

Subcittrato de bismuto coloidal en la actividad antitumoral y la nefrotoxicidad inducida por Cisplatino en ratones transplantados con leucemia P-388

Odette Beiro, Dinorah Hernández, Laura Arús, Nelson Merino,* Xiomara Alvarez, Gypsy Quintero, Yamilet Vega, David García, José Luis Bello,** Erlinda Handal,*** Sylvia Prieto, Juan Castillo y René Delgado.**

Laboratorio de Farmacología, Centro de Química Farmacéutica, Apartado Postal 16042, Playa, Ciudad de La Habana.

*Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana. **Laboratorio de Farmacología, Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, Ciudad de La Habana, Cuba. ***Universidad de San Salvador, El Salvador.

Recibido: 2 de febrero del 2000. Aceptado: 20 de octubre del 2000.

Palabras clave: Cisplatino, subcittrato de bismuto coloidal, nefrotoxicidad, leucemia P388, antitumoral.

Key words: Cisplatin, colloidal bismuth subcitrate, nephrotoxicity, P-388 leukemia, antitumoral.

RESUMEN. El Cisplatino (CDDP) constituye un fármaco ampliamente utilizado en Oncología, que presenta elevados signos de toxicidad, sobre todo a nivel renal, aspecto que limita su efectividad. Diversas estrategias farmacológicas se han utilizado para disminuir su toxicidad, en tal sentido, el empleo de algunas sales de bismuto se reporta como una posibilidad para la reducción de los signos nefrotóxicos y diversos estudios han sido orientados al esclarecimiento de los mecanismos a través de los que tiene lugar esa acción del bismuto. Este trabajo evaluó la eficacia del subcittrato de bismuto coloidal (SBC) en ratones B6D2F-1 a los que se les administraron durante 5 d por vía oral dosis de SBC entre 0 y 1 000 mg/kg. Al tercer día de tratamiento, a los grupos predeterminados se les trasplantó la línea celular leucemia P-388 y 32 h después, se les inyectó el CDDP, ambos por vía i.p. La actividad antitumoral se evaluó a partir del comportamiento de la sobrevida promedio y el índice de aumento de la sobrevida (IAS), mientras que la nefrotoxicidad fue determinada a partir del análisis de las concentraciones plasmáticas de urea y creatinina, en los distintos grupos experimentales. En los grupos tratados con CDDP el IAS fue superior al 25 %, lo cual indicó efectividad en su acción antitumoral. El daño renal en los grupos pre-tratados con SBC fue menor, detectándose concentraciones normales de urea y creatinina en plasma, significativamente diferentes a las de los grupos que no lo recibieron, hecho este que permite considerar la utilización de dicha sal de bismuto en el esquema de tratamiento del CDDP con el objetivo de reducir la nefrotoxicidad que ese fármaco antitumoral produce.

ABSTRACT. Cisplatin (CDDP) is a widely used cytostatic in oncology, which presents high toxicity levels, especially kidney related, this limits its use in more effective doses. Different pharmacological strategies have been used to reduce its toxicity, which is a limiting factor in its therapeutic efficacy. In this sense, the use of some bismuth salts have been reported as a possibility for reducing its nephrotoxic signs, and various studies have been directed at clearing the mechanisms by which bismuth action occurs. This work evaluates the efficacy of the use of colloidal bismuth subcitrate (SBC) in B6D2F-1 mice to which were administered orally for 5 d doses of SBC between 0 and 1 000 mg/kg. On the third day of treatment a line of leukemia P-388 cells was transplanted to predetermined groups, and 32 h later Cisplatin was injected, both intraperitoneally. Antitumoral activity was evaluated by the mean survival, and by the increment survival ratio (IAS), and nephrotoxicity by the plasmatic concentrations of urea and creatinine between the different experimental groups. In the groups treated with Cisplatin, the IAS was superior to 25 %, which indicates no alteration of antitumoral activity. The renal damage in the groups pretreated with SBC was reduced, being detected normal concentrations in serum of urea and creatinine, significantly different to those that did not receive SBC. The results summarized in these works permits to consider the use of SBC on the treatment schedule of CDDP with the aim to reduce the nephrotoxicity associated with this antitumoral drugs.

INTRODUCCION

El Cisplatino (CDDP) constituye un potente fármaco antitumoral ampliamente utilizado en Oncología. Ha demostrado su eficacia en el tratamiento de tumores del testículo, melanomas, sarcoma osteogénico, carcinoma de la vejiga, pulmón, cuello uterino, ovario y escamoso de cabeza y cuello.^{1,2}

Los efectos tóxicos del fármaco en humanos están relacionados con lesiones renales, en médula ósea, nervios periféricos y vías digestivas. Las lesiones observadas en riñón mediante biopsias muestran necrosis tubular aguda reversible, y en la orina se detecta aminoaciduria, proteinuria selectiva y pérdida de magnesio.³ El CDDP actualmente se administra con una sobrecarga de líquido y en ocasiones también con manitol, con el objetivo de reducir los niveles de toxicidad renal que produce.⁴

En ensayos experimentales, la dosis mínima tóxica de CDDP por vía endovenosa en perros fue de 2,5 mg/kg mediante administración única y 0,75 mg/kg en cinco consecutivas. La mortalidad en estos casos se ha asociado con una acentuada necrosis tubular.⁵

Los estudios farmacocinéticos con el CDDP realizados en ratas, ratones y perros, han mostrado una amplia distribución del producto en todos los órganos. También se ha encontrado acumulación del fármaco

co en riñón, hígado, músculos y piel a la primera hora después de la administración, efecto acumulativo que permanece detectable hasta 4 semanas después de su administración.^{6,7}

El CDDP se reporta además con capacidad inhibidora de un conjunto de enzimas que contienen grupos sulfidrilos en sus centros activos.⁸ Imura y col. han planteado que las metalotioneínas pueden modificar la toxicidad del CDDP, mediante su unión a las moléculas del fármaco, sin modificación de su actividad antitumoral.⁹

Algunos reportes señalan la posibilidad de que dichas enzimas presenten función metalorreguladora en los procesos de reparación, crecimiento y diferenciación celular, por tanto, resulta de interés la inducción de las metalotioneínas como estrategia para modificar la toxicidad causada por algunos citostáticos.^{10,11}

En 1992, Kondo y col. evaluaron el efecto del pre-tratamiento con nitrato de bismuto (NB) sobre la actividad antitumoral y la toxicidad del CDDP. Los resultados demostraron que la primera no se vio alterada por el empleo del NB y además que se logra disminuir su toxicidad. En relación con esta, se observó menor incremento en la urea, en los animales sometidos a pre-tratamiento con sales de bismuto. Además, se comprobó que el contenido de este metal y las metalotioneínas experimentaron un incremento en los riñones en correspondencia con la frecuencia de administración del NB, a diferencia de las lesiones tumorales donde las concentraciones de ambos no alcanzaron valores tan significativos.¹² Este último aspecto resulta de gran interés, ya que la inducción de metalotioneínas en el tumor ha estado asociada con la resistencia al CDDP.^{9,13}

En el Centro de Química Farmacéutica (Ciudad de La Habana) ha sido obtenido por vía sintética un antiulceroso, el subcitratato de bismuto coloidal (SBC)^{14,15} cuya administración oral ha permitido comprobar una elevada concentración de dicho metal en el riñón, tanto en ratas como en perros tratados, así como su posterior excreción en ellos por la orina.^{16,17}

Los antecedentes expuestos en relación con la posible inducción de metalotioneínas por la presencia del bismuto en el riñón, así como de proteínas con efectos protectores sobre la toxicidad renal que provoca el CDDP, son aspectos importantes a

considerar siempre que el SBC no afecte la conocida actividad antitumoral de ese fármaco.

El objetivo del presente estudio estuvo precisamente orientado a esclarecer si el tratamiento con SBC producía alguna interferencia en la actividad antitumoral del CDDP en el tratamiento de la leucemia P-388 en ratones, y si de alguna forma contribuía a la disminución de la nefrotoxicidad asociada con este conocido antitumoral.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron ratones B6D2F1 (Centro Nacional Para la Producción de Animales de Laboratorio, Cuba), distribuidos aleatoriamente en grupos experimentales (15 animales por grupo), a los cuales se les administró por vía oral, empleando cánulas apropiadas, estériles y apirogénicas, durante 5 d, las dosis respectivas de SBC (0, 100, 500 y 1 000 mg/kg) (materia prima del Q-Ulcer, Centro de Química Farmacéutica, Cuba).^{14,15} Al tercer día del tratamiento, cada animal recibió por inyección intraperitoneal el transplante de 10⁶ células de la línea de leucemia P-388. A las 32 h del transplante, se les inyectó el CDDP (10 mg/kg) (Bristol Caribbean Inc., México) por vía intraperitoneal. Se incluyó un grupo tratado con nitrato de bismuto (NB) (Merck, Alemania) (dosis 40 mg/kg) como control positivo en relación con los efectos protectores reportados para dicha sal respecto a la toxicidad del CDDP (Tabla 1).¹²

Evaluación de la actividad antitumoral

La actividad antitumoral se evaluó mediante el control de la sobrevivencia de 10 animales por grupo, con respecto al grupo control, y el índice de aumento de la sobrevivencia (IAS), calculado a través de la expresión siguiente:

$$IAS = \frac{SP_{tratado} - SP_{control}}{SP_{control}} \cdot 100$$

donde:

SP sobrevivencia promedio para cada grupo experimental.

Evaluación de la nefrotoxicidad causada por el CDDP

Para evaluar la nefrotoxicidad se emplearon cinco animales por grupo, a los cuales, en el séptimo día posterior al transplante, se les extrajo sangre del plexo retro-orbital y se determinaron algunos marcadores bioquímicos plasmáticos de daño renal tales como: la concentración de

urea (empleando el método del desdoblamiento de la urea)¹⁸ y de creatinina (método cinético de Jaffé).^{19,20}

De cada uno de los cinco animales sacrificados por grupo, se tomó una muestra de riñón, que fue conservada en disolución de formol al 10 %. Los cortes histológicos se colorearon con hematoxilina-eosina para su posterior análisis histopatológico. El daño se evaluó por la aparición o no de las alteraciones siguientes:

Tumefacción granular de las células del epitelio, depósitos amorfos hialinos en la luz tubular y cilindrios hialinos en la luz tubular. En relación con las dos últimas alteraciones se consideraron tres gradaciones (depósitos amorfos o cilindrios aislados, presencia moderada y existencia abundante de ellos). Estas alteraciones fueron registradas tras hacerse observaciones en tres campos por cada corte histológico correspondiente a cada animal. Posteriormente, se calculó el porcentaje (%) de daño observado, a partir de la determinación del número alteraciones detectadas en cada animal en que apareció algún marcador de daño renal, respecto al total de observaciones realizadas en los animales estudiados en cada grupo experimental.

Análisis estadístico

La actividad antitumoral se analizó mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney a través de la comparación de la sobrevivencia promedio correspondiente a cada grupo experimental.

El análisis de varianza de una vía de clasificación (ANOVA), se utilizó para comprobar la existencia de diferencias significativas en las con-

Tabla 1. Dosificación correspondiente a SBC, NB y CDDP para cada grupo experimental.

Grupos experimentales	Dosis (mg/kg)		
	SBC	NB	CDDP
1	-	-	-
2	-	-	10
3	100	-	-
4	500	-	-
5	1 000	-	-
6	100	-	10
7	500	-	10
8	1 000	-	10
9	-	40	10

centraciones plasmáticas de urea y creatinina entre los distintos grupos experimentales, con la correspondiente prueba *a posteriori* de Duncan.²¹

RESULTADOS Y DISCUSION

Evaluación de la actividad antitumoral

Se apreció que en los grupos tratados con CDDP aumentaron de forma significativa los índices de sobrevida promedio respecto al grupo control (efecto antitumoral del CDDP), lo que demostró la no interferencia del SBC sobre la actividad antitumoral de ese fármaco (Tabla 2).

En el grupo tratado solamente con CDDP, así como en aquellos en los que se combinó dicho tratamiento con las distintas dosis de SBC, el IAS, fue superior al 25 %, para ambos experimentos, por lo que se considera que en ellos hubo efecto antitumoral.

Evaluación de algunos marcadores bioquímicos e histológicos de los índices de nefrotoxicidad renal

El contenido de urea se elevó significativamente respecto al control en el grupo tratado con CDDP, lo que indica la nefrotoxicidad inherente al tratamiento. Dicha toxicidad experimentó una disminución hasta un 57 % en los animales pretratados con SBC.

Igualmente, en los animales tratados con CDDP, se observaron incrementos considerables de creatinina plasmática, hasta un 164 % respecto al grupo control. Sin embargo, en los animales que recibieron SBC previo al tratamiento con CDDP se pudieron apreciar concentraciones normales de creatinina (Tabla 3).

El daño renal inducido por el CDDP se caracteriza por dilatación tubular, degeneración epitelial, presencia de cilindros hialinos intratubulares²² y una extensa necrosis tubular en la franja superior de la médula.²³

Por otro lado, Basinger observó una degeneración tubular acompañada de necrosis en la unión córtico medular, tras la administración i.p. de 12,2 mg/kg de CDDP en ratas.^{24,25}

Los resultados demuestran que los animales tratados con CDDP experimentan lesiones características de daño renal, las cuales disminuyen con un efecto dependiente de la dosis empleada, cuando estos son pre-tratados con SBC (100, 500 y 1 000 mg/kg). Con respecto al grupo donde los animales se pre-trataron con NB, sólo se observó en un ani-

Tabla 2. Actividad antitumoral del CDDP en los distintos grupos experimentales, expresada como sobrevida promedio e índice de aumento de sobrevida (IAS).

Grupo	Dosis (mg/kg)			Sobrevida promedio (d) ($\bar{X} \pm DE$)	IAS
	SBC	CDDP	NB		
1	-	-	-	17,0 $\pm$ 4,0	0
2	100	-	-	18,3 $\pm$ 5,0	0
3	500	-	-	15,4 $\pm$ 0,5	0
4	1 000	-	-	17,6 $\pm$ 4,8	0
5	-	10	-	42,1 $\pm$ 8,5a	147,21
6	100	10	-	43,0 $\pm$ 10,1a	152,49
7	500	10	-	46,1 $\pm$ 8,9a	170,70
8	1 000	10	-	38,2 $\pm$ 12,0a	124,31
9	-	10	40	36,2 $\pm$ 13,4a	112,57

* Diferencias respecto al grupo control $p < 0,05$.

Tabla 3. Concentraciones plasmáticas de urea y creatinina.

Grupo	Dosis (mg/kg)			Urea (mmol/L) ($\bar{X} \pm DE$)	Creatinina (μ mol/L)
	SBC	CDDP	NB		
1	-	-	-	7,16 $\pm$ 2,13	36,92 $\pm$ 8,10
2	-	10	-	18,87 $\pm$ 2,80a	97,57 $\pm$ 4,80a
3	100	-	-	9,02 $\pm$ 2,28	35,80 $\pm$ 7,10
4	500	-	-	10,38 $\pm$ 2,09	37,01 $\pm$ 9,31
5	1 000	-	-	8,63 $\pm$ 1,01	34,80 $\pm$ 5,34
6	100	10	-	10,25 $\pm$ 3,1c	45,67 $\pm$ 9,19c
7	500	10	-	14,60 $\pm$ 3,23a,c	38,30 $\pm$ 4,76c
8	1 000	10	-	11,73 $\pm$ 5,07a,c	34,40 $\pm$ 14,53c
9	-	10	40	10,30 $\pm$ 2,50 c	45,90 $\pm$ 15,48c

Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): *respecto al grupo control y *respecto al grupo 10 mg/kg de CDDP

mal una discreta dilatación tubular.

La tabla 4 muestra los aspectos más notables observados en el análisis histológico realizado a cada grupo experimental.

Los cambios observados a partir del pre-tratamiento con SBC o NB podrían estar relacionados con la inducción por el bismuto de metalotioneínas en el riñón, atendiendo a reportes previos existentes que relacionan a estas proteínas con la reducción de la toxicidad renal del CDDP. También podrían estar participando vías metabólicas específicas o determinados mecanismos enzimáticos u otros mediadores endógenos de naturaleza anti-oxidante, como lo son las concentraciones de glutatión reducido, con efectos protectores todos sobre la toxicidad renal que provoca el CDDP.^{10-13,26} aspectos que serán objeto de posteriores estudios.

CONCLUSIONES

El estudio realizado permitió demostrar que el pre-tratamiento con SBC en ratones transplantados con leucemia P-388 contribuye a disminuir de forma significativa la nefrotoxicidad que produce el cisplatino (CDDP) sin afectar su correspondiente actividad antitumoral.

BIBLIOGRAFIA

1. Uchida N., Kasai H., Takeda Y., Maekawa R., Sugita K., Yoshioka T. Synergy of the combination of nedaplatin with etoposide in murine and human lung carcinoma. *Anticancer Research*, 18, 247, 1998.
2. Bohm S., Oriana S., Spatti G., Di Re F., Breasciani G., Pirovano C., Grosso I., Martini C., Caraceni A., Pilotti S., Zunino F. Dose intensification of platinum compounds with glutathione protection as induction chemotherapy for advanced ovarian carcinoma. *Oncology*, 57, 115, 1999.