ausencia de las enzimas, figura II.

La baja incorporación de (³H)-geisoschisina en la ajmalicina así como su baja abundancia en la planta sugiere que siempre se encuentra unida a la enzima y también que es rápidamente convertida en otros alcaloides.

Estos datos no descartan la intermediación de la catenamina, la cual como un producto en equilibrio de las especies imonium (XXXVIIIb), puede ser convertida en ajmalicina y en tetrahydroalstonina.

En ausencia de nucleótidos de piridina reducidos se acumula un precursor de los isómeros de la ajmalicina el cual se aisló y se confirmó que era la 20,21-dehidroajmalicina al cual se le dió el nombre trivial de catenamina y puesto que la ajmalicina no es convertida en los isómeros (XXXVI) y (XXXVII) por la mezcla enzimática, debe haber un control estereoquímico a nivel de la catenamina (XXXIV). Por tanto se puede racionalizar una interconversión catalizada enzimáticamente de la

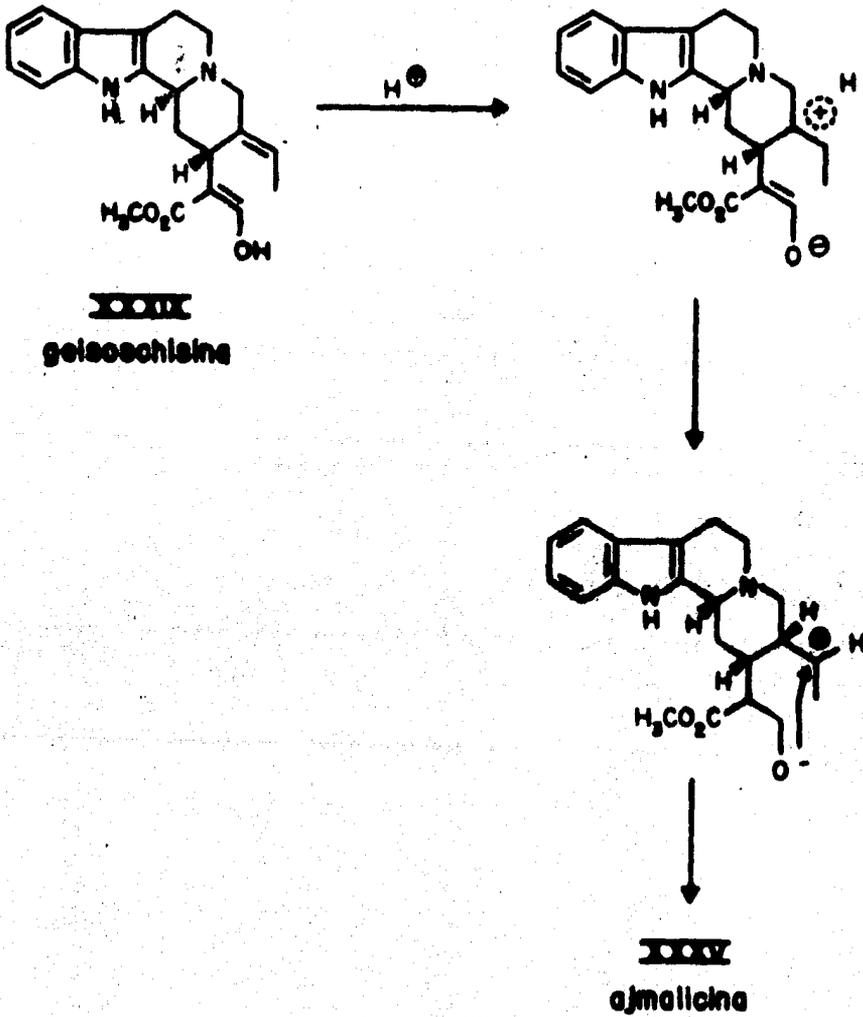
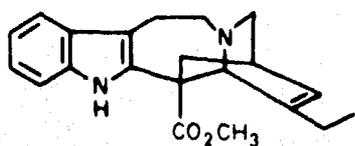


Figura 11. Biosíntesis de la ajmalicina a partir de la geissoschizina.

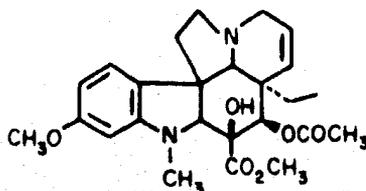
ajmalicina para dar tetrahydroalstonina y/o una apertura del anillo tipo Michael para dar 19-apiajmalicina.

A partir de la ajmalicina se forma la catarantina (XL) que es un alcaloide del tipo Iboga, la cual junto con sus derivados en la forma intermediaria correspondiente del N-óxido, puede acoplarse con la vindolina (XLI) o sus derivados para dar los sistemas bisindol requeridos, figura 12. Bajo condiciones apropiadas (80) se obtienen rendimientos altos reproducibles (60%) de análogos de vinblastina proveyendo por lo tanto una ruta eficiente a partir de (XL) y (XLI).



XL

Catarantina
(Tipo Iboga)



XLI

Vindolina
(Tipo Aspidosperma)

La línea celular 200 GW (81) provee catarantina en cantidades tres veces mayor que las obtenidas a partir de C. roseus (generalmente se produce 0.0017% a partir de planta seca, mientras que la línea celular da 0.005%).

Se han usado extracto libres de células de C. roseus para demostrar la formación de 3,4-dehidrovinblastina y de leurosina

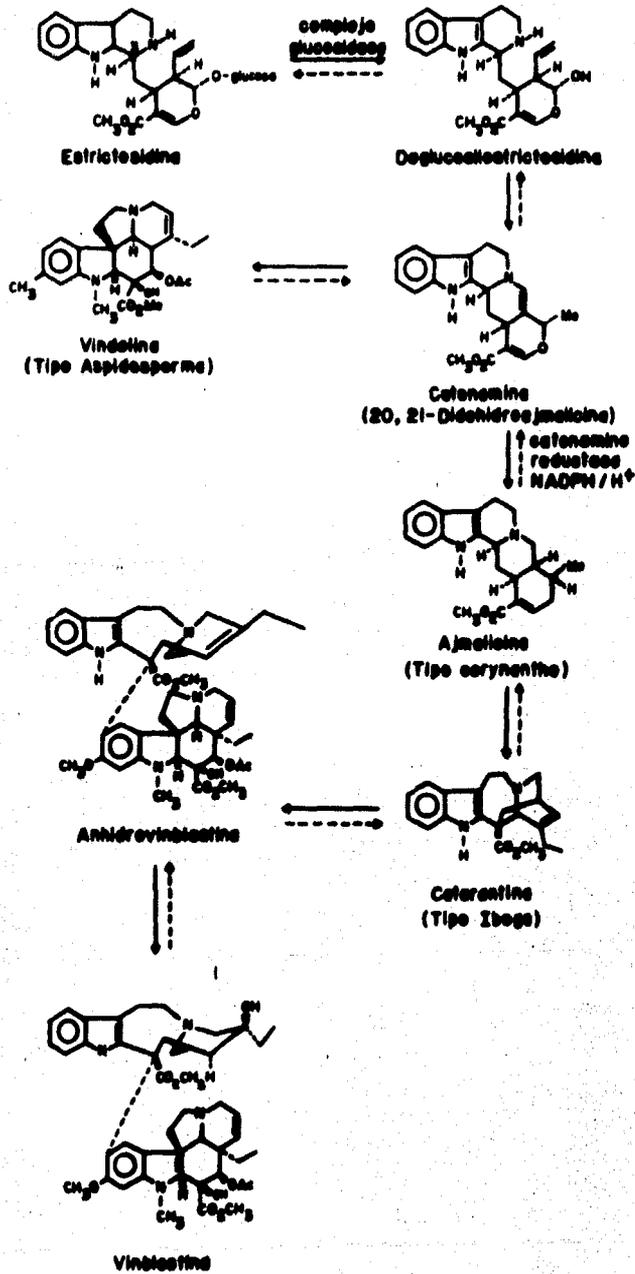


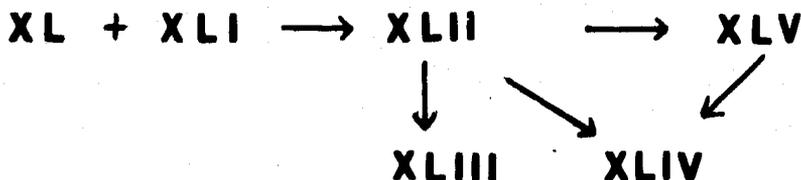
Figure 12 Biosíntesis de Vinblastine

a partir de catarantina y vindolina marcadas con radiactividad. Se ha establecido que la 3,4- dehidrovinblastina es un precursor de los alcaloides del grupo de la vinblastina (82, 83).

Un reporte reciente (84) describe el uso de cortes apicales de C. roseus para estudiar la incorporación de catarantina y vindolina en la vinblastina (XLIII) en una extensión de 0.006%. En vista de estas incorporaciones tan bajas en plantas intactas (85), se hicieron estudios (83) en extractos libres de células de C. roseus en los que sí hubo incorporaciones significativas de triptamina en la vindolina (XLI) (1.36%) (82), y un intermediario en una fase posterior (XLII) en el producto natural leurosina (XLV) (8.22%), catarina (XLIV) (15.15%) y vinblastina (XLIII) (1.84%) (86).

El (Ar-³H)-catarantina es transformada al compuesto marcado (XLII, 3,4-dehidrovinblastina) en una magnitud del 0.54%, y el alcaloide leurosina (XLV) produce 0.36%. Más aún, la incubación simultánea de (Ar-³H)-catarantina y (Ac-¹⁴C)-vindolina produjo los dos compuestos marcados (XLII) y (XLV).

Estos resultados, junto con la transformación de (XLII) a los alcaloides (XLIII), (XLV) y (XLIV) apoyan fuertemente el modelo siguiente de la biogénesis de los alcaloides del bisindol.



Generalmente se acepta que los precursores con el esqueleto de cleavamina, tal como (XLVI), no están involucrados en la biosíntesis de estos alcaloides ya que no se han encontrado compuestos monoméricos relacionados en la planta. Más bien, la desunión inicial de un indol -3- tal como (XLVII), sustituye a la catarantina para producir alcaloides monoméricos, por ejemplo (XLVI). El intermediario N-óxido (XLVIII) parece ser sumamente probable, figura 13. La alimentación del compuesto marcado en *C. roseus* ha sido ya llevado a cabo (83), pero la incorporación específica de sólo el 0.008% en la vincristina (XLIX) fue considerada insignificante. De cualquier forma, el uso actual de un intermediario tal como el (XLVIII) acoplado con (XLI) daría las especies imonium, la cual con una reducción enzimática, usando NADPH como cofactor, daría (XLII). Reducciones conjugadas similares pueden llevarse a cabo para los alcaloides 4-deoxivinblastina (LI) y 4-deoxileurosina (LII).

La formación de vinblastina, leurosina y catarina a partir de 3',4'-dehidrovinblastina (XLII) ya ha sido demostrada, pero la incorporación significativa de (XLII) en la vincristina (XLIX) no ha sido demostrada (87). Varias rutas indirectas para dar

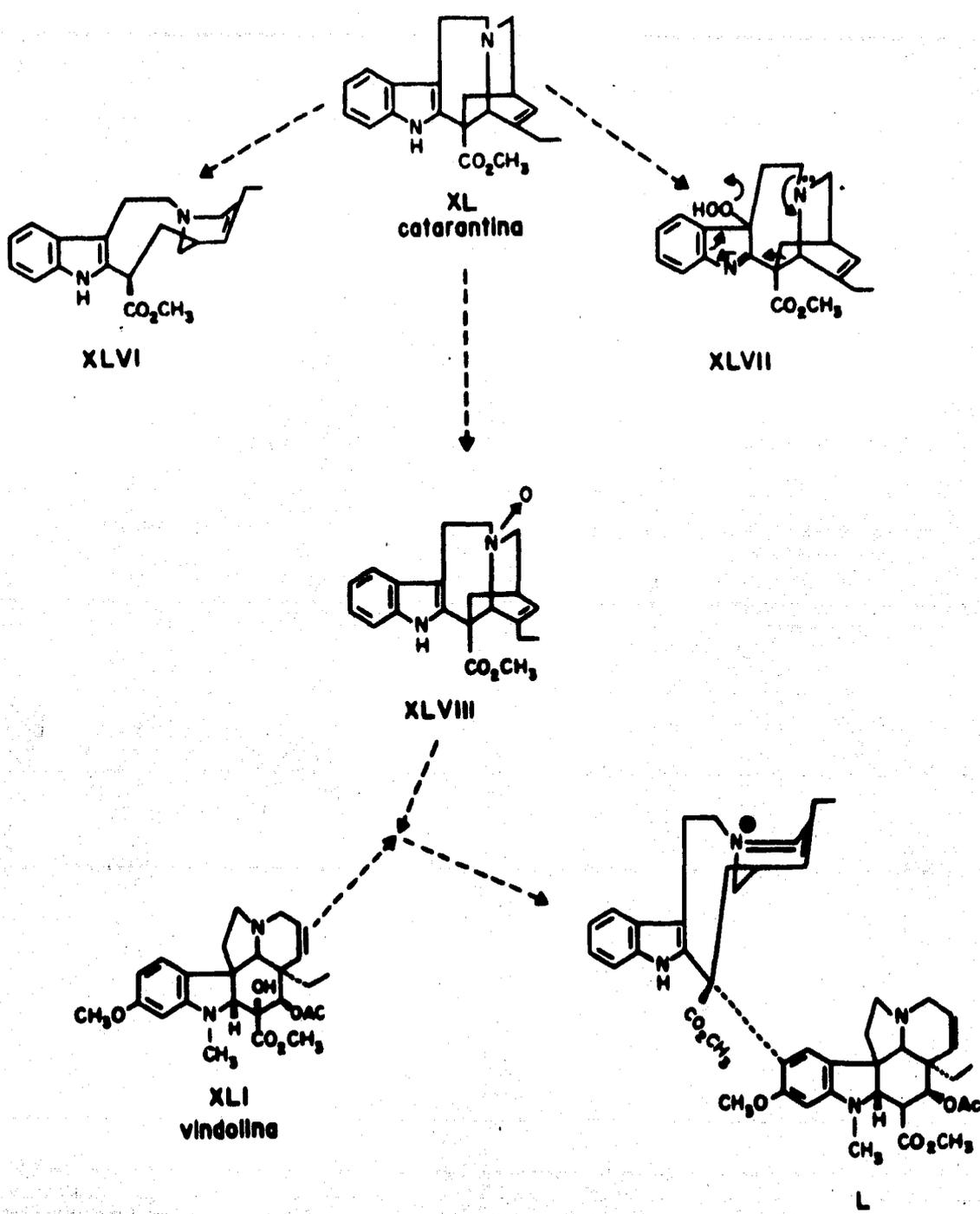


Figura 13. Formación del 6-óxido (L) a partir de la vindolina y del intermediario N-6-óxido (XLVIII).

vincristina pueden ser propuestas y una de éstas, envuelve una N-demitilación inicial y la subsecuente formilación gana mérito a partir de la oxidación/descomposición de las aminas aromáticas terciarias por las peróxidasas (88). Una propuesta interesante para la elaboración de vinblastina se muestra en la figura 14. Los modelos moleculares muestran que la hidroxiperóxindoleina (LIII) está orientada idealmente hacia la conversión de (LIV) el cual puede representar un precursor inmediato de la vinblastina.

El hecho de que la conversión de (XLII) a varios productos naturales en estudio (vinblastina, leurosídina, leurosina, vincristina, vincadiolina, etc.), necesitaba de una actividad del tipo peróxidasa, se dedujo del uso de la peróxidasa de rábano en extractos libres de células de C. roseus (89). Más tarde se detectó una actividad de peróxidasa en extractos libres de células de C. roseus, usando dos métodos de ensayo independientes (90).

Las reacciones con enzimas de C. roseus fueron más complicadas que las reacciones con la peróxidasa de rábano en vista probablemente del número de enzimas presentes en los extractos de células libres.

El rendimiento de la leurosina parece ser afectado al menos por dos factores. Primero, por el rápido consumo de (XLII), posiblemente por las enzimas del tipo peróxidasa, así como

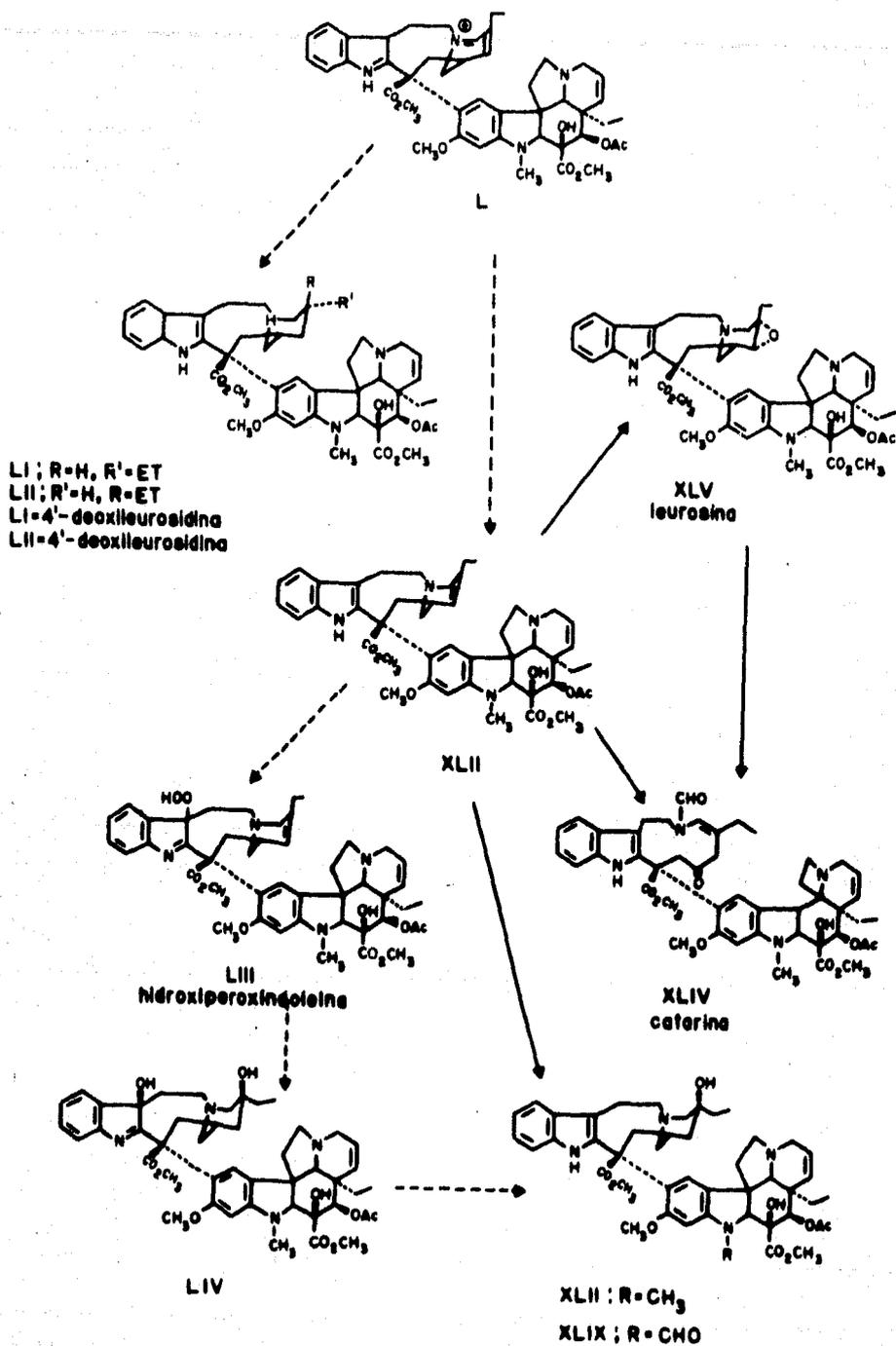


Figura 14. Vía biosintética propuesta para la síntesis de la vinblastina y de la vincristina a partir del óxido (L).

por otras enzimas presentes en la mezcla y segundo, la probable conversión posterior de la leurosina.

Estos resultados sugieren fuertemente que la leurosina es un producto natural, posiblemente formado a partir del 3,4-dehidrovinblastina (XLII) por una enzima del tipo peróxidasa.

La incorporación directa de la 3,4-dehidrovinblastina (91) en leurosina y catarina fue alta, y la presentada en la vinblastina fue también muy buena. Después de 50 horas de incubación, una cantidad insignificante fue transformada en vincristina.

La incubación de leurosina marcada produce un 12% de incorporación en la catarina (XLIV), mientras que en un experimento blanco, solo se nota una conversión del 1%. Esto sugiere fuertemente que (XLV) es verdaderamente un producto natural y no un artefacto (92).

Estudios biosintéticos recientes que evalúan la incorporación de loganina, vindolina y catarantina en la vinblastina muestran valores de incorporación de muy baja especificidad (84, 85, 93).

En resumen, las incorporaciones significativas de (XLII) en la vinblastina, leurosina y catarina apoyan fuertemente la teoría de que es en realidad el intermediario clave en la biosíntesis de los alcaloides dimericos del tipo de la vin-

blastina.

La vía hipotética (38) para la biosíntesis de los alcaloides del tipo Iboga, Aspidosperma y Estricnos permanece sin probar ya que las pruebas de la presencia de cualquier alcaloide indólico más allá del tipo Corinante en las células cultivadas todavía no es riguroso (94).

Observaciones recientes muestran (95, 96) que la síntesis de los alcaloides del tipo Aspidosperma e Iboga, los cuales aparecen más tarde en la vía biosintética, pudieron llevarse a cabo después de que la formación de los alcaloides Corinante ha alcanzado el máximo.

Se ha demostrado que los cultivos de tejidos vegetales han sido útiles para estudiar las propiedades y regulación de la vía metabólica del metabolismo secundario (97,98,99). Recientemente se ha podido estimular la biosíntesis del alcaloide indólico ajmalicina en cultivos en suspensión de C. roseus modificando las condiciones del medio de cultivo (20, 100).

La producción de alcaloides en cultivos celulares puede ser considerado como un proceso de diferenciación gobernado por las condiciones ambientales así como por el genotipo del material en cuestión (101). Mientras que las condiciones ambientales que pueden inducir a las células en cultivo a sintetizar y acumular alcaloides han sido bastante bien descritas,

la selección de un genotipo prometedor requiere una continua investigación (102).

Se ha observado (103) que los cultivos de células a partir de diferentes plantas, aún derivados y propagados de la misma manera, muestran diferentes vías enzimáticas, quizás debido a la pérdida o ganancia de actividad de algunas enzimas.

Un estudio de más de 400 callos y cultivos en suspensión (102) de C. roseus detectó que la composición de los alcaloides parecía ser específica para cada línea celular (104).

Este acercamiento de variaciones, potencialmente útiles, en la producción de metabolitos secundarios que están siendo explotados para dar líneas de interés farmacológico.

Se ha encontrado que el contenido de alcaloides es óptimo si el crecimiento es iniciado por un inóculo que se encuentra en la fase logarítmica de crecimiento y con un índice mitótico alto (105). Se ha demostrado (106) que el porcentaje de los alcaloides por gramo de peso seco se incrementa con el tiempo, con una producción óptima a las 3 a 4 semanas. Con respecto a los periodos más tempranos del crecimiento del cultivo se demuestra un incremento más rápido en la biosíntesis de la ajmalicina y la yohimbina (familia Corinante) que la observada para la vindolina (familia Aspidosperma).

También se ha estudiado el efecto de los biorreguladores en la biosíntesis de los alcaloides indólicos en cultivos de C. roseus (107, 108).

Se han realizado experimentos (94) con 1,1-dimetilpiperidina (LV), 2-dietilamino-3,4-diclorofeniléter (LVI), 2-dietilaminoetil-2,4-diclorofeniléter (LVII), 2-dietilaminoetil- β -naftiléter (LVIII) y 2-dietilaminoetil-3,4-dimetilfeniléter (LIX) a una concentración de 5 mg/l en cultivos de células de C. roseus al séptimo día de crecimiento. Entre los 5 compuestos probados el LV, LVII y el LVIII mostraron un incremento del 20% en los alcaloides totales con un incremento concomitante de ajmalicina y de catarantina.

La concentración óptima de (LVII) se encontró entre 2 y 5 mg/l, resultando en un incremento del 22% del total de alcaloides por gramo de peso seco. Se observaron incrementos en el contenido de ajmalicina (de 270 a 575 %) y de catarantina (de 82 a 146%). Concentraciones de 10 mg/l de (LVII) inhiben la síntesis de los alcaloides.

El incremento de los alcaloides indólicos monoterpénicos puede ser el resultado de la inducción de precursores terpenoides como se ha reportado en algunos casos (109). O como en el caso de las aminas terciarias, también pueden actuar como atrapadores de oxígeno, protegiendo la degradación oxidativa de los alcaloides indólicos.

Durante los años recientes el interés por los tejidos de plantas cultivadas como productoras de metabolitos secundarios de valor comercial se ha incrementado considerablemente. Los callos y los cultivos en suspensión pueden ser usados en principio, pero se prefiere el último tipo. La baja productividad de los productos naturales en tales cultivos tisulares, es de cualquier forma, un problema reconocido y se están haciendo varios intentos para manipular el metabolismo total de las células para incrementar el metabolismo total de los productos en cuestión.

Otra metodología ha sido la de la inmovilización de las células, y en general la producción de metabolitos secundarios por estas células fue mayor que la de las células suspendidas libres bajo las mismas condiciones (110, 111). Además, parece que el potencial químico de células de plantas que normalmente crecen en espacio pueden ser más eficientemente explotadas por inmovilización (112).

La inmovilización de células, de plantas y protoplastos (con o sin regeneración de la pared celular) muestra un potencial prometedor para la producción de compuestos naturales ya sea por síntesis de novo, por síntesis a partir de precursores distantes o por simple biotransformación (111).

CAPITULO II

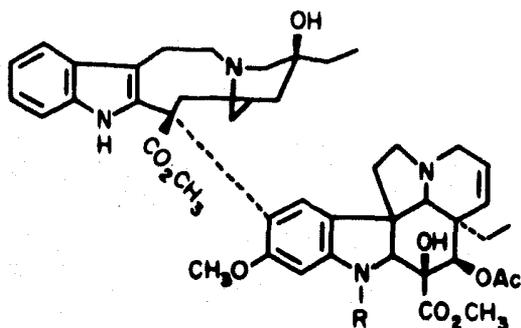
FARMACOLOGIA DE LOS ALCALOIDES DE
CATHARANTHUS ROSEUS DERIVADOS DEL INDOL

Las propiedades medicinales de C. roseus han sido descritas en el folclor desde hace muchos años en varias partes del mundo. La pretendida acción hipoglucémica por vía gástrica motivó en 1949 la investigación de fracciones crudas obtenidas de esta planta. Trabajando con extractos de C. roseus, Noble y colaboradores (1958) (113) y Johnson y sus asociados (1960) (114) no pudieron confirmar la actividad hipoglucémica en los animales de experimentación, sin embargo el primer grupo observó granulocitopenia y depresión de la médula ósea en la rata, efectos que sirvieron para guiar la extracción y purificación de un alcaloide activo, al que se le dió el nombre de vincalucoblastina. Las investigaciones de Johnson y colaboradores (1959) (115) demostraron que ciertas fracciones alcaloidales tenían actividad contra la neoplasia linfocítica aguda del ratón. De estos extractos se aislaron cuatro alcaloides diméricos activos, que se conocen ahora con los siguientes nombres: vinblastina (antes vincalucoblastina, VBL), vincristina (VCR), vinleurosina (VLR) y vinrosidina (VRD). Sólo la VBL y la VCR han recibido extensa investigación clínica.

Los cuatro alcaloides de C. roseus son muy semejantes desde

el punto de vista químico, son compuestos diméricos asimétricos que contienen un núcleo indol y otro dihidroindol.

Las estructuras de la VBL y la VCR difieren sólo en que la segunda contiene un grupo formilo en lugar del metilo unido al nitrógeno del dihidroindol de la molécula.



Vincristina R = CHO

Vinblastina R = CH₃

Las pequeñas diferencias de estructura de estas grandes moléculas de alcaloides producen diferencias notables de toxicidad y espectro antitumoral. Pequeños cambios adicionales en la estructura de los otros dos alcaloides activos causan profundas diferencias en sus espectros antineoplásicos experimentales. Diversos alcaloides diméricos relacionados con la VCR y la VBL carecen de actividad biológica; entre ellos están la neoleurocristina, la neoleurosidina y la catarina, las cuales sólo tienen una diferencia en el valor de pKa, lo que indica un cambio, probablemente con formación de una amida, del nitrógeno básico en la porción de la catarantina de la molécula. La eliminación del grupo acetilo en el C-4 de la VBL

destruye su actividad antileucémica, y lo mismo hace la acetilación de los grupos oxhidrilos. Tanto la hidrogenación del doble enlace como la formación reductora de los carbinolos reducen o destruyen la actividad de estos compuestos.

ACCION FARMACOLOGICA

La acción fundamental de los alcaloides de C. roseus es la antineoplásica citotóxica (116, 117), como se describe a continuación:

1. ACCION CITOTOXICA

a) Acción antineoplásica. En los animales de experimentación (ratas y ratones), la VBL y la VCR poseen una potente acción inhibidora del crecimiento de los tumores transplantados (118), y se observa un sensible aumento de la supervivencia de los animales; así sucede en el carcinoma ascítico de Ehrlich, en diversos tumores leucémicos transplantables, el sarcoma 180, el carcinoma Walker 256 y el linfoma L 1210 (119, 120). In vitro, en cultivos de células de carcinoma faríngeo humano, dichos alcaloides producen una completa inhibición del crecimiento a concentraciones muy pequeñas (121) y a dosis elevadas provocan la muerte celular.

En el hombre, la VBL y la VCR son activas con una marcada disminución (122-124) en los linfomas, leucemia

aguda (sólo la VCR en este caso) y en tumores sólidos, como el carcinoma mamario, el gastrointestinal, el neuroblastoma y el cáncer del pulmón (en este caso sólo la VBL) (124). De todas maneras en los tumores sólidos los efectos son limitados (124).

Como sucede con todos los fármacos antineoplásicos, los alcaloides de C. roseus dan lugar a resistencia, tanto en los animales como en el hombre, con la característica de que no existe resistencia cruzada entre los distintos alcaloides de la planta (122).

- b) Acción hematopoyética. Los estudios clínicos y experimentales han demostrado que el efecto citotóxico más importante en las células normales es la depresión de la médula ósea, manifestada principalmente por leucopenia. En este respecto, la VCR y la VLR no son tan potentes como la VBL; en esta última, éste es el factor que limita la magnitud de la dosis. La toxicidad relativamente baja de la VCR en las células normales, hace de este agente un instrumento extraordinario entre los medicamentos antineoplásicos, y un agente que hay que tomar en cuenta cuando se requiere quimioterapia y está alterado el funcionamiento de la médula ósea.

MECANISMO DE ACCION. Los alcaloides de C. roseus se unen a las proteínas microtubulares necesarias para la división celu-

lar. Estas proteínas forman el aparato del huso, que permite a los cromosomas separarse a uno y a otro extremo de la célula en división. Los alcaloides de C. roseus al parecer disuelven esta proteína y llevan a la muerte a la célula durante la mitosis. La VCR y la VBL actúan en la mitosis (126, 127) en especial en la profase (128).

La actividad antimitótica de varios alcaloides de C. roseus es casi la misma para la VBL, la VCR, la deacetylvinblastina, mientras que para la leurosina es cerca de 100 veces menor. La catarantina es un antimitótico débil, mientras que la vindolina es inactiva (129). Es notable que la interacción de estos derivados con la tubulina es paralela con la actividad antimitótica (130).

Debe notarse que los alcaloides de R. roseus interactúan y pueden precipitar un número de proteínas acídicas y ácidos nucleicos además de la tubulina (131). En particular, los alcaloides de C. roseus interactúan con la actina.

Estudios realizados in vitro sobre células tumorales del carcinoma ascítico de Ehrlich y de la médula ósea y mediante el empleo de isótopos radiactivos han demostrado que la VBL y la VCR tienen la propiedad de inhibir la síntesis del ácido ribonucleico, sobre todo el ARN de transferencia, es decir uno de los responsables inmediatos de la síntesis de las proteínas celulares, por lo que un trastorno de este tipo es capaz de

detener el crecimiento celular y aún producir la muerte de las células (117).

La VBL en los cultivos tisulares parece interferir con las vías metabólicas que parten del ácido glutámico a la urea y con el ciclo del ácido cítrico (132). El triptofano y el ácido glutámico dados antes que la VBL a los ratones con tumor ascítico de Ehrlich causan una reducción en el número de las figuras mitóticas, sugiriendo alguna actividad protectora (133). Vaitkevicius notó una aminoración de la toxicidad de la VBL en pacientes cuando era combinada con glutamina. Sin embargo, la protección fue sólo parcial, y la dosis tolerada de VBL solamente se incrementó cerca del 30%.

USOS TERAPEUTICOS. El uso de la VBL para aplicación general se autorizó en 1961, con recomendación de que se empleara en la enfermedad de Hodgkin y en el coriocarcinoma resistente al metotrezato. Su espectro de acción en diversas neoplasias se encuentra actualmente bajo investigación. Se ha obtenido cierta respuesta en el linfosarcoma, el sarcoma de células reticulares, micosis fungoide, leucemias agudas y crónicas, neuroblastoma y enfermedad de Letterer-Siwe (histiocitosis X) (9), y también en los carcinomas de la mama (142), del pulmón (9), de la cavidad bucal, del testículo y de la vejiga urinaria (134). Es también útil en el tratamiento de algunos neoplasmas malignos inoperables, incluyendo los del pecho (177), bronquios y testículos (135, 136) y en el neuroblastoma

y coriocarcinoma (177),

La eficacia de la VBL no disminuye cuando la enfermedad de Hodgkin es refractaria a los agentes alquilantes. Se ha señalado una notable mejoría en 50 a 90% de los casos.

La VCR tiene un espectro de actividad clínica semejante al de la VBL pero hay algunas diferencias notables. Un aspecto es la falta de resistencia cruzada entre estos agentes, a pesar de la gran semejanza entre sus estructuras químicas. La VCR es eficaz en la enfermedad de Hodgkin y linfomas afines; aunque en la enfermedad de Hodgkin es menos eficaz que la VBL, pero es más útil en el linfosarcoma linfocítico (13, 14). En la leucemia aguda, particularmente en el niño, la VBL rara vez es útil, mientras que la VCR produce un gran número de respuestas.

En algunos casos, por la rapidez de su acción y por su menor tendencia a ejercer una acción mielorrepresora, la VCR es un agente más eficaz para tratar el problema de la pancitopenia. Se usa en el tumor de Wilms, en el neuroblastoma y en los tumores del cerebro, pecho y pulmón en conjunción con otros agentes.

La VBL es un componente de la combinación de 3 fármacos para la elección del tratamiento en el carcinoma testicular. Junto con otros tres fármacos es componente de la combinación que

provee el tratamiento de segunda elección para la enfermedad de Hodgking. También es un fármaco de segunda elección para el tratamiento del coriocarcinoma y del carcinoma celular renal. Esta, como fármaco de tercera elección para el neuroblastoma, tumor de pecho, carcinoma celular de la cabeza y el cuello y en la micosis fungoide. Ha sido también usada en el tratamiento del linfosarcoma, sarcoma celular reticular y en la enfermedad de Letter-Siwe (16).

La VCR es el alcaloide más ampliamente usado de los fármacos antineoplásicas. En combinación con prednisona es el tratamiento preferido para inducir la disminución de la leucemia linfocítica aguda. En combinación con citarabina y prednisona, es una de las tres combinaciones de elección para las leucemias agudas mielogénicas. Es componente del MOPP (meclo-rotamina, VCR, procarbazona y prednisona), que es el tratamiento de primera elección para la enfermedad de Hodgkin y es también un componente de la combinación de segunda elección. Esta incluida en todas las combinaciones de cuatro compuestos para la elección primaria en los linfomas que no pertenecen a la enfermedad de Hodgkin. Es también un componente de una de las dos primeras combinaciones de elección para el carcinoma broncogénico, y con dactinomicina, la combinación de elección en el tratamiento del sarcoma de Ewing, neuroblastoma, y en el rhabdomyosarcoma embrional. La combinación de VCR y doxorubicina es el segundo tratamiento de elección para el carcinoma de pecho (16). Algunas autoridades prefieren usar la

VCR sólo para inducir remisiones y no para mantenimiento, porque su uso crónico favorece la neurotoxicidad.

La VCR induce una disminución completa o parcial en la leucemia linfocítica aguda en 3 ó 4 semanas aproximadamente en la mayoría de los niños en que es usada; con la administración concomitante de corticosteroides la velocidad de respuesta es elevada (137).

La leucemia en el sistema nervioso central no ha sido tratada en forma exitosa con el sulfato de VCR; esto sugiere que el fármaco no entra en el fluido cerebroespinal en concentraciones oncolíticas, por lo que debe ser siempre usada con otros agentes oncolíticos si el proceso leucémico involucra al sistema nervioso central.

La leucemia monocítica es una forma de leucemia que es difícil de tratar y se desarrolla en forma relativamente rápida y termina fatalmente en pocos meses. La VBL ha tenido un pequeño efecto en el tratamiento de esta leucemia (138).

Los linfomas que no pertenecen a la enfermedad de Hodgkin es un grupo heterogéneo de tumores de los nódulos linfáticos que varían en su pronóstico y van desde ser tumores relativamente benignos, de lento crecimiento, hasta tumores agresivos de crecimiento muy rápido (linfoma histiocítico difuso), conocido previamente como sarcoma celular reticular. La sobrevida me-

dia de los pacientes con linfoma histiocítico difuso era de 10 a 12 meses antes de que se usara la combinación quimioterapéutica. Ahora se conocen varias combinaciones efectivas para esta enfermedad, incluyendo a la COPP (ciclofosfamida, VCR, prednisona y procarbazona), a la CHOP (ciclofosfamida, hidroxidaunorubicina, VCR y prednisona) y a la COMLA (ciclofosfamida, VCR, metotrezato, leucovorín y arabinosil citosina) (139). Este programa para el tratamiento ha producido altas velocidades de completa remisión.

El rhabdomyosarcoma que es un tumor de la niñez es rápidamente fatal y tiene una supervivencia de 5 al 10% por 5 años y es sensible a la quimioterapia con actinomicina D, VCR y ciclofosfamida (139).

El tratamiento de pacientes con cáncer de pecho metastásico se ha mejorado desde la introducción de la combinación de la quimioterapia. Las combinaciones que utilizan 5-fluorouracilo, ciclofosfamida, metotrezato, VCR y doxorubicina se han reportado que producen velocidades de respuesta del 50 al 80% en pacientes no tratados previamente (140).

Un estudio reciente demuestra que la combinación de la quimioterapia usando BCNU, mitomicina C, VCR y prednisona (141) tiene una actividad marginal en los pacientes tratados previamente con adenocarcinoma del pecho. Un estudio de Konits (142) indica que hay una mejor respuesta con altas dosis de mitomicina C

en combinación con VCR ó VBL.

Varios estudios clínicos en el cáncer de pecho avanzado han sugerido que la adriamicina en combinación con la VCR pueden producir frecuencias de regresión más altas (52-66%) que la adriamicina sola (40%) (143, 144), pero ésto no ha sido confirmado en ensayos clínicos controlados (145), siendo la respuesta para la adriamicina sola del 57% y de la adriamicina más la VCR del 52%.

La experiencia con la quimioterapia combinada FVH (5-fluorouracilo, VCR e hidroxiaurea), confirma la actividad moderada de la poliquimioterapia en el control del cáncer colorrectal metastásico. Aunque estudios recientes (146) han concluido que el FVH no tiene un impacto principal en el curso natural del cáncer colorrectal avanzado, se obtuvo una respuesta positiva en 43 pacientes de 112, tratados con una combinación de 4 fármacos: 5-fluorouracilo, dacarbazina, VCR y BCNU (FIVB) (147). En un estudio reciente (148) se observó que la sustitución de la mitomicina C por BCNU en la combinación FIVB, presenta una respuesta baja que va del 4% al 32%, lo cual indica que la sustitución de la mitomicina C por BCNU hace menos efectiva la combinación de estos fármacos.

La combinación de PVB (VBL, bleomicina y cis-diclorodamina con platino) en el tratamiento del melanoma metastásico se ha reportado que da una respuesta objetiva del 47% (149). Pero

estudios recientes (150) no comprobaron esta respuesta del 47%. Esto fue probablemente debido a que el melanoma es notoriamente impredecible, aunque tal variación en la respuesta a la quimioterapia ya ha sido reportada (151). Este programa de tratamiento es tóxico y los efectos laterales son profundos. La náusea, vómito, mucositis y alopecia lo convierten en un programa difícil de aceptar por los pacientes. Basados en la falta de respuesta objetiva, la considerable toxicidad y los efectos colaterales serios, esta combinación no se recomienda para el melanoma metastásico.

El tratamiento más efectivo para el cáncer testicular avanzado no seminomatoso metastásico, incorpora la combinación de la VBL, cisplatín y la bleomicina (CDDP), con o sin otros agentes (152-154).

Ya que la toxicidad de la VBL al inducir la mielosupresión, ha permitido la morbilidad de varios pacientes, la prolongación del intervalo del tratamiento con el subsecuente crecimiento del tumor, y aún la muerte, se ha cambiado por la VCR. La VCR como agente solo tiene una actividad antineoplásica mínima en el cáncer testicular no seminomatoso, pero ha demostrado sinergismo clínico en combinación con la bleomicina y el cisplatín (155).

La VBL produce disminución del carcinoma mamario, pero el fármaco debe ser usado sólo después de que la terapia con hormo-

nas, antipirimidina y agentes alquilantes no ha tenido éxito y la cirugía ha fallado, y debe ser usada al menos durante tres meses (137).

El desarrollo de la resistencia a los fármacos es el principal obstáculo al tratamiento acertado de los cánceres hematológicos. Usando las sublíneas linfoblásticas leucémicas de humanos resistentes a la VBL (CEM/VBL) como prototipo para la resistencia a productos naturales (alcaloides de C. roseus, antraciclinas y antibióticos), se identificó una membrana superficial de glucoproteínas con un peso molecular de 180,000 que parece variar en cantidad con el grado de resistencia a la VBL (156). Aunque estudios subsecuentes han sugerido que la parte glucosídica de esta glucoproteína puede ser innecesaria para la expresión de la resistencia (157).

En el pasado, la resistencia a los alcaloides de C. roseus se atribuyó a la disminución en la permeabilidad de la membrana, basándose la mayor parte en resultados de resistencia cruzada en los cuales la asimilación y la citotoxicidad de otros fármacos fueron el único criterio (158-160). Hallazgos más recientes indican que la disminución de la retención del fármaco puede ser la base para esta resistencia (161-165). Una bomba de flujo, que aparentemente puede exportar varias moléculas estructuralmente diferentes (ejemplo: antraciclinas, alcaloides de C. roseus y antibióticos) se piensa que es el mecanismo más rápido para eliminar los fármacos en las células resistentes

(162, 163, 166-169). De cualquier forma, este concepto requiere una investigación posterior en vista de la aparente falta de especificidad molecular de la bomba (170). De hecho se han sugerido otros mecanismo de resistencia hacia los alcaloides. Carlsen (171), por ejemplo, ha propuesto que la resistencia de las células CHO a la colchicina (y la resistencia cruzada de los alcaloides de C. roseus y las antraciclinas) es mediada por una barrera permeable activa, y Bender (172) ha presentado evidencias indicando que la citotoxicidad de la VCR (o su falta) se correlaciona mejor con la cantidad de fármaco unido por las células.

En un estudio reciente se ha ofrecido una explicación alternativa para la resistencia de los alcaloides de C. roseus en el que se indica que la unión de los fármacos es dependiente de la energía, permitiendo la alteración de ésta, una menor retención del fármaco por las células resistentes (173). Trabajos preliminares acerca de esta explicación ya han sido presentados (174). Se mostró que el agotamiento del ATP permite un incremento en la acumulación del fármaco por las células resistentes, pero causa una disminución de la acumulación por las células sensitivas. La adición de glucosa a estas células agotadas causa un rápido incremento en los niveles de ATP, que está asociado con la pérdida de fármaco por la línea resistente, pero causa una asimilación posterior del fármaco por la línea sensible.

Estas observaciones que consideran el metabolismo celular con la acumulación de la VBL, no son incompatibles con el concepto de una bomba de flujo o de una barrera permeable activa, ya que éstas aportan la idea de que la alteración de la unión del fármaco debido a la dependencia de la energía es importante en la resistencia a los alcaloides. Esto fue sugerido por: a) el efecto de la glucosa en las células sensibles; b) la demostración de que parece haber dos compartimientos de unión celular a la VBL (173), uno dependiente y el otro independiente del metabolismo celular; y c) el hecho de que la pérdida del fármaco a partir de las células resistentes parece ser en parte un proceso pasivo que no está asociado con la inhibición o activación de una bomba de flujo.

Se ha concluido (173) que el efecto de la glucosa es inactivar o empeorar el proceso de unión de la VBL en las células resistentes, más bien que estimular una bomba de flujo activo.

De aquí se ha demostrado que el estado metabólico de la célula influencia profundamente la magnitud de la acumulación y retención de la (^3H)-VBL. Los datos de este estudio (173) sugieren que la acumulación de la (^3H)-VBL por las células sensibles y resistentes está gobernada por un mecanismo de unión del fármaco influenciado por la alteración de la energía y relacionado posiblemente con el estado de fosforilación de ciertas proteínas claves. Así, de acuerdo a este modelo, ciertos azúcares, más bien que activar una bomba del fármaco, o una barrera permeable,

pueden alterar la acumulación de los alcaloides a través de un mecanismo de unión sensible a la energía.

ACCION TOXICA. Como ocurre con todos los fármacos citotóxicos, los alcaloides de C. roseus no son fármacos inócuos pues atacan tanto a las células neoplásicas como a las normales. En esta forma, son capaces de producir trastornos gastrointestinales, hemáticos, cutáneos y nerviosos (123, 124, 175).

1. Los efectos neurotóxicos de la VCR a nivel gastrointestinal consisten en anorexia, náuseas, vómitos, cólicos y diarreas. También puede ocurrir estreñimiento, ileo adinámico, anorexia y estomatitis.
2. Los trastornos hemáticos consisten en leucopenia con granulocitopenia y a veces trombocitopenia, presentándose la primera sobre todo con la VBL. Con la VBL la leucopenia suele ocurrir en cuatro a diez días, después hay recuperación en siete a catorce días; con dosis más altas, la cuenta total de leucocitos puede tardar en volver a lo normal 3 semanas. Con la VCR puede ocurrir leucopenia y a veces se ha visto trombocitopenia.
3. Las manifestaciones cutáneas consisten especialmente en la alopecia, que retrocede al cesar el tratamiento. Con la VBL la alopecia ocurre en 30 a 60% de los pacientes, pero generalmente es reversible. Con la VCR la alopecia es

común.

Los efectos tóxicos más comunes de la VBL son los hematológicos y esto tiende a ser la dosis limitante. Ello incluye neutropenia y ocasionalmente trombocitopenia y anemia. Los trombocitos son menos afectados, a menos que otros fármacos trombocitogénicos estén siendo dados o hayan sido suministrados recientemente.

Cuando la médula ósea es infiltrada con células cancerosas, puede ocurrir depresión severa de las plaquetas y de los leucocitos si se usa la VBL.

Con la VCR la leucopenia y los efectos hematológicos ocurren menos comunmente que con la VBL y tiene poco efecto inhibitorio en las plaquetas.

4. Trastornos nerviosos. Aunque puede encontrarse neurotoxicidad con la VBL, particularmente a dosis muy altas, con frecuencia se observan anomalías neuromusculares con la VCR.

Los efectos neurotóxicos de la VBL incluyen: indisposición, neuromiopatía, pérdida de los reflejos profundos del tendón, neuritis periférica, estreñimiento e ileo adinámico, dolor de la glándula parótida y convulsiones. La sobredosis causa toxicidad permanente y algunas veces toxicidad

del sistema nervioso central fatal (176, 177). La neurotoxicidad ocurre en 5 a 20% de los casos, dependiendo de la dosis.

La neuropatía y otras toxicidades neurológicas incluyendo la parálisis del ileo, son más prominentes con la VCR. Esta toxicidad neurológica es la dosis limitante, y en virtud de la falta de actividad mitótica del tejido nervioso, puede deberse a un efecto en el metabolismo de lípidos concerniente con la formación de la capa de mielina (137).

Con dosis muy altas de VCR (75 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ a la semana) se ha observado torpeza, alucinaciones y coma, la manifestación más común de neurotoxicidad de las dosis clínicas comunes es la neuropatía periférica. Con frecuencia se han observado entumecimiento y hormigueo de las extremidades, seguidas de debilidad, pérdida de los reflejos, pie péndulo, ataxia, calambres musculares y dolores neuríticos. Estudios neurofisiológicos en clínica han demostrado que la depresión asintomática del reflejo de Aquiles es el signo más temprano y más consistente de la neurotoxicidad inducida por la VCR (116). También se han observado debilidad muscular de la laringe y de los músculos extrínsecos del ojo. Un efecto en el sistema nervioso autónomo puede ser la causa del estreñimiento intenso e incluso obstructivo que con frecuencia aparece durante la administración pro-

longada de VCR, pero se observa rara vez con la VBL.

ESTUDIOS EN CULTIVO DE TEJIDOS IN VITRO

Las técnicas de cultivo celular han sido ampliamente usadas para ensayar la acción citotóxica de los fármacos antitumorales. Los cultivos de células tumorales de una sola capa han sido los sistemas más usados para los estudios in vitro (178). De todas maneras se han encontrado algunas discrepancias, cuando los efectos de los fármacos han sido estudiados en experimentos paralelos en cultivos de monocapas de las células tumorales o con tumores sólidos in vivo (179). Otro sistema in vitro usado para las pruebas citotóxicas durante los años recientes es el sistema tumoral multicelular esferoidal. Los esferoides son agregados esféricos consistentes de células y de matriz extracelular. Las células periféricas son proliferativas y contribuyen al crecimiento esferoidal. Las células más profundas en los esferoides están principalmente en el estado estacionario debido a la insuficiente nutrición proveniente del medio de cultivo circundante. Si los esferoides son lo suficientemente grandes, se desarrollan regiones necróticas masivas en sus partes centrales. Así, los esferoides imitan al crecimiento de los tumores sólidos de varias maneras.

Se estudiaron dos líneas celulares de tumores humanos, cultivados ambas como monocapas y como esferoides celulares utilizando VBL como agente citotóxico (180).

Las células en los esferoides multicelulares fueron más resistentes que los cultivos celulares en monocapas a los tratamientos de la VBL. El incremento de la resistencia de los esferoides a los tratamientos terapéuticos han sido reportados previamente después de la irradiación (181, 182) y de la exposición a fármacos antitumorales (183, 184). Se han sugerido que el crecimiento tridimensional y el medio ambiente similar al tumor de las células en los esferoides son los responsables de esta resistencia. Los esferoides parecen ser particularmente resistentes a tratamientos pequeños con VBL. Se ha reportado que la VBL tiene una capacidad limitada de penetrar a través de la masa de los esferoides (185). Así, se sugiere que la penetración de las barreras juega un papel principal en la resistencia extra de los esferoides tratados por períodos cortos de tiempo con VBL. Esto indica que debe haber una condición subóptima para la quimioterapia con VBL ya que el nivel de VBL en suero ha sido reportado que disminuye muy rápidamente en la primera fase después de inyectarse en los pacientes (186).

Las células tumorosas ascíticas JB-1(187) y las células Hela (188) son dañadas irreversiblemente y son incapaces de proliferar cuando son tratadas con VCR, mientras que las células tumorosas ascíticas de Ehrlich pueden sobrevivir durante varios días después del tratamiento con VCR y pasan por la fase G_1 para iniciar la síntesis del ADN (189). En las células multinucleadas (MNC) formadas comúnmente en el tumor ascítico

de Ehrlich (189, 190) y en otras líneas celulares tratadas con VCR, la capacidad para la multinucleación puede estar relacionada con la sobrevivencia de las células.

Complejohn (187) encontró que todas las células tumorosas ascíticas JB-1 eran detenidas en la mitosis por la VCR y que sufrían necrosis. El arresto de la metafase en las células ocurrió en la fase S y en la G₂ del ciclo celular al tiempo que eran tratadas con VCR. Lengsfelt (188) siguió el tratamiento de las células HeLa con VCR con un cinematógrafo de lapsos de tiempo y encontró que las células eran detenidas durante la mitosis en las fases S y G₂ y se volvían necróticas, mientras que las células tratadas en la fase temprana S sufrían una sola mitosis anormal para dar un incremento en el número de células hijas estériles. Las células HeLa que están en la fase G₁ al tiempo de ser tratadas con VCR no fueron afectadas por el fármaco y mantuvieron el tiempo del ciclo celular cercano al normal. Estos autores no notaron la formación de MNC en sus sistemas experimentales.

Varios investigadores (189-192) han encontrado que se forma un número significativo de MNC después del tratamiento con VCR. Szentirmay (190) encontró que las células tumorales ascíticas de Ehrlich multinucleadas sobreviven más de 14 días in vivo, y Klein (189) notó que las células tumorales ascíticas de Ehrlich multinucleadas marcadas con timidina tritiada pasaron por la fase G₁ para iniciar la síntesis del ADN.

Klein (193) argumentó que los datos demostraron que las células que son afectadas por la VCR sobreviven y contribuyen al recrecimiento del tumor, pero no proveyó evidencias de la capacidad proliferativa de sus MNC.

Las células multinucleadas RTC-9 también sobrevivieron por un largo periodo in vitro después del tratamiento con VCR y continuaron a través del ciclo celular en una forma casi normal por lo menos durante 96 horas (más de cuatro ciclos celulares), pero sin embargo no se encontraron evidencias para la citocinesis o proliferación continua de estas células anormales. Más aún, la citocinesis es un evento raro en estas MNC ó tal vez estas células han perdido el potencial para la proliferación continua (194). La evidencia de la microscopía electrónica indica que los microtubulos permanecen intactos después del tratamiento con el fármaco, lo que sugiere que la VCR puede ejercer un efecto más sutil en la organización subcelular y en la función.

DOSIS. El sulfato de Vβ1 es dado por inyección intravenosa en una solución que contiene 1 mg/ml en agua para inyectar o en solución inyectable de cloruro de sodio. El esquema de la dosis sugerida es el siguiente: inyecciones semanales empezando con 100 µg/Kg de peso corporal aumentándola con incrementos de 50 µg/Kg a una dosis semanal máxima de 500 µg/Kg o hasta que la cuenta de células blancas haya caído a 4000 por mm³. En algunos casos ésto puede tomar 12 semanas. No se excede

en más de 150 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en una sola dosis en pacientes previamente tratados con otros agentes antineoplásicos o con radioterapia. Entonces se da una dosis de mantenimiento cada 7 a 14 días y es el máximo que el paciente puede tolerar sin que ocurra una leucopenia seria; dosis semanales de 150 a 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ son adecuadas. La dosis intravenosa semanal en niños es de 100 a 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ o de 3 a 6 mg/m^2 de superficie corporal (177).

Debe hacerse una cuenta de células blancas antes de cada inyección y la repetición de una dosis nunca debe ser dada a menos que la cuenta haya alcanzado los 4000 glóbulos blancos por mm^3 . Generalmente los pacientes mayores requieren dosis muy pequeñas y los niños leucémicos toleran dosis mayores.

El sulfato de VBL ha sido dado por infusión continua intraarterial y por inyección en las cavidades del cuerpo.

La dosis de la VCR para niños es de 2 mg/m^2 de superficie corporal o de 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso, aumentándola con incrementos semanales de 25 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ hasta un máximo de 150 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. A los adultos se les puede dar 1.4 mg/m^2 ó de 25 a 75 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ semanalmente. Para otras enfermedades se puede dar 25 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ semanalmente y reducirse de 5 a 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para mantenimiento.

Las dosis altas de VCR parecen ser toleradas mejor por los niños leucémicos que por los adultos, en los cuales causan

signos neurológicos graves. La administración del medicamento a intervalos menores de 7 días o a dosis más altas aumenta las manifestaciones tóxicas aunque mejore proporcionalmente la respuesta.

OTRAS ACCIONES FARMACOLOGICAS DE LA VBL Y DE LA VCR

Los alcaloides de C. roseus tienen algunos atributos notables en el tratamiento de la púrpura trombocitopénica idiopática (195, 196). Estimulan la trombocitopoyesis y suprimen la inmunidad humoral y celular. Más de la mitad de los pacientes con enfermedad refractaria mejoran con una terapia intravenosa convencional de estos alcaloides (197). La respuesta ocurre generalmente en una semana, mucho más pronto que con ciclofosfamida o que con azatioprina.

El uso de la VCR y de la VBl como agentes inmunosupresantes está basado en el hecho de que estos compuestos inhiben la proliferación celular de las células formadoras de anticuerpos. Generalmente los animales que reciben VBl muestran una disminución en la celularidad total y en las HPFC (células formadoras de placas de hemólisis) del bazo (198).

La concentración total del colesterol en plasma disminuye consistentemente en todos los animales durante varios días después de la administración de estos fármacos, mientras que la concentración de las lipoproteínas-colesterol de alta densidad no son afectadas por el tratamiento con el fármaco (199).

La extensión de la disminución varía en cada animal, pero es en promedio del 10 al 31% por el día 3 con una sola inyección de sulfato de VCR o sulfato de VBL.

Hay en cambio un pequeño pero consistente aumento en la concentración del triacilglicerol en plasma como resultado del tratamiento con estos fármacos. Este incremento mostró un curso de tiempo similar a la disminución del colesterol en plasma. Por los días 7 a 10 después de la inyección, la concentración en plasma del colesterol y del triacilglicerol regresó a los niveles normales.

El mecanismo más aceptado para la disminución del colesterol en plasma, es la interferencia en la secreción de las lipoproteínas a partir del hígado, secundario al desbaratamiento de los microtúbulos por los alcaloides. Se piensa que los microtúbulos juegan un papel en la translocación de las lipoproteínas a partir del punto de su síntesis final, por la vía de las vesículas secretorias derivadas del complejo de Golgi a la membrana citoplásmica de las células parenquimales del hígado. Como resultado de la inhibición de este mecanismo, podría esperarse que resultara en la retención de las partículas de lipoproteína dentro de los hepatócitos.

Puede haber un efecto múltiple de los alcaloides en el metabolismo de las lipoproteínas, siendo el mecanismo de la disminución del nivel de colesterol en plasma diferente del que es

responsable del incremento de los triacilgliceroles.

La VBL ha probado ser un poderoso inductor de la autofagocitosis (200), aunque el mecanismo por el cual la VBL induce la autofagocitosis no es muy claro.

La inyección de la VBL a los animales de prueba es seguido por una pérdida del glucógeno del hígado y una elevación de la glucosa después de una hora. El incremento de la degradación del glucógeno debido a la activación de la glucógeno fosforilasa parece ser improbable, ya que esta enzima es activada por niveles elevados de AMPc en el hígado y la VBL no eleva su concentración.

La VBL inhibe la actividad de la adenilato ciclasa lo cual puede explicar que no haya cambio en la concentración del AMPc después de la inyección de la VBL y también hay la posibilidad de que inhibe la actividad de la AMPc-fosfodiesterasa, lo cual puede permitir por otra parte el incremento de la concentración del AMPc en la pituitaria (201).

Estudios recientes indican que el incremento de la degradación del glucógeno después de la inyección de la VBL puede ocurrir en el sistema lisosomal por medio de un incremento de la autofagocitosis (202).

La VBL y los alcaloides relacionados tienen varias acciones

en las neuronas adrenérgicas, incluyendo el rompimiento del sistema microtubular, el bloqueo del transporte axonal de enzimas y un efecto neurotóxico similar a la 6-hidroxidopamina en las terminaciones nerviosas (203). Se ha reportado previamente que la VBL reduce la actividad de la dopamina- β -hidroxilasa (DBH), que es la enzima final en la vía biosintética de la norepinefrina, en los ganglios cervicales superiores y en el corazón (204). En estudios recientes (205) se ha observado que la DBH disminuye progresivamente en un tiempo similar al del corazón. La magnitud de la disminución de la DBH en plasma después de dar VBL es similar a la observada después de la administración intravenosa de 6-hidroxidopamina, la cual también destruye las terminaciones nerviosas adrenérgicas.

Se ha observado que la VCR pero no la VBL puede inhibir la proliferación de la lesión inducida en sistema nervioso central, ya que reduce la incorporación de (^3H)-timidina en el ADN de la corteza lesionada (206).

La VCR es tomada con más avidéz en el tejido nervioso citático y se une a la tubulina con mayor afinidad, a pesar de su coeficiente de partición levemente más bajo que el de la VBL (206).

FARMACOCINETICA DE LA VBL Y DE LA VCR

Hasta hace poco la investigación farmacocinética de la VBL y

de la VCR había sido severamente limitada por la falta de técnicas analíticas suficientemente sensibles. Usando la VBL y la VCR marcadas con titrio (207, 208) y después con una marca más estable en el anillo aromático de la VBL Owellen y Karke (209) obtuvieron los datos de eliminación del fármaco y de distribución en los tejidos.

La inyección de (^3H)-VBL a dos pacientes con cánceres progresivos muestra una fase rápida inicial con un tiempo de vida media de 4.78 minutos y 4.25 minutos. El volumen del compartimiento central fue de 29.7 y 39.4 litros. Para la segunda fase el tiempo de vida media fue de 185 y 195 minutos, mientras que el volumen de distribución total fue de 86.4 y 111.4 litros. La constante de eliminación fue calculada en 343 y 414 ml/min respectivamente.

En este estudio se ha estimado que se elimina del 4.5 al 6.5% en las primeras 8 horas de la dosis original en la orina, de fármaco no metabolizado, 8.4% en las primeras 24 horas y 9.1% a las 48 horas.

En las heces se detectó de un 5.3 a un 9.5% de radiactividad en el primer día y a las 72 horas apareció de un 25 a un 41%. Después de este tiempo se eliminó muy poca actividad. En contraste con la orina se encuentra aquí muy poco fármaco sin metabolizar; 0.6% de la dosis total a las 24 horas y 0.6 a 0.7% a las 48 horas. En este estudio se reportó que la farma-

cocinética de la VBL se comportaba como un sistema de dos fases.

Reconociendo el problema asociado con la administración de fármacos marcados radiactivamente a los humanos, Root (210) desarrolló una medida de la concentración de VBL y de VCR haciendo uso del radioinmunoensayo. Varios laboratorios han reportado subsecuentemente técnicas de radioinmunoensayo más rápidas o sensibles para estudiar la farmacodinámica de estos importantes fármacos oncolíticos (211-214).

El análisis de la VBL por radioinmunoensayo permitió extender la observación inicial con el fármaco marcado con tritio y demostrar que en lugar de un sistema de dos fases hay un sistema de 3 fases, el cual se explica como un modelo abierto de tres compartimiento, figura 15.

Con la (^3H)-VBL no se puede medir la fase γ debido al bajo nivel de radiactividad en la sangre después de 40 horas.

Cuando se corrieron simultáneamente las curvas estándar de radioinmunoensayo usando VBL, VCR, DVBL o vindosina, todas fueron coincidentes, lo que demuestra reactividad cruzada idéntica.

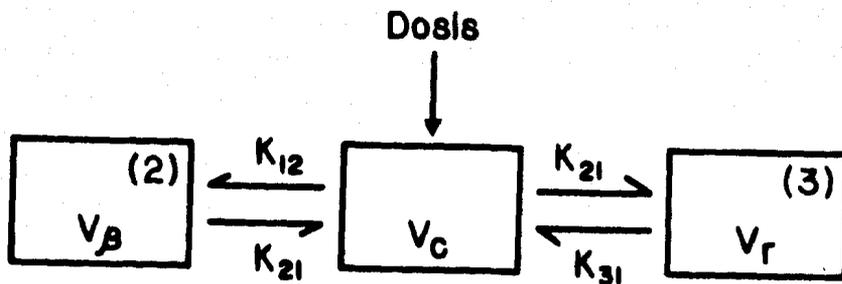


Figura 15. Modelo abierto de tres compartimientos usado para calcular los parámetros farmacocinéticos.

La cantidad total de fármaco marcado con tritio en el anillo aromático de la VBL que es excretada en la orina y en las heces es diferente de los resultados obtenidos con 4-acetil-(³H)-VBL, pero el patrón de tiempo de excreción es similar. Con 4-acetil-(³H)-VBL es de 18.7 a 23.3% de la dosis radiactiva total excretada en la orina en 72 horas, pero sólo el 13.6% del fármaco marcado en el anillo aromático apareció en este intervalo de tiempo. Una mayor diferencia ocurrió en la excreción de la marca radiactiva en las heces, donde con el 4-acetil-(³H)-VBL fue del 25 al 41% de radiactividad total aparecida en 72 horas, mientras que sólo apareció 9.9% de VBL marcada en el anillo aromático en este intervalo de tiempo.

Usando el radioinmunoensayo para los alcaloides de C. roseus se han podido medir los niveles en suero, en tiempos más prolongados que con el fármaco marcado con tritio, y se encontró

(186) que se comportan como un modelo abierto de 3 compartimientos, figura 15, muy similar al que se ha encontrado para el compuesto relacionado vindesina (215, 216). La primera fase indica un volumen grande del compartimiento central (V_c), el cual es 3 a 4 veces el volumen de la sangre y es cercano al volumen extracelular. En contraste con la vindosina y la VCR en las cuales el volumen central es igual al volumen sanguíneo. La fase β y γ son casi idénticas a la de la vindesina. Este modelo de 3 compartimientos nos dice que hay considerable cantidad de fármaco en el cuerpo después de 24 horas y que su eliminación es bastante lenta.

Las diferencias en excreción de la marca radiactiva, en la orina y en las heces, a partir de los datos anteriores (209, 217) son más compatibles con el metabolismo del 4-acetil-(3H)-VBL a DVBL y a ácido acético-(3H). El ácido acético es excretado como varios derivados acetilados o como productos metabólicos posteriores, mientras que el anillo aromático marcado de la VBL usado en este estudio (214) no altera su marca después de la formación de la DVBL. No se encontró evidencia de la formación de glucorónidos o sulfatos. Ya que no se encontró actividad citotóxica remanente en las muestras de orina y heces después de la extracción básica, se asume que los únicos compuestos con actividad biológica son la VBL y la DVBL.

En un estudio farmacocinético la VCR sólo se estudió durante las primeras 4 horas, y se comportó como un sistema de dos

compartimientos (216), con valores de tiempo de vida media ($T_{1/2}$) para $\alpha=3.37 \pm 0.72$ minutos y para $\beta=155 \pm 18$ minutos y volúmenes de $V_{\alpha}=4.53 \pm 0.49$ litros y de $V_{\beta}=57.5 \pm 21.1$ litros.

Recientemente, la estimación inicial de los parámetros farmacocinéticos obtenidos con el programa modificado CSTRIP (218) para la VCR indica que un modelo abierto de 3 compartimientos se ajusta mejor a estos datos, que el modelo abierto de dos compartimientos, propuesto por Akaike y Owellen (216, 219).

Las constantes de velocidad de primer orden de las 3 fases de decaimiento α , β y γ fueron: 0.369 ± 0.235 , 0.036 ± 0.032 y $7.5 \pm 4.2 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ respectivamente. La vida media biológica de la VCR en el suero en la fase γ fue de 22.6 ± 16.7 horas. El volumen del compartimiento central V_c después de estandarizarse a 1.73 m^2 de área de superficie corporal fue de 4.09 ± 3.46 litros/ 1.73 m^2 y el volumen aparente de distribución en el estado constante (V_{dss}) fue de $141.9 \pm 86.9 \text{ ml/min/1.73 m}^2$.

En forma similar a investigaciones previas, un estudio de 14 pacientes tratados con un amplio rango de dosis de VCR (220) (0.45 a 1.73 mg/m^2) es consistente con una rápida eliminación de la VCR a partir de la sangre (221-223) lo cual se ajusta mejor a un modelo de decaimiento triexponencial de primer orden (221-223). La comparación de la vida media de la VCR en la sangre, observada en éste y en estudios previos indica una fase similar de decaimiento temprana, pero muestran una amplia

discrepancia en la vida media biológica de la fase γ . La vida media corta de $\gamma=164$ minutos, reportada por Bender (221) en 4 pacientes, puede ser debida a un periodo corto de toma de muestras de 3.5 horas después de la inyección de la VCR triada. Por otro lado Nelson (222, 223) reportó una vida media terminal muy larga en 2 pacientes (133 y 155 horas). Estos autores también reportaron dos pacientes con $\gamma T_{1/2}$ de 19.2 y 32.9 horas, lo cual se encuentra en el mismo rango que el observado en estudios más recientes (220). La razón de la discrepancia no es clara.

Para un decaimiento triexponencial de un fármaco con una sola inyección, hay varios modelos posibles de un sistema abierto de 3 compartimientos (224). En un modelo abierto de 3 compartimientos en donde el fármaco es inyectado en el compartimiento central 1 y la eliminación se lleva a cabo a partir de este mismo compartimiento, las constantes de velocidad microscópicas para 14 pacientes son obtenidas por análisis de los datos con un modelo CSTRIP (218) y NONLIN (225) como sigue: $K_{10} = 0.062 \pm 0.052 \text{ min}^{-1}$; $K_{12} = 0.110 \pm 0.046 \text{ min}^{-1}$; $K_{21} = 0.040 \pm 0.014 \text{ min}^{-1}$; $K_{13} = 0.160 \pm 0.170 \text{ min}^{-1}$ y $K_{31} = 2.84 \pm 1.16 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$. Estos resultados indican que la distribución de la VCR a partir del compartimiento central hacia los compartimientos 2 y 3 ocurre casi a la misma velocidad. La distribución del fármaco del compartimiento 2 al compartimiento 1 se lleva a cabo a una velocidad 14.3 veces mayor que la distribución del compartimiento 3 al 1. La última constante de velocidad, K_{31} , debido

a su valor más ligero parece ser el paso limitante de la velocidad en este modelo. Estas constantes de velocidad microscópicas son útiles para la simulación de la dosis del fármaco pero tienen un significado fisiológico limitado.

Basados en las diferencias apreciables de los parámetros farmacocinéticos de la VCR, la VBL y de la vindesina, principalmente de la eliminación del plasma que es de 123, 863 y 294 ml/min/70 Kg respectivamente, Nelson (223) intentó correlacionar estas diferencias con las propiedades farmacológicas de estos fármacos. La neurotoxicidad de la VCR ha sido explicada en base a su baja eliminación.

Un gran volumen V_{dss} , un prolongado tiempo de vida media γ , y una constante de velocidad baja del compartimiento 3 al compartimiento central, k_{31} , sugiere una ávida unión de la VCR al tejido y un desprendimiento lento del fármaco a partir de los tejidos lo cual puede estar relacionado con el desarrollo de la neurotoxicidad.

Similarmente la VBL se une ávida y preferentemente en el tejido extravascular del cuerpo (209, 226, 227). Estos datos considerados con otros estudios del plasma (228), demuestran que, aunque la VBL se une a los componentes de la sangre, esta unión no previene la rápida distribución en los otros órganos del cuerpo.

La unión de la VBL y de la VCR en el suero total se incrementa linealmente con el aumento de la concentración de los dos fármacos y con el aumento de la concentración de las proteínas. Se ha observado que los fármacos se unen primariamente a la globulina α y β (209, 228). De todas maneras, esta asociación no es lo suficientemente fuerte para impedir la rápida distribución en otros compartimientos del cuerpo (228).

La actividad específica de la fracción de las plaquetas con la VBL, es mucho más alta que para otras fracciones de la sangre, pero a pesar de que hay unión significativa de la VBL en las plaquetas no se ha evidenciado interferencia del fármaco con la función de las plaquetas.

La unión de la VBL en la fracción de leucocitos es consistente con los datos in vitro de Creasey (229) y se ha sugerido que la VBL se localiza en los elementos celulares debido a su unión con la tubulina en la célula.

En un estudio con un paciente, la distribución de la (^3H)-VBL en la sangre, fue como sigue: en las plaquetas 34.2%, globulos blancos 13.2%, globulos rojos 18.0% y en el plasma 5% (209). No se conocen datos similares para la VCR.

Después de inyectar la VBL marcada se retiene una gran cantidad de radiactividad en el cuerpo, y se retiene cerca del 73% al final del día 6. A partir de los datos de radioinmunoen-

sayo (186), se propone que el fármaco remanente se une firmemente a varios tejidos, como se ha demostrado en la rata (217), y se evidencia por el excesivo volumen final de distribución. Así, este fármaco está restringido a la difusión a partir del compartimiento extracelular, ya sea debido a unión específica o quizás debido a una conversión metabólica que da una forma menos capaz de atravesar la barrera de la membrana celular.

Debido a la persistencia del fármaco en la sangre, aunque a niveles bajos, la VBL se redistribuye lentamente en varios tejidos y pasa lenta pero constantemente a través de la membrana neural resistente (barrera cerebral sangüfnea) a los nervios periféricos y al sistema nervioso central.

El metabolismo de la VBL produce la DVBL, la cual es activa biológicamente in vivo e in vitro, con actividad citotóxica igual o mayor que la de la VBL (230). Se ha encontrado que la dosis letal 50 es menor para la DVBL que para la VBL (231). En base a estos datos, se considera que la DVBL es un producto metabólico activo. A partir de estudios en animales (226), es más probable que la VBL sea convertida a DVBL primariamente en el hígado; aunque, si hay también un metabolismo intracelular de VBL a DVBL, aún se desconoce.

Se ha reportado recientemente, con el uso de alcaloides radiactivos, que la excreción biliar es la ruta principal de la eliminación de la VCR en los humanos (232, 233), aunque los

factores responsables para la excreción preferencial de la VBL en la orina y de la VCR en las heces, aún no es conocida (216, 232). El metabolismo de estos alcaloides, en los cuales hay una información limitada (226, 234-237), puede ser uno de los factores.

FARMACOLOGIA DE OTROS ALCALOIDES DE C. ROSEUS

La ajmalicina ha sido usada para el tratamiento de los desórdenes circulatorios y la 10-metoxiajmalicina exhibe una acción hipotensiva y vasodilatadora.

La yohimbina y sus derivados exhiben actividad farmacológica, aunque las propiedades afrodisiacas que se les atribuye tienen que ser verificadas todavía.

Se ha sugerido un complejo de oro-isoquinolina-yohimbina para el tratamiento de la enfermedad reumática. Los derivados de la yohimbina también exhiben actividad hipotensiva y cardioestimulante.

La ajmalina ha atraído la atención recientemente debido a sus efectos de dilatación coronaria y antiarrítmica. Un número de derivados de la ajmalina han sido comparados en su efectividad y toxicidad, y se encontraron ser más potentes que el compuesto principal.

La neoajmalina por otro lado es un estimulante del sistema

nervioso central, un vasodilatador y un estimulante uterino. También baja la presión sanguínea y en dosis elevadas causa la muerte debido a paro respiratorio.

La isoajmalina después de una estimulación inicial del sistema nervioso central causa depresión y muerte debido a que produce la baja de la presión sanguínea, pero en contraste con la neoajmalicina, es un relajante uterino.

Varios alcaloides Iboga son estimulantes del sistema nervioso central, como lo evidencia su antagonismo al cataléptico reserpina. Además, varios de estos compuestos causan hipotensión y bradicardia, y la ibogalina fue la más activa de estos alcaloides. La coronaridina tiene actividad diurética y citotóxica y la catarantina tiene actividad hipoglucémica.

Los derivados de la 10-metoxibogamina (ibogaina) exhiben actividad analgésica y antiinflamatoria.

Recientemente se aisló un un alcaloide no reportado a partir de C. roseus, cuya estructura fue insinuada por Wenkert (237). Este alcaloide al cual se le dió el nombre de roseadina (238), exhibe actividad en la leucemia linfocítica P-388. La roseamina, aislada más tarde, también mostró actividad en este sistema, y la evidencia preliminar espectral indicó que es un isómero espectral de la VBL (238).

CAPITULO III

CONCLUSIONES

La importancia de los alcaloides derivados del indol deriva de su gran abundancia en las plantas, teniendo algunas de ellas un gran número de estos alcaloides, como es el caso de C. roseus en la cual se han encontrado hasta la fecha más de 130 alcaloides de este tipo.

Esta planta es una de las más estudiadas desde 1960 debido a la obtención de VBL y VCR, las cuales han mostrado tener un gran efecto en los tumores neoplásicos de varios tipos.

A pesar de ser bastante estudiados éstos alcaloides, varios de los intermediarios han sido elucidados hasta fechas muy recientes y varias de las enzimas de su biosíntesis aún no se han descubierto. Debido a ésto se ha realizado el presente trabajo monográfico el cual aporta los estudios biosintéticos de los intermediarios y de las enzimas realizados hasta nuestros días.

Debido a que los alcaloides VBL y VCR se presentan en la planta en muy pequeñas proporciones (0.00025%), se requiere de grandes cantidades de ella para una producción comercial del medicamento, por lo que el enfoque principal de los estudios biosintéticos en los cultivos de tejidos de C. roseus es el de

inducir la producción de estos alcaloides para hacer en un momento dado rentable la comercialización de estos medicamentos.

Hasta la fecha ésto no se ha logrado en ningun laboratorio aunque se han obtenido pasos conducentes a este fin. Debido a ésto, el estudio biosintético de los alcaloides de C. roseus es de suma importancia para conocer los intermediarios clave en la vfa y las enzimas que actúan sobre éstos para llegar a dar la formación de los alcaloides diméricos VBL y VCR, ya que sólo conociendo a éstos y a las enzimas que regulan la vfa se podrán realizar estudios tendientes a manipularlos para inducir la producción subsecuente de los siguientes intermediarios hasta llegar a la formación de la molécula dímica.

En este trabajo se presentan los intermediarios elucidados hasta ahora, así como las enzimas que se conocen atúan en la vfa, aunque algunas de ellas aún no se han descubierto y no se conoce en un momento dado el papel regulador que pueden tener en la vfa.

Al contrario de la biosíntesis de los alcaloides de C. roseus, la farmacología es mucho más conocida, ya que se conoce desde principios de 1960 los principales efectos antineoplásicos que poseen estas substancias, por lo cual se aprobó su uso como medicamento antineoplásico.

Se ha encontrado que estas dos drogas son muy útiles en el

tratamiento de varios neoplasmas en los cuales producen una marcada disminución del tumor, como es el caso de la VCR que actúa principalmente en las leucemias agudas y la VBL en varios tumores sólidos, dando una mejoría muy notable en pocas semanas. El estudio actual de estos medicamentos es usándose en forma combinada con otros fármacos antineoplásicos para aumentar la efectividad de la quimioterapia y a la vez disminuir la toxicidad producida por estos medicamentos que en un momento dado puede ser bastante indeseable para el paciente.

Una de las principales limitantes en el estudio farmacocinético de estos fármacos había sido la falta de técnicas lo suficientemente sensibles para detectar cantidades muy pequeñas en la sangre de estos alcaloides, ya que éstos después de aplicarse desaparecen rápidamente de la circulación sanguínea. Así hasta que se introdujo la técnica de radioinmunoensayo para la detección de estos alcaloides no se pudo realizar su estudio farmacocinético, lo cual fue realizado en fecha muy reciente.

Esto permitió conocer algunas de las causas de la acción de estos alcaloides ya que se encontró que después de aplicarse en sangre rápidamente se elimina de ésta y se fija en los tejidos extravasculares, de los cuales se elimina después de bastante tiempo, lo cual permite que presenten efectos tóxicos muy marcados en varios tejidos como es el caso del tejido muscular, de la médula ósea y del sistema nervioso central.

Este estudio nos permite concluir que aún falta mucho trabajo que realizar en lo que se refiere a la biosíntesis de estos alcaloides ya que aún permanecen varias incógnitas tales como cuáles son los pasos reguladores para la producción de los alcaloides diméricos, incluyendo la elucidación completa de las enzimas que aún no se han purificado y que se encuentran catalizando la vfa, así como los activadores o inhibidores que favorecen su acción. También no se conoce nada sobre su compartimentalización, efecto de precursores director y de factores ambientales. De igual manera no se conoce como son reguladas las vías que aportan esqueletos carbonados a la biosíntesis de los alcaloides, en este caso como están interrelacionadas la vía del ácido shikímico, la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos, la biosíntesis del AIA y la biosíntesis de los alcaloides indólicos.

En lo que se refiere a la farmacología de estos alcaloides, su acción se conoce bastante bien, así como sus efectos secundarios, aunque aún es necesario determinar como pueden eliminarse los efectos colaterales, y ésto solo será posible obteniendo preparaciones más puras por un lado y compuestos modificados a partir de los naturales.

Finalmente, queda también de manifiesto la necesidad de incrementar la producción de estos fármacos. Las alternativas más viables son; la propagación in vitro de plantas con alto contenido de VCR y VBL; el uso de cultivos de tejidos vegetales

in vitro para la obtención de estos compuestos o la manipulación de la regulación con su proceso de biosíntesis.

Habiendo obtenido estos objetivos es necesaria la creación de una planta productiva nacional para estos dos fármacos, con objeto de disminuir su costo para el uso común en los pacientes con cáncer, ya que su costo actual es elevado, costando actualmente una solución inyectable de VCR de 1 mg. de concentración \$3,000.00 pesos, y si tomamos en consideración que un paciente de 70 kg necesita 3.5 mg. para una sola aplicación y de que se deben realizar aplicaciones semanales, con un tiempo de mantenimiento más o menos largo, su tratamiento se eleva en forma considerable hasta alrededor de \$70,000.00 pesos por paciente, lo que daría un mercado potencial de por lo menos 1,500 millones de pesos.

Logrando un incremento en la producción de estos dos fármacos concomitante con una mejor purificación se puede obtener un beneficio redituable al país, evitándose la importación de estos dos fármacos y exportándose a la vez a otros países con un precio más competitivo. Pero antes hay que remarcar que para poder poner en marcha una planta piloto de producción hay que obtener en el laboratorio un incremento sustancial de estos compuestos que haga más redituable esta producción, siendo éste el objetivo que se persigue actualmente en el laboratorio.

Apendice. En este momento la compañía Eli Lilly no tiene en

venta VBL (Velban), y como ésta es la única compañía que lo produce no se encuentra actualmente en el mercado, por lo cual no se conoce su valor comercial.

BIBLIOGRAFIA

1. Manual de Métodos y Procedimientos para los Programas de Control de Cáncer, ISSSTE, IMSS, pp. 5-11, 1976, México, D.F.
2. Memorias del Curso Teórico Denominado Oncología Ginecológica para el Médico General. Asociación Mexicana de Ginecología y Obstetricia, 21 al 25 de abril de 1980, pp. 1-18.
3. Secretaría de Salubridad y Asistencia; Dirección de Bioestadística. Estadísticas Vitales de los Estados Unidos Mexicanos. 1974 (Publicada en 1976); 1973 (Publicada en 1975); 1972 (Publicada en 1974); 1971 (publicada en 1973); 1970 (publicada en 1972).
4. Olper P. R., Valdespino G. J. L., García Sañz M., Finkelman J.M., y Aguilar M. M. Registro de Neoplasias en el Instituto Mexicano del Seguro Social. Comunicación Preliminar. Revista Médica del IMSS, vol. 16; pp. 39-48, 1977.
5. P. R. Olper, M. García Sañz, R. Garza Garza, B.L. Benítez. Principales Neoplasias Malignas en el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional, IMSS. Patología, vol. 17, p. 168, 1979.
6. K.S. Carter, Eli Glatstein and R.B. Livingston. Principles of Cancer Treatment. Ed. Mc Graw-Hill Book Company, pp. 3-10, 1982.
7. N. Neuss, I.S. Johnson, J. Armstrong, C.J. Johnson. The Vinca Alkaloids (Antitumor Agents). Advance Chem., 1, 133-174, 1964.
8. G.H. Svoboda, I.S. Johnson, M. Gorman and N. Neuss. Current Status of Research on the Alkaloids of Vinca Rosea Linn. (Catharanthus roseus G. Don). Journal of Pharmaceutical Sciences, 51, 707-720, (1962).
9. J.S. Goodman y A. Gilman. Bases Farmacológicas de la Terapéutica, cuarta Edición, Ed. Interamericana, pp. 1144-11-47, 1974.
10. W. Modell, H.O. Schild and A. Wilson. Applied Pharmacology, American Edition. Ed. W.B. Saunders Company, pp. 685, 1976.
11. AMA Drug Evaluations, Fourth Edition, pp. 1186-1188, 1980.

12. W. Modell. *Drugs of Choice*. Ed. The C.V. Mosby Company, pp. 509-523, 1974-1975.
13. J.R. DiPalma. *Drill's Pharmacology in Medicine*. 4th edition, Ed. Mc Graw-Hill Book Company, pp. 1611-1612, 1979.
14. F.H. Meyers, E. Jawetz y A. Goldfien. *Farmacología Clínica*. Quinta Edición. Ed. El Manual Moderno, S.A., p. 480, 1982.
15. A. Goth. *Farmacología Médica*, Octava Edición. Ed. Interamericana, pp. 548-549, 1977.
16. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th Edition. Ed. Mack Publishing Company, pp. 408, 1096, 1980.
17. J. Waizel Bucal. *Cultivo, aislamiento y variación de principios activos de tres especies de plantas, con propiedades anticancerígenas*. México, D.F., 1979, C.C.H UNAM
18. G.A. Condell. *Introduction to Alkaloids, a Biogenetic approach*. John Wiley & Sons, New York. pp, 574-829, 1981.
19. A.I. Scott and S.L. Lee. *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 6906-6908, 1975.
20. K.H. Knobloch, B. Hansen and J. Berlin. *Medium-induced formation of indole alkaloids and concomitant changes of interrelated enzyme activities in cell suspension cultures of Catharanthus roseus*. *A. Naturforsch*, 36 c, 40-43, 1981
21. M.H. Zenk, H. El-Shagi, H. Arens, J. Stockigt, E.W. Weiler and B. Deus. *Plant Tissue culture and its biotechnological applications*, (W. Barz, E. Reinhard and M. H. Zenk, eds.), p. 27, Springer-Verlag, Berlin.
22. G.Döller. *Production of natural compounds by cell culture methods*, (A.W. Alfermann and E. Reinhard, eds.), 109, *Gesellschaft für Strahlen-und Umweltforschung m.b.H.*, München, 1978.
23. R.B. Woodward, *Nature*, 162, 155, 1962.
24. E. Wenkert and N.V. Bringi. *J. Amer. Chem. Soc.*, 81, 1474, 1959.
25. E. Leete. *J. Amer. Chem. Soc.*, 84, 1068, 1962.
26. R. Thomas. *Tetrahedron Letters*. 544, 1961.
27. E. Wenkert. *J. Amer. Chem. Soc.*, 84, 98, 1962.
28. D. Gröger, K. Stolle and K. Mothes. *Z. Naturforsch.* 21b,

- 206, (1966); Arch. Pharm. 330, 393, 1967.
29. E. Leete, A. Ahmad and I. Kompis. J. Amer. Chem. Soc., 87, 4169, 1965.
 30. A. R. Battersby. Pure and Appl. Chem., 14, 447, 1967.
 31. D.H.R. Barton, G.W. Kirby, R.H. Prager and E.M. Wilson. J. Chem. Soc., 3991, 1965.
 32. T. Money, L.G. Wright, F. Mc Capra, E.S. Halland, A.I. Scott. J. Amer. Chem. Soc., 90, 4144, 1968.
 33. H. Goeggel and D. Arigoni. Chem. Comm., 338, 1965.
 34. A.L. Battersby, R.T. Brown, R.S. Kapi1, A.C. Plunkett & J.B. Taylor. Chem. Comm., 4b, 1966.
 35. F. Mc Capra, T. Money, A.I. Scott and I.G. Wright, Chem. Commun., 537, 1965.
 36. A.R. Battersby, R.T. Brown, R.S. Kapi1, J.A. Knight, J. A. Martin and A.O. Plunket. Chem. Commun., 888-890, 1960.
 37. A.R. Battersby. Pure and Appl. Chem., 14, 117, 1967.
 38. A.I. Scott. Accounts Chem. Res., 3, 151, 1970.
 39. A.R. Battersby, A.R. Burnett and P.G. Parsons: J.C.S. Chem. Commun., 1280, 1968.
 40. A.R. Battersby, A.R. Burnett and P.G. Parsons: J. Chem. Soc., c, 1187, 1969.
 41. A.R. Battersby, R.S. Kapi1 and R. Southgate: J.C.S. Chem. Commun., 131, 1968.
 42. A.R. Battersby, E.S. Hall and R. Southgate: J. Chem.Soc., c, 721, 1969.
 43. S. Brechbuhler-Bader, C.J. Coscia, P. Loew, Ch. Von Szczepanski and D. Arigoni: J.C.S. Chem. Commun., 136, 1968.
 44. S. Escher, P. Loew and D. Arigoni: J.C.S. Chem. Commun., 823, 1970.
 45. A.R. Battersby, S.H. Brown and T.G. Payne: J.C.S. Chem. Commun., 823, 1970.
 46. A.R. Battersby, M. Thompson, K.H. Glusen Kamp and L. F.

- Tietze: Chem. Ber., 114, 3430, 1981.
47. R.F. Bowman and E. Leete: *Phytochemistry*, 8, 1003 (1969).
 48. K.M. Madyastha and C.J. Coscia: *Recent adv. Phytochemistry (Top. Biochem. Nat. Prod.)*, 13, 85, 1979.
 49. J. Balsevich and W.G.W. Kurz: The role of 9- and/or 10-oxygenated derivatives of geraniol, geranial, nerol and neral in the biosynthesis of loganin and ajmalicine. *Planta Medica*, 49, 79-84, 1983.
 50. J. Balsevich, F. Constabel and W.G.W. Kurz: *Planta Med.*, 44, 231, 1982.
 51. J. Balsevich. *Can. J. Chem.*, 61, 1053, 1983.
 52. A.R. Battersby, A. R. Burnett and P. G. Parsons: *J. C. S. Chem. Commun.*, 826, 1970.
 53. R. Guarnaccia and C. J. Coscia: *J. Amer. Chem. Soc.*, 96, 7079, 1974.
 54. Madyastha, K. M., T. D. Meehan and C. J. Coscia: *Biochemistry*, 15, 1097, 1976.
 55. V. Spitsberg, C.J. Coscia and J. Krueger: *Plant Cell Rep.*, 43, 1981.
 56. K. M. Madyastha and C. J. Coscia: *J. Biol. Chem.*, 254, 2419-2427, 1979b.
 57. R. Guarnaccia. Unpublished observations, 1979.
 58. T. D. Meehan. Unpublished observations, 1979.
 59. C. Baxter and M. Slaytor. *Phytochemistry*, II, 2763-2766, 1972.
 60. C. J. Coscia, K. M. Madyastha and R. Guarnaccia: *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 30, 1472, 1971.
 61. J. Staunton, in *The Alkaloids (Saxton, J.E. ed.) Specialist Periodical Reports*, 2, 1. The Chemical Society, London.
 62. R. T. Brown, J. Leonard and S. K. Sleight: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 636, 1977.
 63. R. T. Brown, J. Leonard and S. K. Sleight. The role of strictosidine in monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry*, 17, 899-900, 1978.

64. A. R. Battersby, A. R. Burnett and P. G. Parsons: *J. Chem. Soc. (c)*, 1193-1200, 1969.
65. J. Stöckigt. *Phytochemistry*, 18, 965-971, 1979.
66. H. Mizukami, H. Nordloey, S.L. Lee and A. I. Scott: *Biochemistry*, 18, 3760-3763, 1979.
67. J. Stöckigt and M. H. Zenk: *FEBS Letters*, 79, 233, 1977.
68. J. Stöckigt and M. H. Zenk: *J. C. S. Chem. Commun.*, 646, 1977.
69. J. Stöckigt, M. Rueffer, M. H. Zenk and G. A. Hoyer. Indirect identification of 4,21-dehydrocorynantheina aldehyde as an intermediate in the biosynthesis of ajmalicine and related alkaloids. *Planta Medica*, 33, 188-192 1978.
70. J. Stöckigt, H. P. Husson, C. Kan-Fan and M. H. Zenk: *J. C. S. Chem. Comm.*, 164, 1977.
71. J. F. Treimer and M. H. Zenk. *Phytochemistry*, 17, 227-232, 1978.
72. A. I. Scott, S. L. Lee, T. Hirata and M. G. Culver. *Rev. Latinoam. Quim.*, 9, 131-138, 1978a.
73. J. Stöckigt, J. Treimer and M. H. Zenk: *FEBS Letters*, 70, 267, 1976.
74. K. T. D. De Silva, G. N. Smith and K. E. H. Warren: *Chem. Comm.*, 905, 1971.
75. A. I. Scott, S. L. Lee and W. Wan: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 75, 1004-1009, 1977b.
76. J. Stöckigt and M. H. Zenk, *FEBS Letters*, 19, 233, 1977.
77. A. I. Scott, P. C. Cherry and A. A. Qureshi: *J. Amer. Chem. Soc.*, 91, 4932, 1969.
78. A. R. Battersby and E. S. Hall. *J. C. S. Chem. Comm.*, 793, 1969.
79. S.L. Lee, T. Hirata and A. I. Scott. Indole Alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* involvement of geissoschizine and 19-epiajmalicine. *Tetrahedron Letters*, 691-694, 1979.
80. J. P. Kutney, T. Hibino, E. Jahngen, T. Okutami, A. H. Ratcliffe and S. Wunderly: *Helv. Chim. Acta*, 59, 2858, 1976.

81. J. P. Kutney, L. S. L. Choi, P. Kolodziejczyk, S. K. Sleigh, K. L. Stuart. Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures. III. Catharanthine and other alkaloids from the 200 W cell line: *Heterocycles*, 14, 765-768, 1980.
82. K. L. Stuart, J. P. Kutney, T. Honda, N. G. Lewis and B. R. Worth. *Heterocycles*, 9, 647, 1978.
83. K. L. Stuart, J. P. Kutney and T. Honda. Intermediacy of 3',4'-dehydrovinblastine in the biosynthesis of vinblastine type alkaloids. *Heterocycles*, 9, 1419-1426, 1978.
84. S. B. Hassam and C. R. Hutchinson. *Tetrahedron Letters*, 1681, 1978.
85. A. I. Scott: *Bioorg. Chem.*, 3, 398, 1974.
86. K. L. Stuart, J. P. Kutney and B. R. Worth; *Heterocycles*, 10, in press.
87. K. L. Stuart, J. P. Kutney, T. Honda and B. R. Worth; *Heterocycles*, submitted.
88. G. Galliani, B. Rindore and A. Marchesini; *J. C. S. Perkin I*, 456, 1978.
89. K. L. Stuart, J. P. Kutney and B. R. Worth. Studies on the synthesis of bisindole alkaloids. XIV. Enzyme catalysed formation of leurosine. *Heterocycles*, 9, 1015-1022, 1978.
90. M. M. Mesulam, G. W. van Hoesen, D. N. Pandya and N. Geschwind: *Brain Res.*, 136, 393, 1977.
91. K. L. Stuart, J. P. Kutney, T. Honda and B. R. Worth. Studies on the biosynthesis of bisindole alkaloids. The final stages in biosynthesis of vinblastine, leurosine and catharine. *Heterocycles*, 9, 1391-1395, 1978.
92. J. P. Kutney, J. Balsevich and B. R. Worth. *Heterocycles*, 9, 493, 1978.
93. P. E. Doddona and C. R. Hutchinson; *J. Amer. Chem. Soc.* 96, 6806, 1974.
94. A. I. Scott, H. Mizukami, T. Hirata. Formation of catharanthine, akuammicine and vendoline in *Catharanthus roseus* suspension cells. *Phytochemistry*, 19, 488-489, 1980.
95. W. G. W. Kurz, K. B. Chatson, F. Constabel, J. P. Kutney.

- K. L. Stuart, S. K. Sleigh, *Helv. Chim. Acta*, 63, 1891, 1980
96. W. G. W. Kurz, K. B. Chatson, F. Constabel, J. P. Kutney, K. L. Stuart, S. K. Sleigh: Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures VIII, *Planta Medica*, 42, 22-31, 1981.
 97. K. Hahlbrock, K. H. Knobloch, F. Kreuzaler, J. R. M. Potts and E. Wellmann, *Eur. J. Biochem.*, 61, 199, 1976.
 98. J. F. Treimer and M. H. Zenk. *Eur. J. Biochem.*, 101, 225, 1979.
 99. T. Hemscheidt and M. H. Zenk, *FEBS Letters*, 110, 187, 1980.
 100. K. H. Knobloch and J. Berlin, *Z. Naturforsch.*, 35, 551, 1980.
 101. M. Tabata, T. Ojino, K. Yoshioka; In *Frontiers of plant tissue culture* (Thorpe, T. A., ed), *Int. Assoc. Plant. Tissue culture*; University of Calgary, pp., 213-222, 1978.
 102. W. G. W. Kurz, K. B. Chatson, F. Constabel, J. P. Kutney. Alkaloid production in *Catharanthus* cell cultures; initial studies on cell lines and their alkaloid content, *Phytochemistry*, 19, 2583-2587, 1980.
 103. J. P. Kutney, S. L. Choi, P. Kolodziejczyk, S. K. Sleigh and K. L. Stuart. Alkaloid production in *C. roseus* cell cultures V. Alkaloids from the 176 G, 299 V, 340 V and 951 G cell lines. *Natural Products*, 4, 536, 540, 1981.
 104. V. Roller. In *production of Natural Compounds by cell Culture Methods* (Alfermann, A. W. and E. Reinhard, eds.), pp., 95-108, GfSU, Munich, 1978.
 105. J. P. Kutney, L. S. L. Choi, P. Kolodziejczyk, S. K. Sleigh, K. L. Stuart, W. G. W. Kurz. Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures: isolation and characterization of alkaloids from one cell line, *Phytochemistry*, 19, 2589-2592, 1980.
 106. W. G. W. Kurz, K. B. Chatson and F. Constabel. Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell culture, IV. Characterization of the 953 cell line. *Helvetica Chimica Acta*, 63, 1891, 1896, 1980.
 107. S. L. Lee, K. D. Cheng and A. I. Scott. Effects of bio-regulators on indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus*

- roseus cell culture, *Phytochemistry*, 20, 1841-1843, 1981.
108. H. Yokohama, E. P. Hayman, W. J. Hsu. *Sciences*, 197, 1076, 1977.
 109. V. M. Loyola Vargas. La biosíntesis de los aminoácidos aromáticos y su relación con la producción de alcaloides en plantas. *Mensaje Bioquímico*, VII, 1984.
 110. A. W. Alfermann, I. Schuller and E. Reinhard, *Planta Medica*, in press, 1981.
 111. P. Brodelius, B. Deus, K. Mosbach and M. H. Zenk, Immobilized plant cells for the production and transformation of natural products. *FEBS Letters*, 103, 93-97, 1979.
 112. P. Brodelius and K. Nilsson. Entrapment of plant cells in different matrices. *FEBS Letters*, 122, 312-316, 1980.
 113. R. L. Noble, C. T. Beer and J. H. Cutts, Further biological activities of vincalkeboblantine- and alkaloid isolated from *Vinca rosea* (L.). *Biochem. Pharmacol.*, 1, 347-348, 1958.
 114. I. S. Johnson, H. F. Wright, G. H. Svoboda and J. Vlan-tis. Antitumor principles derived from *Vinca rosea* Linn, I. Vincalkeboblantine and Leurosine. *Cancer Res.*, 20, 1016-1022, 1960.
 115. I. S. Johnson, H. F. Wright and G. H. Svoboda. Experimental basis for clinical evaluation of antitumor principles derived from *Vinca rosea* Linn. *J. Lab. Clin. Med.*, 54, 830, 1959.
 116. Manuel Litter. *Farmacología Experimental y Clínica*, Quinta Edición, pp., 1896-1899, 1975.
 117. M. D. Dowling, I. H. Krakoff and D. A. Karnofsky. Mechanism of action of anti-cancer drugs. *Chemotherapy of Cancer*. Ed. Lea & Febiger, Philadelphia, p., 1, 1970.
 118. G. H. Svoboda. The current status of research on the alkaloids of *Vinca rosea* Linn. (*C. roseus*, G. Don), Antitumoral Effects of *Vinca rosea* Alkaloids. *Excerpta Medica Foundation*, Amsterdam, 9, 1966.
 119. H. Lettré. Action of vincalkeboblantine upon cells in vitro and against Ehrlich ascites tumours. Antitumoral Effects of *Vinca rosea* Alkaloids. *Excerpta Medica Foundation*, Amsterdam, 43, 1966.

120. D. R. Rall. Animal techniques for evaluating efficacy and therapeutic index of antineoplastic agents. *Animal and clinical Pharmacologic Techniques in Drug Evaluation*. Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago, vol. 2, p., 829, 1967.
121. L. Morasca and C. Rainisio. Pharmacological studies on Vinca alkaloids. *Antitumoral Effects of Vinca rosea Alkaloids*. Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, 50, 1966.
122. J. H. Burchenal and M. R. Dollinger. Chemotherapy of leukemias and lymphomas. In Cole, W. H. *Chemotherapy of Cancer*. Lea & Febiger, Philadelphia, p., 75, 1970.
123. G. M. Mathé, M. Schneider, L. Schwarzenberg, J. L. Amiel A. Cattani, J. R. Schlumberger. Les alcaloïdes de la Vinca rosea, dans le traitement des leucémies et hémato-sarcomes. *Antitumoral Effects of Vinca rosea alkaloids*. Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, 85, 1966.
124. R. W. Talley. Systemic chemotherapy of human malignant neoplasms. In Cole, W. H. *Chemotherapy of Cancer*, Lea & Febiger, Philadelphia, p., 121, 1970.
125. J. C. Armstrong. The mechanism of action of the vinca alkaloids. In Brodsky, I. and S. B. Kahn. *Cancer Chemotherapy*. Grune & Stratton, New York, p., 37, 1967.
126. J. A. Bevan. *Fundamentos de Farmacología, Segunda Edición*, Ed. Harper & Row Latinoamericana, pp., 696, 699, 1982.
127. R. O. Johnson and W. H. Wolberg. Cellular kinetics and their implications for chemotherapy of solid tumors, especially cancer of the colon. *Cancer*, 28, 208, 1971.
128. G. S. Avery. *Drug Treatment, Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. Ed. Publishing Sciences Group Inc., pp., 295, 309, 551, 719-724, 792-793, 1976.
129. *Annal Review Pharmacology*, vol. 16, p., 150, 1976.
130. D. Soifer, Charman. *Conf. Biol. Cytoplasmic Microtubiles*, Ann. N. Y. Acad. Sci., 253, 1-848, 1975.
131. L. Wilson, J. Bryan, A. Ruby, D. Mazia. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 66, 807-14, 1970.
132. I. S. Johnson, J. Vlantis, R. Mattas and H. F. Wright; *Anti-tumor principles derived from Vinca rosea Linn. II.*

Further studies of biological activities of vincalcalcin, *Can. Cancer Conf.*, 4, 339, 1961.

133. J. H. Cutts. The effect of vincalcalcin on dividing cells in vivo. *Cancer Res.*, 21, 168, 1961.
134. M. B. Garnick, G. P. Canellos, J. P. Richie, J. J. Stark. Sequential combination chemotherapy and surgery for disseminated testicular cancer: Cis-diamminedichloroplatinum (II), vinblastine, and bleomycin remission-induction therapy followed by cyclophosphamide and adriamycin. *Cancer Treat. Rep.*, 63, 1681-1686, 1979.
135. L. H. Einhorn, J. P. Donohue. Cis-diamminedichloroplatinum, vinblastine and bleomycin combination chemotherapy in disseminated testicular cancer. *Ann. Intern.*, 87, 293-298, 1977.
136. M. K. Samson, S. E. Rivkin, S. E. Jones, J. J. Costanzi, A. F. LoBuglio, R. L. Stephens, E. A. Gehan and G. D. Cummings. Dose-response and dose-survival advantage for high versus low-dose cisplatin combined with vinblastine and bleomycin in disseminated testicular cancer. *Cancer*, 53, 1029-1035, 1984.
137. A. Osol, R. Pratt. *The United States Dispensatory*, 27th Edition, Ed. J. B. Lippincott Company, pp., 384, 1243, 1245.
138. *New Drugs*. Ed. American Medical Association, pp., 460-466, 486-488, 1966.
139. L. Kenneth, H. F. Morrelli. *Clinical Pharmacology, Basic Principles in Therapeutics*, 27th Edition, Ed. Mc Millan Publishing Co., Inc., pp., 813, 825-26, 831.
140. R. V. Smalley: Systemic Therapy for breast cancer. *Curr. Concepts Oncol.*, 11-20, 1979.
141. N. J. DiBella, D. Garfield, K. Fink, P. Anderson, J. Speer and J. Murphy. Combination Chemotherapy with BCNU, VCR, Mitomycin-C and Prednisone in refractory breast carcinoma. *Oncology*, 41, 1-3, 1984.
142. P. H. Konits, J. Aisner, D. A. Van Echo, K. Lichtenfeld, P. H. Wiernik: Mitomycin-C and vinblastine chemotherapy for advanced breast cancer. *Cancer*, 48, 1295, 1298, 1981.
143. C. M. Branbillia, M. DeLena, A. Rossi, P. Valagussa, G. Bonadonna. Response and survival in advanced breast cancer after two non-cross-resistant combinations. *Br.*

Med. J., 1, 801-804, 1976.

144. M. DeLena, M. C. Brambillia, A. Marabito, G. Bonadonna, Adriamycin plus vincristine compared to and combined with cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil for advanced breast cancer. *Cancer*, 35, 1108,1115, 1975.
145. J. M. Rainey, St., E. Jones. Combination chemotherapy for advanced breast cancer utilizing vincristine, adriamycin and cyclophosphamide (VAC). *Cancer*, 43, 66-71, 1979.
146. R. Steiner, J. F. Stewart, B. M. J. Cantwell. Adriamycin alone or combined with vincristine in the treatment of advanced breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 19, 1553-1557, 1983.
147. A. M. Liberati, F. DiConstanzo, F. Buzzi. 5-fluorouracil, vincristine and hidroxyurea combination chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Tumori*, 69, 485-487, 1983.
148. G. Falkson, H. L. Pretorius, H. C. Falkson and H. S. Schoeman. Combination of dacarbazine, mitomycin C, 5-fluorouracil and vincristine in advanced colorectal cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, II, 203-204, 1983.
149. L. Nathanson, S. D. Kaufman, R. W. Carey. Vinblastine, infusion bleomycin and cis-dichlorodiomine-platinum chemotherapy in metastatic melanoma. *Cancer*, 48, 1290-1294, 1981.
150. R. M. York, D. H. Lawson and J. McKay. Treatment of metastatic malignant melanoma with vinblastine, bleomycine by infusion and cisplatin. *Cancer*, 52, 2220-2222, 1983.
151. R. Abel, J. Berbeim, E. Cumps, M. Buyse, Y. Kenis, Re-evaluation of the combination CCNU, vincristine and bleomycin in the treatment of malignant disseminated melanoma. *Cancer Treat. Rep.*, 65, 505-507, 1981.
152. L. H. Einhorn, J. P. Donohue. Improved chemotherapy in disseminated testicular cancer. *J. Urol.*, 117, 65-69, 1977.
153. L. H. Einhorn, J. P. Donohue. Chemotherapy for disseminated testicular cancer. *Urol. Clin. North Am.*, 4, 407-423, 1977.
154. J. P. Donohue, J. M. Perez, L. H. Einhorn. Improved

- management of nonseminomatous testis tumors, *J. Urol.*, 121, 425, 428, 1979.
155. J. N. Wettlaufer, A. S. Reiner and W. A. Robinson. Vincristine, cisplatin and bleomycin with surgery in the management of advanced metastatic nonseminomatous testis tumors. *Cancer*, 53, 1984.
 156. W. T. Beck, T. J. Mueller and L. R. Tanzer. Altered surface membrane glycoproteins in Vinca alkaloid-resistant human leukemic lymphoblasts. *Cancer Res.*, 39, 2070-2076, 1979.
 157. W. T. Beck and M. C. Cirtain. Continued expression of Vinca alkaloid resistance by CCRF-CEM cells after treatment with tunicamycin or pronase. *Cancer Res.*, 42, 184-189, 1982.
 158. D. Kessel, V. Botterill and I. Wodinsky. Uptake and retention of daunomycin by mouse leukemic cells as factors in drug response. *Cancer Res.*, 28, 938-941, 1968.
 159. J. L. Biedler and H. Riehm. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res.*, 30, 1174-1184, 1970.
 160. V. Ling and L. H. Thompson. Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *J. Cell Physiol.*, 83, 103-116, 1974.
 161. P. D. Minor and D. H. Roscoe. Colchicine resistance in mammalian cell lines. *J. Cell Sci.* 17, 381-396, 1975.
 162. K. Dano. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 323, 466-483, 1973.
 163. T. Skovsgaard. Mechanisms of resistance to daunorubicin in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res.*, 38, 1785-1791, 1978.
 164. M. Inaba and R. K. Johnson. Decreased retention of actinomycin D as the basis for cross-resistance in anthracycline-resistant sublines of P388 leukemia. *Cancer Res.*, 37, 4629-4634, 1977.
 165. M. Inaba and R. K. Johnson. Uptake and retention of adriamycin and daunorubicin by sensitive and anthracycline-resistant sublines of P388 leukemia. *Biochem. Pharmacol.*, 27, 2123-2130, 1978.

166. T. Skovsgaard. Mechanism of cross-resistance between vincristine and daunorubicin in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res.*, 38, 4722-4727, 1978.
167. M. Inaba, H. Kobayashi, Y. Sakurai and R. K. Johnson. Active efflux of daunorubicin and adriamycin in sensitive and resistant sublines of P388 leukemia. *Cancer Res.*, 39, 2200-2203, 1979.
168. M. Inaba and Y. Sakurai. Enhanced efflux of actinomycin D, vincristine and vinblastine in adriamycin-resistant sublines of P388 leukemia. *Cancer Lett.*, 8, 111-115, 1979.
169. M. Inaba, R. Fujikura and Y. Sakurai. Active efflux common to vincristine and daunorubicin in vincristine resistant P388 leukemia. *Biochem. Pharmacol.*, 30, 1863-1865, 1981.
170. W. T. Beck. Vinca alkaloid resistant phenotype in cultured human leukemic lymphoblast. *Cancer Treat. Rep.*, 67, 875-882, 1983.
171. S. A. Carlsen, J. E. Till and V. Ling. Modulation of drug permeability in Chinese hamster ovary cells: possible role for phosphorylation of surface glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 467, 238-258, 1977.
172. R. A. Bender, W. D. Kornreich and I. Modinsky. Correlates of vincristine resistance in four murine tumor cell lines. *Cancer Lett.*, 15, 335-341, 1982.
173. W. T. Beck, M. C. Cirtain and J. L. Lefko. Energy-dependent reduced drug binding as a mechanism of Vinca alkaloid resistance in human leukemic lymphoblasts. *Molecular Pharmacology*, 24, 485-492, 1983.
174. W. T. Beck. Accumulation of vinblastine by sensitive and VBL-resistant CCRF-CEM cells. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 22, 204, 1981.
175. E. J. Freireich. Research contributions to combination chemotherapy. *J. A.M.A.*, 222, 1169, 1972.
176. The Pharmaceutical CODEX 11th Edition. The Pharmaceutical Press, pp., 982-985, 1979.
177. Ainley Wade. Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 27th Edition, Ed. The Pharmaceutical Press, pp., 172-174, 1977.
178. H. Tsukeda, S. Mizumo and K. Nitta. Susceptibilities of normal and malignant human lung cells in culture to the

- cytotoxic action of antitumor agents, *Cancer Res.*, 38, 2529-2532, 1978.
179. T. Tsuruo, H. Lida, S. Tsukagoshi and Y. Sakurai. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.*, 41, 1967-1972, 1981.
 180. T. Nederman. Effects of vinblastine and 5-fluorouracil on human glioma and thyroid cancer cell monolayers and spheroids. *Cancer Research*, 44, 254-258, 1984.
 181. H. Dertinger and D. Hülser. Increased radioresistance of cells in culture multicell spheroids. I. Dependence on cellular interaction. *Radiat. Environ. Biophys.*, 19, 101-107, 1981.
 182. R. M. Sutherland. The multicellular spheroid system as a tumor model for studies of radiation sensitizers. *Pharmacol. Ther.*, 8, 105-123, 1980.
 183. R. E. Durand. Flow cytometry studies of intracellular adriamycin in multicell spheroids in vitro. *Cancer Res.*, 41, 3495-3498, 1981.
 184. W. Wibe. Resistance to vincristine of human cells grown as multicellular spheroids. *Br. J. Cancer*, 42, 937-941, 1980.
 185. T. Nederman, J. Carlsson and M. Malmquist. Penetration of substances into tumour tissue-a methodological study on cellular spheroids. *In vitro*, 17, 290-298, 1981.
 186. R. J. Owellen, C. A. Hartke and F. O. Hams. Pharmacokinetics and metabolism of vinblastine in humans. *Cancer Res.*, 37, 2597-2602, 1977.
 187. R. S. Camplejohn, B. Schultze and W. Maurer. An in vivo double labeling study of subsequent fate of cells arrested in metaphase by vincristine in the JB-1 mouse ascites tumor. *Cell Tissue Kinet.*, 13, 239-250, 1980.
 188. A. M. Lengsfelt, B. Schultze and W. Maurer. Time-lapse studies of the effect of vincristine on HeLa cells. *Eur. J. Cancer*, 17, 307-319, 1980.
 189. H. O. Klein, H. J. Toerner, E. Christian. Experimental investigations on a sequential combination chemotherapy protocol. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 96, 65-73, 1980.
 190. Z. Szentirmay, A. Gyesko and J. Sugar. Quantitative cytochemical investigations on Ehrlich ascites tumor

- cells treated with vincristine, *Z. Krebsforsch.*, 78, 82-91, 1972.
191. M. Stohr and W. Fishinger. Microfluorometric investigations on the cell cycle progression of experimental ascites tumors treated with alkaloidic drugs, *Arzneimittelforsch.*, 28, 977-981, 1978.
 192. W. N. Dahl, R. Oftebro, E. O. Pettersen. Inhibitory and cytotoxic effects of Oncovin (vincristine sulfate) on cells of human line NHIK 3025. *Cancer Res.*, 36, 3101-3110, 1976.
 193. H. O. Klein. Cell kinetic alterations in normal and neoplastic cell populations in vitro and in vivo following vincristine. *Cell Tissue Kinet.*, 13, 425,434, 1980.
 194. G. S. Tennyson, B. J. Burbach and B. P. Lane. Reproductive potential of vincristine-treated multinucleate carcinoma cells. *Brief Reports, Cancer Treatment Report*, 67, 1113-1114, 1983.
 195. Y. S. Ahn, W. J. Harrington. Treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Annu. Rev. Med.*, 28, 299-309, 1977.
 196. Y. S. Ahn, W. J. Harrington, R. Mylvaganam, L. M. Allen and L. M. Pall. Slow infusion of vinca alkaloids in the treatment of Idiopathic Trombocytopenic purpura. *Annals of Internal Medicine*, 100, 1984.
 197. Y. S. Ahn, W. J. Harrington, R. C. Seelman, C. S. Eytel. Vincristine therapy of idiopathic and secondary thrombocytopenias. *N. Engl. J. Med.*, 291, 376-380, 1974.
 198. E. M. Uyeki and J. Long. Secondary spleen hemolysin plaque-forming cells. *J. Phar. and Exp. Therapeutics*, 158, 365-371, 1967.
 199. V. S. Sethi, J. C. Lewis and R. W. St. Clair. Vincristine and vinblastine lower plasma cholesterol concentrations in Rhesus monkeys. *Biochimica et Biophysica Acta*, 752, 482-487, 1983.
 200. Y. Hirsimäki, A. U. Arstila and B. F. Trump. *Exp. Cell Res.*, 92, 11-14, 1975.
 201. R. B. L. Ewart. *FEBS Lett.*, 141, 25-28, 1982.
 202. P. Hirsimäki. Vinblastine-induced autophagocytosis; effects on liver glycogen. *FEBS Lett.*, 151, 89-93, 1983.

203. I. Hanbauer, D. Jacobowitz and I. J. Kopin. Effects of vinblastine on noradrenergic axons, *Brit. J. Pharmacol.*, 50, 219-225, 1974.
204. I. Hanbauer, I. J. Kopin, G. Maengwyn-Davies, N. B. Thoa and V. K. Weise: Effects of vinblastine on catecholamine biosynthetic enzymes in heart, sympathetic ganglion and adrenal glands of rats. *Brit. J. Pharmacol.*, 48, 106-112, 1973.
205. J. L. Reid and I. J. Kopin. The effects of ganglionic blockade, reserpine and vinblastine on plasma catecholamines and dopamine- β -hydroxylase in the rat, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 193, 748-755, 1975.
206. M. L. Billingsley and H. G. Mandel. Effects of DNA synthesis inhibitors on post-traumatic glial cell proliferation *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 222, 1982.
207. R. J. Owellen and D. W. Donigan. ^3H -vincristine: preparation and preliminary pharmacology, *J. Med. Chem.*, 15, 894-897, 1972.
208. R. A. Bender, M. C. Castle, D. A. Margileth and V. T. Oliverio. The pharmacokinetics of (^3H)-vincristine in man. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 22, 430-438, 1977.
209. R. J. Owellen and C. A. Hartke. The pharmacokinetics of 4-acetyl tritium vinblastine in two patients, *Cancer Res.*, 35, 975-981, 1975.
210. M. A. Root, K. Gerzon and R. W. Dyke. A radioimmunoassay for vinblastine and vincristine. In: *Federation of Analytical Chemistry and Spectroscopy Societies*, p., 125, 1975.
211. J. J. Langone, M. R. D. Onofrio and H. VanYunakis, Radioimmunoassay for the Vinca alkaloids vincristine and vinblastine. *Anal. Biochem.*, 95, 214-221, 1979.
212. R. J. Owellen, M. Blair, A. Vantosh and F. C. Hains. Determination of tissue concentrations of Vinca alkaloids by radioimmunoassay. *Cancer Treat. Rep.*, 65, 469-475, 1981.
213. V. S. Sethi, S. S. Burton and D. V. Jackson. A sensitive radioimmunoassay for vincristine and vinblastine. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 4, 183-187, 1980.
214. J. D. Teale, J. M. Clough and V. Marks. Radioimmunoassay

- of vinblastine and vincristine, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 4, 169-172, 1977.
215. R. J. Owellen and F. O. Hains. Clinical pharmacokinetics of vincristine and vindesine as determined by radioimmunoassay. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 17, 102, 1976.
216. R. J. Owellen, M. A. Root and F. O. Hains. Pharmacokinetics of vindesine and vincristine in humans. *Cancer Res.*, 37, 2603-2607, 1977.
217. R. J. Owellen. Tritiated vinblastine in the human. In: P. Bucalossi, U. Veronosi and N. Cascinelli (eds.), *Proceedings of the Eleventh International Cancer Congress*, Florence, Italy, October 20 to 26, 1974. Amsterdam: Excerpta Medica, 1975.
218. A. J. Sedman and J. G. Wagner. CSTRIP, a FORTRAN IV computer program for obtaining initial polyexponential parameter estimates. *J. Pharm. Sci.*, 65, 1006-1010, 1976.
219. K. Yamaoka, T. Nakagawa and T. Ono. Application of Akaike's information criterion in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 6, 165-175, 1978.
220. V. S. Sethi, D. V. Jackson, D. R. White, J. J. Stuart and H. B. Muss. Pharmacokinetics of vincristine sulfate in adult cancer patients. *Cancer Res.*, 41, 3551-3555, 1981.
221. R. A. Bender, M. C. Castle, D. A. Margileth and V. T. Oliverio. The pharmacokinetics of (³H)-vincristine in man. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 22, 430-438, 1977.
222. R. L. Nelson, R. W. Dyke and M. A. Root. Comparative pharmacokinetics of the vinca alkaloids in man. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 21, 112, 1977.
223. R. L. Nelson, R. W. Dyke and M. A. Root. Comparative pharmacokinetics of vindesine, vincristine and vinblastine in patients with cancer. *Cancer Treat. Rev.*, 7, 17-24, 1980.
224. J. G. Wagner. *Fundamentals of clinical pharmacokinetics*. Hamilton, III.: Drug Intelligence Publications, 1975.
225. D. M. Metzler, G. L. Elfring and A. J. McEwen: A package of computer programs for pharmacokinetic modeling. *Biometrics*, 30, 562, 1974.

226. C. T. Beer and J. F. Richards. The metabolism of Vinca alkaloids. Part. II. The fate of tritiated vinblastine in rats. *Lloydia*, 27, 352-360, 1964.
227. C. T. Beer, M. L. Wilson and J. Bell. A preliminary investigation of the fate of tritiated vinblastine in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 42, 368-373, 1964.
228. D. W. Donigian and R. J. Owellen. Interaction of vinblastine, vincristine and colchicine with serum proteins. *Biochem. Pharmacol.*, 22, 2113-2119, 1973.
229. W. A. Creasey, K. G. Bensch and S. E. Malawista. Colchicine, vinblastine and griseofulvin pharmacological studies with human leukocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 20, 1579-1588, 1971.
230. R. L. Noble and C. T. Beer. Experimental observations concerning the mode of action of vinca alkaloids. In: W. I. H. Shedden (ed.), *The Vinca Alkaloids in the chemotherapy of malignant disease*, pp., 4-11. Altrincham, England: John Sherrat & Sons, 1968.
231. R. J. Owellen, D. W. Donigian, C. A. Hartke and F. O. Hains. Correlation of biologic data with physico-chemical properties among the Vinca alkaloids and their congeners. *Biochem. Pharmacol.*, in press.
232. D. V. Jackson, M. C. Castle, R. A. Bender. Biliary excretion of vincristine. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 24, 101, 1978.
233. V. S. Sethi, P. Surrat and Ch. L. Spurr. Pharmacokinetics of vincristine, vinblastine and vindosine in rhesus monkeys. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 12, 31-35, 1984.

234. M. D. Castle, D. A. Margileth and V. T. Oliverio. Distribution and excretion of (^3H)-vincristine in the rat and dog. *Cancer Res.*, 36, 3689, 1976.
235. S. M. El Dareer, V. M. White, F. P. Chen, L. B. Mellett, D. L. Hill. Distribution and metabolism of vincristine in mice, rats, dogs and monkeys. *Cancer Treat. Rep.*, 61, 1269, 1977.
236. V. S. Sethi, M. C. Castle, P. Surrat, D. V. Jackson, C. L. Spurr. Isolation and partial characterizations of human urinary metabolites of vincristine sulfate. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 22, 173, 1981a.
237. E. Wenkert, E. W. Hagaman, B. Lal, G. E. Gutowski, A. S. Katner, J. C. Miller and N. Neuss. *Helv. Chim. Acta*, 58, 1560, 1975.
238. A. El-Sayed, G. A. Handy and G. A. Cordell. Catharanthus alkaloids, XXXVIII. Confirming structural evidence and antineoplastic activity of the bisindole alkaloids-N'-b-oxide (Pleurosine), roseadine and vindolicine from *Catharanthus roseus*. *J. of Nat. Products*, 46, 517, 527, 1983.