

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

***FACULTAD DE MEDICINA***

**ESTUDIOS EXPERIMENTALES Y CLINICOS  
SOBRE MODULACION FARMACOLOGICA DE LA  
NEFROPATIA POR CISPLATINO**

**José Manuel LOPEZ VEGA**  
Licenciado en Medicina y Cirugía  
Médico Especialista en Oncología Médica

OCTUBRE DE 1.993

***ESTUDIOS EXPERIMENTALES Y CLINICOS  
SOBRE MODULACION FARMACOLOGICA  
DE LA NEFROPATIA POR CISPLATINO***

**Memoria de Tesis remitida por D. José Manuel  
López Vega para optar al Grado de Doctor en  
Medicina por la Facultad de Medicina de la  
Universidad Complutense de Madrid**

**Director: PROF. EDUARDO DIAZ-RUBIO GARCIA  
CATEDRATICO DE ONCOLOGIA  
JEFE DE SERVICIO DE ONCOLOGIA MEDICA**

**Co-Directora: PROF. JULIA BLANCO GONZALEZ  
PROFESORA TITULAR DE ANATOMIA PATOLOGICA**

Madrid, Octubre de 1.993

**D. EDUARDO DIAZ-RUBIO GARCIA, CATEDRATICO DE ONCOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, y Jefe de Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario San Carlos de Madrid**

**D<sup>a</sup> JULIA BLANCO GONZALEZ, PROFESORA TITULAR DE ANATOMIA PATOLOGICA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, y Jefe de Sección de Anatomía Patológica del Hospital Universitario San Carlos de Madrid**

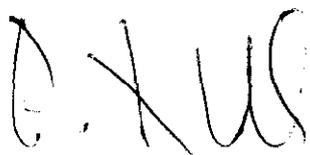
**EN CALIDAD DE DIRECTOR Y CO-DIRECTORA, RESPECTIVAMENTE, DE ESTA MEMORIA,**

**CERTIFICAN:**

Que los trabajos de investigación contenidos en la presente Memoria, cuyo título es "ESTUDIOS EXPERIMENTALES Y CLINICOS SOBRE MODULACION FARMACOLOGICA DE LA NEFROPATIA POR CISPLATINO", han sido realizados bajo nuestra dirección y supervisión en los Servicios de Oncología Médica y de Anatomía Patológica del Hospital Universitario San Carlos de Madrid, por el Licenciado en Medicina y Cirugía D. JOSE MANUEL LOPEZ VEGA

Que esta Memoria reúne los necesarios requisitos de originalidad y rigor metodológico, siendo así apta para su defensa como Tesis Doctoral.

Madrid, 5 de Octubre de 1.993



Fdo. Prof. E. Díaz-Rubio García  
Catedrático de Oncología



Fdo. J. Blanco González  
Prof. Titular de Anatomía Patológica

## AGRADECIMIENTOS

Con las limitaciones que imponen el espacio disponible y la medida emocional, quiero expresar un profundo sentimiento de gratitud hacia todas las personas que, con el único interés de esclavizarse a su amistad, han hecho posible esta Tesis Doctoral:

Deseo ante todo reiterar mi deuda perpetua con el Prof. Eduardo Díaz-Rubio, Catedrático de Oncología, que en muchas ocasiones me brindó gestos más propios de una relación paternal que de un jefe académico. Sin duda este trabajo no existiría sin su estímulo constante, y espero que su lectura pública añada siquiera un ápice de satisfacción a los honores que se le han tributado en el pasado reciente. Como tuve el honor de citar en su homenaje, él sabe que hay hombres que luchan toda la vida, y que éstos son los imprescindibles.

Al Dr. Miguel Martín Jiménez, de quien aprendí casi todo lo que hoy me permite ejercer dignamente mi profesión. Espero que sepa perdonarme algunos gestos de incompreensión con que a veces pagué su maestría, pues eran hijos de la soberbia y de la falta de experiencia. Y le deseo fervientemente que cuando afronte sus proyectos científicos, no haya Sancho alguno dispuesto a recordarle que no son gigantes, sino molinos.

Al Dr. Luis Cifuentes de Castro, quien a pesar de mis irritantes demoras, me ilustró con sus reflexiones acerca del Informe Warren y la seriedad del pueblo estadounidense, en verdad impropias de cualquier urólogo que se precie.

En fin, a todos los amigos del Hospital Universitario San Carlos de Madrid. Una lista sería abominable por larga y por injusta. Creo que se definen por saber que uno no siempre hace lo que quiere, pero le asiste el derecho de no hacer lo que no quiere.

Que el futuro os sea propicio.

## DEDICATORIAS

A OLMO,

que vino al mundo hace tres años,  
dispuesto a romper el cielo

TAMBIEN A SANDRA,

que me mira asombrada con sus grandes ojos,  
sea cual sea su color

PERO MUY ESPECIALMENTE A MARY,

por desgracia con palabras culpables  
y sin la concisión de hace años,  
pero con el mismo amor

# **INDICE**

# INDICE

---

## I. INTRODUCCION

|   |    |
|---|----|
| 1. <u>Quimioterapia y Función Renal</u> ..... | 1  |
| 2. <u>Recuerdo del Cisplatino</u>             |    |
| 2.1 Nociones químicas .....                   | 6  |
| 2.2 Actividad antitumoral .....               | 8  |
| 2.3 Farmacocinética .....                     | 8  |
| 2.4 Toxicidad .....                           | 10 |

## II. REVISION DEL PROBLEMA

|  |    |
|--|----|
| 1. <u>Perspectiva histórica</u> .....      | 12 |
| 2. <u>Rasgos histopatológicos</u> .....    | 13 |
| 3. <u>Bases fisiopatológicas</u> .....     | 14 |
| 4. <u>Métodos de nefroprotección</u> ..... | 18 |

## III. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

|  |    |
|--|----|
| 1. <u>Inconvenientes del Cisplatino</u> .....            | 22 |
| 2. <u>Crítica de los fármacos nefroprotectores</u> ..... | 23 |
| 3. <u>Hipótesis terapéutica</u> .....                    | 25 |
| 4. <u>Objetivos</u> .....                                | 27 |

## IV. MATERIALES Y METODOS

### IV-1. ESTUDIO EXPERIMENTAL DE NEFROPROTECTORES

|  |    |
|--|----|
| 1.1 <u>Cambios de la DL<sub>100</sub> de CDDP en rata Wistar</u> .....   | 28 |
| 1.1.1. Fundamento  |    |
| 1.1.2. Modelo experimental .....   | 29 |
| 1.1.3. Tratamiento farmacológico   |    |
| 1.1.4. Grupos terapéuticos .....   | 32 |
| 1.2 <u>Estudio funcional e histopatológico de la<br/>    rata Wistar tratada con DL<sub>50</sub> de CDDP</u> ..... | 34 |
| 1.2.1. Fundamento  |    |
| 1.2.2. Grupos de estudio   |    |
| 1.2.3. Métodos bioquímicos e histológicos .....  | 35 |

### IV-2. ENSAYOS SOBRE LINFOMA L5178Y EN RATON DBA/2

|  |    |
|--|----|
| 2.1 <u>Modelo experimental</u> .....         | 41 |
| 2.2 <u>Método de trabajo</u> .....           | 43 |
| 2.3 <u>Descripción de experimentos</u> ..... | 44 |

### IV-3. ENSAYO CLINICO CONTROLADO PROSPECTIVO

|  |    |
|--|----|
| 3.1 <u>Justificación del ensayo</u> .....            | 46 |
| 3.2 <u>Diseño del estudio</u> .....                  | 47 |
| 3.3 <u>Criterios de selección de pacientes</u> ..... | 48 |

|  |            |
|--|------------|
| 3.4 <u>Características de los pacientes</u> .....  | 49         |
| 3.5 <u>Estudios analíticos</u> .....               | 51         |
| <br>   |            |
| <b>IV-4. METODOS DE ANALISIS ESTADISTICO</b> ..... | <b>52</b>  |
| <br>   |            |
| <b>V. RESULTADOS</b> .....                         | <b>54</b>  |
| <br>   |            |
| <b>VI. DISCUSION Y COMENTARIOS</b> .....           | <b>85</b>  |
| <br>   |            |
| <b>VII. CONCLUSIONES</b> .....                     | <b>106</b> |
| <br>   |            |
| <b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....      | <b>108</b> |

Los niños habían de recordar por el resto de su vida la augusta solemnidad con que su padre se sentó a la cabecera de la mesa, temblando de fiebre, devastado por la prolongada vigilia y por el encono de su imaginación, y les reveló su descubrimiento:

- La tierra es redonda como una naranja.

*Gabriel García Márquez*

Todo lo inteligente debió  
ser pensado siete veces.  
Pero cuando volvió a pensarse,  
en otro tiempo y situación,  
ya no era lo mismo.

*Ernst Bloch*

# **I. INTRODUCCION**

# INTRODUCCION

## 1. QUIMIOTERAPIA Y FUNCION RENAL

El Fracaso Renal Agudo (FRA) es un síndrome plurietiológico presidido por un rápido deterioro de la función renal, de gran interés clínico por su frecuencia y los riesgos que entraña, al comportar severas alteraciones de la homeostasis hidroelectrolítica y del equilibrio metabólico del organismo. El FRA consiste en un recorte brusco y potencialmente reversible de la filtración glomerular y de las funciones tubulares de reabsorción y secreción, de modo que siempre se elevan los niveles plasmáticos de los metabolitos nitrogenados, independientemente de que la diuresis final disminuya o no (1). Según una definición quizás más vaga pero también más operativa para el clínico, el FRA es una elevación en horas o días de los niveles de urea y de creatinina, acompañada a menudo pero no siempre de oliguria (2).

Clásicamente las causas de FRA se han repartido en tres categorías (3). La primera clase y también la más habitual en la clínica es el FRA "pre-renal", el cual sería debido a una hipoperfusión del riñón de cualquier origen (hipovolemia, sepsis, etc). En el otro polo anatómico se ubica el FRA "post-renal", como secundario a una obstrucción al flujo de orina en las vías excretoras. Pero el tipo más interesante para esta discusión, es el FRA "intrínseco o intrarrenal", también denominado Necrosis Tubular Aguda (NTA), que deriva de un trastorno morfofuncional del parénquima renal, de naturaleza hipóxica, inflamatoria, tóxica o inmunoalérgica.

Múltiples sustancias de uso común en la industria y en Medicina son capaces de inducir una NTA, sobre todo en condiciones de deshidratación (**Tabla I**). Entre ellas, numerosos fármacos son capaces de interferir con el metabolismo celular y, en último extremo, atentan contra la integridad cito-funcional de la nefrona. Bajo este fenómeno subyacen múltiples mecanismos patogénicos que, de forma didáctica, se pueden agrupar en factores vasculares, glomerulares y tubulares (**Figura 1**). Esta complejidad fisiopatológica se resiste a quedar explicada por un único modelo experimental, existiendo un amplio panel de modelos variando los fármacos a emplear, sus dosis, los animales de laboratorio y la metodología operativa (1).

**TABLA I. SUSTANCIAS CON PODER NEFROTOXICO**

Modificada de Thurau y cols. (1)

ANTIBIOTICOS

Sulfamidas  
 Anfotericina B  
 Cefalosporinas  
 Aminoglucósidos  
 Tetraciclinas

METALES PESADOS

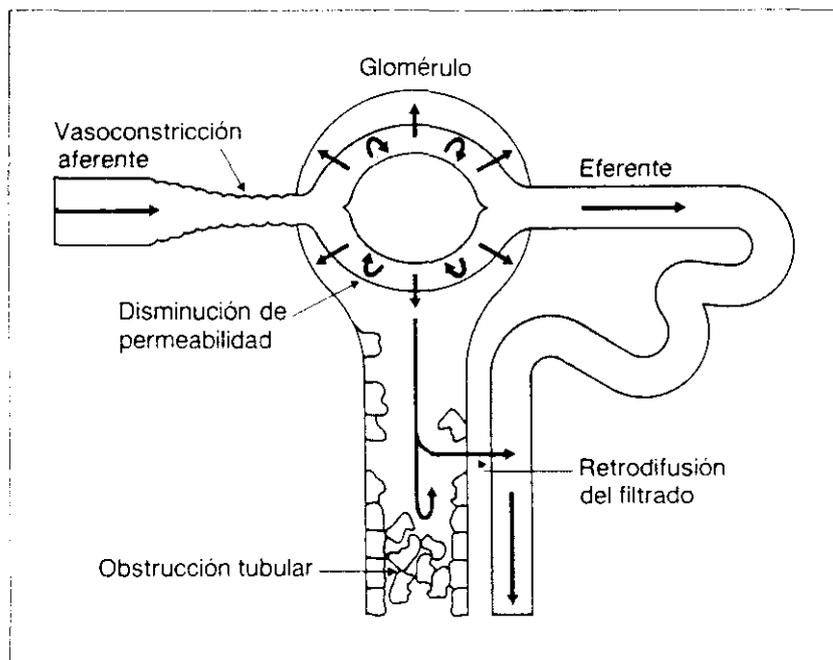
Mercurio  
 Arsénico  
 Platino  
 Plomo

PRODUCTOS ORGANICOS

Tetracloruro carbono  
 Cloroformo  
 Tetracloroetileno  
 Gasóleo  
 Herbicidas

MISCELANEA

Constrastes yodados  
 Solventes - EDTA  
 Mioglobina  
 Anestésicos fluorados  
 Antiinflamatorios



**FIGURA 1.** Posibles mecanismos fisiopatológicos implicados en la insuficiencia renal aguda

En los enfermos oncológicos es común observar trastornos de la función renal. El oncólogo a menudo se enfrentará a un amplio diagnóstico diferencial ante la instauración de un FRA (4). En la mayor parte de los casos, el desencadenamiento del mismo dependerá de la propia masa tumoral (uropatía obstructiva por ocupación pélvica), o de efectos "remotos" de la neoplasia (hipercalcemia, glomerulonefritis paraneoplásica), o bien del propio estado físico del enfermo (hipovolemia, sepsis). Pero debemos subrayar también las nefropatías inducidas por la terapéutica oncológica: radioterapia, analgésicos, aminoglucósidos y, sobre todo, por la quimioterapia (Tabla II).

---

**TABLA II. DIAGNOSTICO DIFERENCIAL del FRA en ONCOLOGIA**

---

Modificada de Schilsky (4)

Azoemia prerrenal

Deshidratación  
 Hemorragia  
 Formación de terceros espacios  
 Hipoalbuminemia  
 Estado séptico

Nefropatía intrínseca

Hipercalcemia, Hiperuricemia  
 NTA por antibióticos/analgésicos  
 Nefrotoxicidad de la quimioterapia  
 Nefritis postirradiación  
 Glomerulonefritis paraneoplásica  
 Amiloidosis  
 Metástasis intrarrenales

Uropatía obstructiva

Adenopatías/fibrosis retroperitoneales  
 Infiltración vesical

---

Los fármacos citotóxicos cuyo uso está gravado por un riesgo apreciable de nefrotoxicidad son motivo de revisión con frecuencia (5-7), aunque su número apenas rebasa la decena. De hecho, sólo tres citostáticos implican un alto riesgo de nefropatía aguda: cisplatino, metotrexate a altas dosis, y estreptozotocina. Adicionalmente, están involucrados en la instauración de fracasos renales a más largo plazo otras drogas: nitrosoureas, mitomicina, y metotrexate a dosis bajas (Tabla III). Esporádicamente se reportan datos acerca de la nefrotoxicidad de la azacitidina, la tioguanina, la L-asparaginasa, las antraciclinas y la ifosfamida (6). Estos fármacos o sus metabolitos se eliminan en abundancia por filtración glomerular o por secreción tubular, y una vez en el parénquima renal desencadenan reacciones químicas que dañan al endotelio vascular o a las células epiteliales de los túbulos. Los mecanismos patogénicos, en general, no han sido dilucidados, aunque suele invocarse una acción tóxica directa sobre el glomérulo y/o los túbulos. La repercusión sindrómica es muy variable, en algunos casos muy peculiar de cada droga, si bien suele tratarse de cuadros reversibles al suspender su administración (6,7).

---

**TABLA III. PODER NEFROTOXICO DE LOS CITOSTATICOS**

---

Según Weiss y Poster (5)

1. Alto riesgo de nefropatía aguda

Cisplatino  
Metotrexate (dosis altas)  
Estreptozotocina

2. Alto riesgo de fallo renal a largo plazo

Nitrosoureas  
Mitomicina C

3. Riesgo bajo o moderado

5-Azacitidina  
Metotrexate (dosis bajas)  
Ifosfamida

---

Ha sido el Cisplatino (CDDP) el fármaco más estudiado con respecto a su nefrotoxicidad. El CDDP es un potente citostático, dotado de un amplio espectro de actividad frente a numerosas neoplasias experimentales y humanas, que a las dosis usuales entraña un grave riesgo de inducir FRA y una tubulopatía tóxica sólo parcialmente reversibles, y a menudo fatales para el paciente. De hecho, el FRA por CDDP condicionó la difusión inicial del producto (8) y ha generado numerosas investigaciones que han cubierto gran parte de su farmacología clínica hasta la actualidad (9).

El CDDP tiene el doble interés de que no sólo provoca conspicuamente un FRA tras su uso clínico, sino que además induce cuadros severos de insuficiencia renal en diversos animales de laboratorio (10,11). Así, se han desarrollado modelos experimentales que ayudan a comprender los mecanismos del FRA tóxico, y que sirven para ensayar la eficacia de procedimientos teóricamente nefroprotectores al combinarlos con el CDDP.

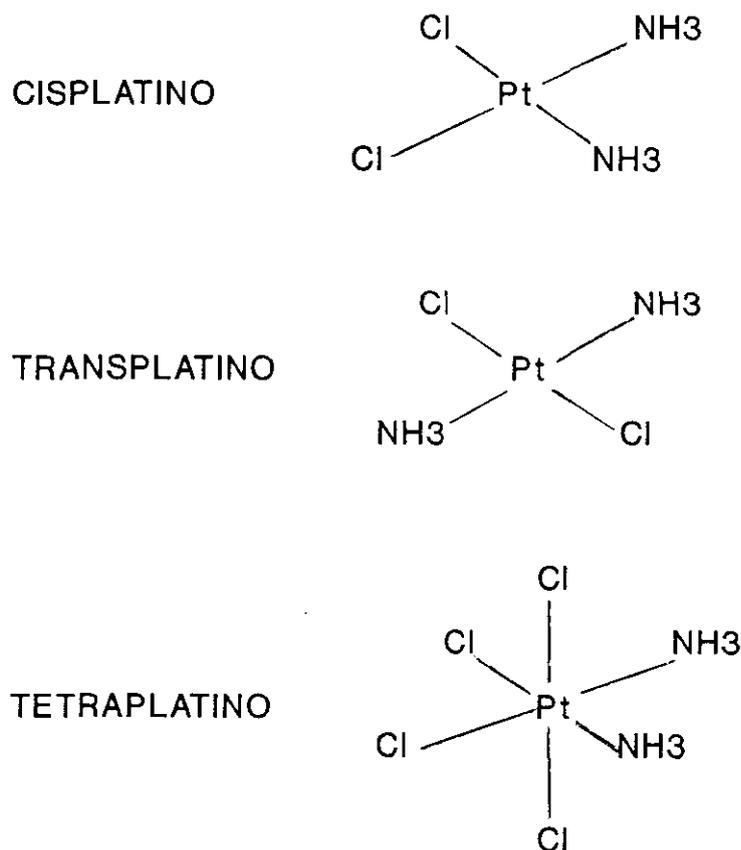
## 2. RECUERDO GENERAL DEL CISPLATINO

### 2.1. NOCIONES QUIMICAS

El Cisplatino se sintetizó en 1845, pero no fue objeto de interés hasta que Rosenberg en 1965 observó fortuitamente que un electrodo de platino introducido en un medio de cultivo bacteriano no tardaba en rodearse de un halo de inhibición celular. Se comprobó que una de las sustancias causantes de dicho efecto era el CDDP, y el propio Rosenberg probó la efectividad antitumoral del compuesto (12).

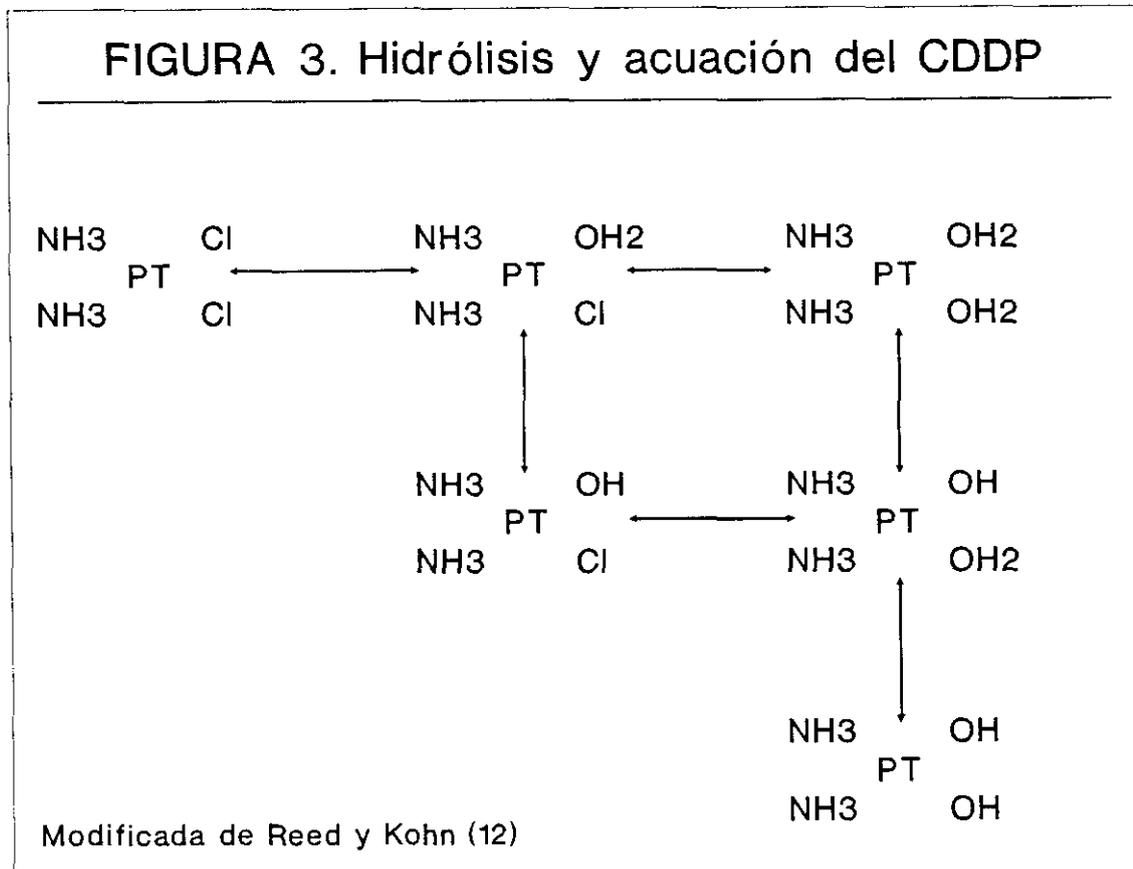
Se conocen diversos compuestos covalentes de platino cuya configuración espacial depende del estado de oxidación del mismo; los estados +2 se designan por Pt (II) y son planares, mientras que los estados +4 se denominan Pt (IV) y adoptan una disposición octaédrica. A su vez, dentro de los compuestos Pt (II) se distinguen dos isómeros, según su disposición "cis" o "trans" (Figura 2). La especie química *cis*-diaminodichloro-platino (II) es la que retiene la máxima actividad biológica, tanto antitumoral como tóxica, y se ha consagrado bajo la denominación de Cisplatino ó CDDP (13).

Figura 2. Compuestos orgánicos de platino



Los enlaces del platino con el nitrógeno son virtualmente irreversibles, pero en cambio sus uniones con ligandos de cloro, en medio acuoso y bajo determinadas condiciones de pH y de temperatura, son extremadamente lábiles. En su lugar se producen reacciones de "acuatación" (**Figura 3**) que generan especies químicas sumamente reactivas, con fuerte apetencia por el DNA, lo cual es un hecho clave para que el CDDP funcione como un agente alquilante y exprese su poder antineoplásico (**14,15**). No obstante, puede suceder que el "desplazamiento" de los átomos de cloro permita la unión del platino con grupos sulfhidrilo (como los contenidos en metalotioneínas, glutatión, tiosulfato, heparina, etc), en cuyo caso disminuye muy notablemente la reactividad biológica del platino (**11,13,16,17**). Por otra parte, si el

medio es rico en iones cloruro, la molécula de CDDP se estabiliza y tiende a perder su acción citotóxica (18,19). En parte por las diferencias de concentración del cloro entre los medios extra e intracelular, en la sangre prevalece la forma "dicloro" y en la célula se acumulan especies "acuataadas" con poder citotóxico (13,18,20).



## 2.2. ACTIVIDAD ANTITUMORAL

El CDDP es un citostático de amplio espectro frente a neoplasias experimentales y humanas, destacando su actividad frente a tumores germinales, carcinoma epitelial de ovario, carcinomas escamosos -sobre todo de cabeza y cuello-, cáncer microcítico de pulmón, sarcomas y cáncer de vejiga (21,22).

El mecanismo íntimo de la citotoxicidad del CDDP no está completamente elucidado, pero se sabe que el propio CDDP o quizá mejor sus metabolitos "acuataados" actúan de forma similar a los agentes alquilantes bifuncionales (23), esto es

reaccionando con las bases nitrogenadas del ADN para establecer puentes inter e intracatenarios (13,24-26). Los detalles químicos de estas reacciones varían entre distintos modelos experimentales (13), aunque generalmente se acepta que tienden a provocar una falla estructural que impide la replicación del ADN (27). Quizás esto explique la observación de que el CDDP actúa fundamentalmente en las fases G<sub>1</sub> y S de células de tejidos con un elevado índice proliferativo (28). Además, se ha descrito un sinergismo antitumoral del CDDP con otros citostáticos como el fluorouracilo y el etopósido. Tal sinergismo se atribuye a un incremento de la afinidad del CDDP por sus lugares de unión con el DNA o bien a la lesión molecular de los mecanismos reparadores del DNA (29), lo que de nuevo señala al ADN como una diana primordial para la acción citotóxica del CDDP. Ahora bien, por último es preciso señalar que varios estudios bioquímicos y experimentales sugieren que diversas proteínas, las membranas celulares y algunos orgánulos citoplasmáticos pueden servir también de objetivo para las acciones biológicas del CDDP (13,27). En un futuro próximo tales estudios contribuirán tanto a elucidar los mecanismos de la toxicidad del CDDP como a explicar los procesos que generan resistencias a este fármaco (30,31).

### 2.3. FARMACOCINETICA

El CDDP se emplea en Clínica por vía i.v., por lo común en perfusiones cortas a la dosis de 50 a 120 mg/m<sup>2</sup> en cada ciclo, o más infrecuentemente en perfusiones continuas de larga duración (32) o por vía intraperitoneal a dosis similares (33). El CDDP se une fuertemente a proteínas plasmáticas, de modo que sólo alrededor del 10% circula en forma libre (34,35). Sin entrar en los refinamientos de la cronofarmacología (36), se acepta que la perfusión de un bolus IV se sigue de un patrón de eliminación trifásico, con una vida media alfa de unos 25 a 49 minutos, una vida media en la fase beta en torno a 1 hora, y una vida media en la fase gamma o tardía que puede oscilar entre 24 y 60 horas (13,37). La brevedad de la vida media inicial se justifica por una agilísima eliminación renal del fármaco no unido a proteínas en pocas horas, y a su lado la larga permanencia de platino en el plasma es indicativa de una amplia distribución tisular a expensas del CDDP primariamente unido a proteínas.

La eliminación por vía renal se expresa por dos picos de fármaco en la orina; se observa un primer pico al cabo de una hora de la perfusión del fármaco y luego se recoge un segundo pico menos importante de 2 a 5 días de duración (38-40).

En todo caso, la gran mayoría del platino administrado se recoge pronto en la orina (un 60% en el transcurso de las primeras 24 horas y hasta el 90% en pocos días), si bien más tarde se siguen detectando pequeñas cantidades en orina incluso durante meses (35,41). El manejo renal del CDDP es complejo e involucra procesos de filtración glomerular, de secreción tubular, y posiblemente de reabsorción tubular (42,43). La filtración glomerular del CDDP afecta al fármaco libre en plasma y se explica por el bajo peso molecular del mismo, pero es cuantitativa y fisiopatológicamente menos relevante que los mecanismos de movilización tubular (44).

Ciertos datos sugieren que el CDDP puede ser reabsorbido merced a un sistema enzimático de transporte para aniones orgánicos, que se encontraría ubicado en el borde en cepillo de la célula renal, y que puede inhibirse mediante la administración simultánea de probenecid (42). Sin embargo, se ha acumulado una mayor evidencia de que el CDDP emplea sobre todo una "bomba" para cationes orgánicos, cuyo sustrato son enzimas situadas tanto en la membrana baso-lateral como en el polo apical de la célula (45). Se ha sugerido que este sistema "catiónico" se responsabilizaría ante todo de la secreción tubular del CDDP, y que su inhibición podría desempeñar un papel interesante en la paliación de la toxicidad del CDDP a nivel renal (44,46). Sea cual fuere la dirección neta del CDDP al ser transportado por estos sistemas de membrana (de hecho, podría existir un "flujo dinámico" en ambos sentidos), se sabe que el CDDP se acumula muy rápidamente en la célula renal y en la orina, alcanzando niveles máximos entre 1 y 6 horas después de su perfusión, y que también rápidamente sufre cambios químicos y metabólicos que pueden ser importantes para sus acciones biológica y tóxica (47).

El CDDP exhibe una amplia distribución tisular. Aún con ligeras diferencias respecto a su rapidez de acumulación en varios órganos, se sabe que difunde rápidamente a riñón, hígado, intestino, testículo, bazo, suprarrenales y ovario, mientras que es irrelevante su presencia en el cerebro (31,48-51). Una buena penetración en un órgano concreto no se sigue necesariamente de una actividad biológica significativa sobre el mismo. Por ejemplo, en el hígado el CDDP es rápidamente transformado en metabolitos esencialmente atóxicos y sólo el 10% del CDDP total administrado se elimina por la bilis (47,52). Sin embargo, la acumulación de CDDP y de sus metabolitos en el tejido renal no es sólo importante a efectos biológicos, sino que desde el punto de vista cinético es muy duradera (41).

## 2.4. TOXICIDAD

Desde los primeros ensayos clínicos en los años 70 se ha revisado numerosas veces los efectos tóxicos del CDDP (8,9,13,22,53). Entre ellos destaca la nefrotoxicidad, que se reconoció desde el principio como la toxicidad limitante del escalamiento de dosis, pues ya en escalones de dosis que en teoría debieran ser atóxicos se observaron muertes por nefropatía aguda (8,54,55). El segundo efecto agudo en importancia es la hiperemesis, que en algunos estudios se ha considerado limitante de dosis (9,13) y que ha generado una amplia literatura acerca de su control farmacológico (56,57). Ambos tipos de toxicidad fueron las que comprometieron el uso generalizado del fármaco y las que aún hoy condicionan más su manejo práctico.

A medida que se han ido controlando los antedichos efectos tóxicos, han ido cobrando relieve otras toxicidades de perfil más crónico, entre las que destaca la neurotoxicidad (13,58-60). Esta engloba fenómenos relativamente frecuentes con dosis de CDDP de 300-600 mg/m<sup>2</sup>, como son la neuropatía periférica y la ototoxicidad, y por otra parte reúne otros efectos más esporádicos, como ceguera cortical, crisis epilépticas, y neuritis retrobulbar. La neuropatía por CDDP es una polineuropatía simétrica y distal, de predominio sensitivo en sus primeras fases, cuya patogenia y control no están aclarados (61). Además, con dosis por lo común superiores a 600 mg/m<sup>2</sup>, y sobre todo si concurren factores como edad avanzada o tratamiento con aminoglucósidos, el CDDP provoca una pérdida auditiva por lesión coclear, con afectación de tonos agudos y a veces de las frecuencias de conversación normal, mientras simultáneamente queda respetada la función vestibular (62). Al parecer, el daño coclear por CDDP se debe a la inhibición de un enzima transportadora de iones ATP-dependiente, y es posible que la fosfomicina ejerza un papel protector frente a aquél (63).

Se han descrito otros efectos tóxicos diversos, si bien en la práctica han condicionado muy escasamente el uso del CDDP. Se trata de un fármaco muy anemizante (en parte a través de su nefrotoxicidad) (9), pero es poco mielosupresor en el sentido clásico del término, salvo que se emplee a dosis muy elevadas (64). Aún menos relevancia tienen otras toxicidades, habiéndose descrito esporádicos casos de hiperpirexia (65), secreción inapropiada de vasopresina (66), azoospermia (67), porfiria (68) y pancreatitis (69). En todo caso, el CDDP no está implicado en toxicidades usuales con otros citostáticos, como alopecia o mucositis (20). Existe

controversia acerca de la implicación del CDDP en fenómenos vasculopáticos como el síndrome de Raynaud (70,71) y sobre su posible cardiotoxicidad (9,53). Por último, aunque se ha reconocido el potencial mutagénico y carcinogénico del CDDP (20), tal efecto participa de la escasa trascendencia clínica que hemos apuntado para otras toxicidades.

**II. REVISION  
DEL PROBLEMA**

## REVISION DEL PROBLEMA

### 1. PERSPECTIVA HISTORICA

El CDDP ha demostrado poseer un amplio espectro de actividad frente a diversos tumores experimentales y humanos (22,72). En los últimos años se ha asentado como el eje de la quimioterapia contra los cánceres de testículo, ovario, vejiga y varios carcinomas escamosos, y ha sido extensamente investigado en prácticamente todas las neoplasias humanas, tanto en solitario como en regímenes politerapéuticos, a veces sobre la base de un mecanismo sinérgico con la radioterapia o con otros citotóxicos (21). Aún hoy, si bien junto a ciertas dudas sobre la contribución real del CDDP a la curación de varios cánceres (73,74), este fármaco sigue siendo un importante arma terapéutica de la Oncología Médica.

Aunque se han arrojado dudas sobre la real correlación entre la dosis y la respuesta (75), clásicamente se ha explorado una correlación positiva entre ambos parámetros (76-78). El principal escollo para la escalada de las dosis ha sido la nefrotoxicidad, sin cuyo control siquiera parcial no se hubiera podido pasar de dosis únicas de 50 mg/m<sup>2</sup> hasta las más usuales hoy día de 100-120 mg/m<sup>2</sup> (53,76), y a partir de ahí se han visto tasas prohibitivas de nefrotoxicidad aguda, salvo el empleo de procedimientos experimentales que luego se expondrán (79).

En los primeros ensayos clínicos, con dosis hipotéticamente atóxicas (no se esperaba la aparición de toxicidad renal, quizás por la mayor resistencia que ofrece el riñón de los roedores frente a la acción tóxica del CDDP) se destacó la severidad clínica de la insuficiencia renal provocada por el CDDP. A pesar de su prometedora actividad antitumoral parecía que el uso de CDDP no llegaría a generalizarse (53,76). Con dosis únicas de 50 mg/m<sup>2</sup>, en aproximadamente un tercio de los enfermos surgía

una insuficiencia renal aguda, y al alcanzar dosis de 100 mg/m<sup>2</sup> casi la totalidad de los pacientes sufrían un serio deterioro funcional del riñón (54). Los investigadores reportaron síndromes de azoemia, anuria y cambios necróticos de los túbulos renales, a las pocas horas o días de instaurar el tratamiento. La incidencia, intensidad y duración de estos efectos era variable y en gran medida dependiente de las dosis empleadas (80), pero no eran inusuales las muertes tóxicas y en muchos pacientes no se normalizaba completamente la función renal (81). A la par que la emesis, pues, se erigía una inaceptable nefrotoxicidad en gran obstáculo para el desarrollo clínico del CDDP. Fue necesario experimentar varias formas de nefroprotección para poder incrementar las dosis del fármaco, y sólo entonces se vio que la insuficiencia renal podía eludirse en ciertas condiciones y que se obtenía un beneficio en términos de eficacia antitumoral.

## 2. RASGOS HISTOPATOLOGICOS

En las primeras experiencias clínicas con CDDP se observó una toxicidad funcional consistente en una reducción aguda del filtrado glomerular, evidenciada por una disminución del aclaramiento de creatinina; en los casos más graves se añadían diversos signos de disfunción tubular. El perfil agudo del cuadro y la disminución de la filtración glomerular apuntaban hacia la existencia de lesiones vasculares y glomerulares, pero los estudios microscópicos ponían de manifiesto una necrosis tubular focal, con afectación predominante de los túbulos distales (81). Según datos experimentales de ciertos animales las lesiones eran, en cambio, más prominentes en la corteza más externa, y más concretamente en los túbulos proximales (82-85). En fin, para otros autores el máximo grado de necrosis se observa en la unión cortico/medular, afectando tanto a túbulos proximales como a segmentos distales de las nefronas (86,87), aunque conspicuamente con integridad morfológica de los glomérulos.

Aparte de las diferencias farmacodinámicas y toxicológicas inherentes al modelo experimental analizado, las variaciones comentadas pueden reflejar un distinto momento evolutivo en las lesiones, o quizás derivan de cambios en la cloruresis (19). Por otro lado, no siempre existe una buena correlación entre la extensión del daño estructural y el grado de insuficiencia renal observado, al igual que sucede en otros modelos de nefropatía tóxica (2,3).

Con microscopía electrónica se demuestran severos cambios necróticos en todos los segmentos tubulares, fundamentalmente en los proximales en la rata, o bien más acusados en los túbulos distales y colectores en el humano. Son rasgos destacables el aumento de la dotación celular en lisosomas, las anomalías estructurales de las mitocondrias y la pérdida del borde en cepillo, pero asimismo existen atipias nucleares, cambios del glucógeno, y depósitos densos en la cápsula de Bowman que deben corresponder a acúmulos de platino (81,87-89).

### 3. FISIOPATOLOGIA DE LA NEFROPATIA POR CDDP

Los mecanismos íntimos subyacentes al hecho de que el CDDP o sus metabolitos inducen un daño funcional y estructural del riñón no son bien conocidos. En parte, ello deriva de su complejidad, al imbricarse cambios funcionales y lesiones estructurales a menudo con cronología y severidad en apariencia discordantes. Conviene señalar que los métodos analíticos y la selección de pacientes en los estudios de nefrotoxicidad por CDDP han sido a menudo variables (22).

Otro factor a considerar es la distinta susceptibilidad de cada animal de experimentación. En el perro y ocasionalmente en el humano se ha descrito que la lesión tubular alcanza una gran severidad aún antes de que se altere la filtración glomerular (90,91). Ello sugeriría que el fracaso renal es secundario a una obstrucción de la luz tubular por restos necróticos, o bien a un "feed-back" vasoconstrictor mediado por el aparato yuxtglomerular, vía eje renina/angiotensina, que sería desencadenado por un exceso de sodio no reabsorbido en el túbulo proximal. No obstante, en la rata y en la mayoría de las experiencias clínicas, parecen ocurrir alteraciones de la hemodinámica y de la filtración glomerular antes de que se produzca una necrosis tubular, surgiendo dudas sobre la contribución del daño tubular en la patogénesis del fracaso renal (84,92).

Incluso podrían existir interpretaciones divergentes por simples razones de técnica experimental. Así, por ejemplo, se ha descrito que las ratas adultas son más susceptibles que las jóvenes a la nefropatía por CDDP (93), pero en el hombre pudiera suceder incluso a la inversa (94). Análogamente, en ciertos modelos experimentales de nefropatía por mercurio, las ratas hembras han exhibido mayor grado de susceptibilidad renal que los machos (95).

En cualquier caso, se han descrito varios cuadros de nefrotoxicidad por CDDP en función del tiempo transcurrido desde la perfusión del fármaco. El mayor conocimiento se tiene acerca de los cambios **agudos**, en el período de 96 horas inmediatamente siguientes al primer ciclo de tratamiento (**22,91,92,96**), momento donde concurre una combinación de trastorno funcional glomerular y de cese de las funciones tubulares, que analizaremos más adelante. Menos información se tiene de los cambios **subagudos**, entre los que predominan las manifestaciones de tubulopatía tóxica (**22,97**). Aunque se ha debatido si la filtración glomerular sigue empeorando en igual proporción (**98**), la mayoría de los autores piensan que los ciclos repetidos de CDDP se acompañan de una reducción paulatina de la filtración glomerular (**88,99,100**). En este período subagudo se ha referido una disminución de la capacidad del riñón para excretar CDDP libre (**101**), lo cual podría explicarse por un menoscabo de la filtración glomerular, pero también por una lesión de los mecanismos enzimáticos encargados de la secreción tubular del fármaco (**42-44**). Por último, se han estudiado la toxicidad renal del CDDP **a largo plazo**, de gran interés porque afecta a pacientes curados de su neoplasia (en su mayoría, personas jóvenes portadoras de cánceres germinales). Existe consenso en que persisten durante meses o años una disminución no evolutiva de la filtración glomerular y huellas histológicas de la tubulopatía aguda (**22,88, 102,103**), si bien la trascendencia clínica de estos hallazgos parece menor que su interés fisiopatológico (**104**).

Para concretar esta Revisión, vamos a subrayar los aspectos más importantes de la nefropatía aguda inducida por CDDP. En aras de una exposición más clara, los fenómenos agudos de la nefrotoxicidad por CDDP se pueden dividir en dos frentes, que de hecho discurren de forma independiente en opinión de varios autores (**79,97**):

### 3.1. Efectos hemodinámicos

Muy precozmente se produce una disminución del flujo plasmático renal seguida de una disminución de la tasa de filtración glomerular; se acepta que este fallo glomerular es un fenómeno agudo (**92**) con secuelas permanentes no evolutivas (**91,102,103**), pero su patogenia está sujeta a discusión. Uno de los factores deter-

minantes parece ser una vasoconstricción selectiva de la arteriola aferente al glomérulo. Hace años se sugirió que el mecanismo subyacente era una estimulación del eje renina/angiotensina (10) y posteriormente se han aportado datos demostrativos de que existen una elevación de la renina (105) y subsecuentemente una hiperactividad de la angiotensina II, la cual actuaría sobre las arteriolas glomerulares por mediación de un receptor acoplado a un canal de calcio (106). Ahora bien, no está aclarado si la liberación de renina obedece a un efecto tóxico directo del CDDP, o bien es una secuela de la tubulopatía que luego detallaremos; vaya por adelantado que la lesión tubular asociada al uso de CDDP cursa con una poliuria aguda que sume al organismo en un estado de deshidratación e hipoperfusión renal (90,107), quizás a través de mecanismos de "bio-feedback" en los que pudieran desempeñar un papel las prostaglandinas (108).

El recorte de la filtración glomerular también podrá explicarse por mecanismos vasculopáticos, bien por una angiopatía espástica atribuible al propio CDDP (70,71), bien a través del estímulo local de reacciones implicadas en la coagulación sanguínea (17,109).

### 3.2. Lesión tubular

Desde el punto de vista histopatológico, es llamativa en la nefropatía tóxica por CDDP la conservación morfológica de los glomérulos, al lado de floridas lesiones correspondientes a una clásica NTA (81,110). La topografía varía de unas especies a otras (87,111) y las consecuencias son también variables. Se ha señalado que las células sufren una "balonización" que, por un simple conflicto de espacio, puede generar isquemia y quizás una vasoconstricción glomerular reactiva (22,86,89). También sería verosímil que los detritus celulares produjesen una obstrucción de la luz tubular, comprometiendo secundariamente la función glomerular. Sin embargo, es comunmente aceptado que la interrupción del filtrado glomerular es un fenómeno en buena parte independiente (84,92) y que la severidad de la NTA no se correlaciona bien con el grado de azotemia y sí con la aparición de diversos trastornos electrolíticos entre los que destaca la hipomagnesemia (22,87,112,113).

El CDDP accede al parénquima renal como fármaco libre (114); una fracción alcanza la célula tubular por su polo luminal, en concreto el CDPP filtrado en el glomérulo y reabsorbido por un sistema de transporte para aniones orgánicos (42); y otra porción se elimina por secreción tubular activa (115), empleando un sistema de transporte para cationes orgánicos (44,45). Una vez que el CDDP penetra en la célula tubular, o incluso en la luz tubular, sin duda sufre rápidas transformaciones moleculares, motivadas por reacciones de detoxificación y por procesos de "acuatación" -condicionados por el pH y por la concentración de cloro en el medio (19)-, que generan especies químicas hiperreactivas a las que se atribuye la citotoxicidad (13,47,108,116). Las moléculas con poder nefrotóxico deben interactuar con alguna estructura subcelular; pero aunque se sabe al CDDP capaz de unirse a diversas macromoléculas repartidas por el núcleo, el citosol y las membranas de la propia célula y de varias organelas (25), no se conoce con exactitud la patogenia de la tubulopatía tóxica (108,116).

Las mitocondrias han sido propuestas como dianas del CDDP, en virtud de sus notables cambios a nivel ultraestructural en casos de nefropatía por este fármaco (89). Se ha dicho que el CDDP interrumpe reacciones de respiración celular e induce la liberación de calcio mitocondrial, por todo lo cual podría afectar procesos vitales para la célula, como el funcionamiento de bombas iónicas ATP-dependientes, la estabilidad de los lisosomas, o la polimerización de los microtúbulos del citoplasma (1,2,40,116). Sin embargo, las funciones mitocondriales quedan interrumpidas en presencia no sólo de CDDP, sino también de otros compuestos no nefrotóxicos, como son el Tetraplatino (ver **Figura 2**) y el Carboplatino, y así no se puede afirmar que las alteraciones mitocondriales sean un hecho clave en la nefropatía por CDDP (108,117). Se ha reportado también que el CDDP altera la función de bombas iónicas de membrana en células óticas (63) y en el borde en cepillo de las células del túbulo renal (118). Por último, de forma similar a otros compuestos nefrotóxicos como los aminoglucósidos, el CDDP podría lesionar el túbulo proximal por mediación de una inestabilidad de las membranas lisosomales, liberando enzimas autolíticos (119,120).

Sea cual fuere la acción íntima del CDDP, es un hecho que se interrumpe la absorción de sodio en el túbulo proximal (90) y de cloro en el asa de Henle (19). Por una parte, se incrementa la osmolaridad urinaria, lo que conlleva una poliuria que no hará sino agravar el compromiso de la filtración glomerular; y por otro lado, se interrumpirá la absorción de calcio y magnesio que normalmente van acopladas a la

del cloro en la rama ascendente del asa de Henle, sin descartar que se pierdan cationes por lesión de otros segmentos de la nefrona (108,111,121). Insistiremos más adelante en la hipomagnesemia como el rasgo más significativo de la tubulopatía aguda por CDDP (97,112,122).

#### 4. METODOS DE NEFROPROTECCION

El CDDP es un agente antitumoral de amplio espectro (72), con una aceptable correlación dosis/respuesta (77,78), pero con el grave problema de la nefrotoxicidad como factor limitante del escalamiento de la dosis (79). En los primeros estudios se comprobó que el fármaco no alcanzaría un desarrollo clínico suficiente si no se controlaba este aspecto de la toxicidad (8,53).

En una visión histórica, los esfuerzos en esta línea se pueden agrupar en dos grandes períodos. El primero está consituído por las modificaciones de los protocolos de perfusión, en cuanto a tiempos y vehículos de administración del CDDP, y fue una mezcla de empirismo y de investigación guiada por las propiedades químicas y cinéticas del fármaco. Pertenecen a esta estrategia el fraccionamiento de la dosis, la intensificación de la diuresis, y el uso concomitante de suero salino hipertónico. La segunda época, en la que aún nos encontramos, se definiría por empleo concurrente con el CDDP de diversos fármacos no citostáticos, que pudieran inhibir los efectos del CDDP en varios puntos críticos del funcionalismo renal. Tal estrategia tiene la virtud de que tiende a explotar nuestro conocimiento -cada vez mayor, bien que incompleto- acerca de la fisiopatología del daño renal por CDDP.

**El PRIMER período** se inicia con el fraccionamiento de la dosis total en 5 días, apreciándose que 100 mg/m<sup>2</sup> repartidos en 5 días equivalían en cuanto a toxicidad renal a 50 mg/m<sup>2</sup> en dosis única. Su segundo logro fue el empleo de una hidratación abundante y de reforzamiento de la diuresis, primero con la idea de diluir el CDDP en la orina y aminorar así su interacción con el epitelio renal, si bien posteriormente se ha discutido si el aumento de la volemia puede contrarrestar la disminución de la filtración glomerular asociada al tratamiento con CDDP (22,108,

123). De este modo, ya a principios de los años 80, se pudo generalizar la aplicación de dosis en torno a 100 mg/m<sup>2</sup> en un solo día (123,124). La diuresis se ha estimulado con una sueroterapia abundante y con el empleo liberal de furosemida y manitol (82,87,125-127), si bien las contribuciones relativas de estas medidas no están bien establecidas (83,128).

El tercer hito en esta generación de estudios, ya a caballo con la explotación farmacológica de la posible patogenia de la toxicidad por CDDP, fue el empleo de suero salino hipertónico al 3%. Estudios clásicos habían señalado que el desplazamiento de los átomos de cloro en su unión con el platino daba lugar a la formación de especies "acuadas" de CDDP, que retenían la mayor actividad tóxica, y se conocía que un medio rico en cloro podía dificultar dicho "desplazamiento" (15,18,129). Sobre tal base se defendió la utilización de dosis ultra-altas de CDDP, hasta de 200 mg/m<sup>2</sup> por ciclo, repartidos en 5 días y con la administración de abundante salino hipertónico (80,130). Este método ha permitido un notable escalamiento de la dosis, con aparición de azoemia en alrededor del 15-20% de los pacientes, pero con incidencias de hipomagnesemia del 60-100% de los casos (79,131, 132), y con el relieve de otras toxicidades como la neurológica y la medular (133). Por otra parte, se ha cuestionado si el salino hipertónico supone una ventaja añadida a los ya eficaces fraccionamiento de la dosis en 5 días e hidratación convencional (59,131).

**En la SEGUNDA época**, o de modulación farmacológica, se han empleado múltiples agentes teóricamente nefroprotectores, unas veces con cierta base experimental, otra directamente en ensayos clínicos (16,17,116,134,135). La diversidad química y farmacológica es la nota más llamativa de estos estudios. Con ánimo de no ser exhaustivos en su descripción, podríamos agruparlos en cuatro categorías:

#### 4.1. Donadores de grupos tiol (SO<sub>3</sub>)

En presencia de compuestos ricos en radicales sulfuro, los átomos de cloro que se escinden del platino, no dejan ya sitio a la acuatación del CDDP, sino a la formación de uniones entre el platino y grupos -SH en el seno de moléculas desprovistas de toxicidad. Los productos más representativos han sido clásicamente

el tiosulfato sódico, cuya eficacia ha sido reiterada en diversos estudios (136-138); el mesna (mercapto-etansulfonato sódico, cuyo beneficio es más dudoso (139,140); y el GSH o glutatión (141,142). Otras sustancias con capacidad para detoxificar al CDDP por esta vía serían el dietilditiocarbamato (DDTC), el WR-2721 (también denominado etiofos), la penicilamina, la tiourea y la metionina (18,143-147), la mayoría de ellas con muy escasa utilidad práctica, y quizás otras moléculas como los heparinoides (17) y la butionina sulfoximina (BSO) (148) ejerzan efectos relacionados con aquéllas.

El interés por estos compuestos tiende a renovarse con el tiempo (149-152), si bien sólo el tiosulfato sódico y el glutatión se han incorporado a la práctica clínica (137,153), generando cierto escepticismo sobre la utilidad real de los demás compuestos donadores de grupos tiol (154).

#### 4.2. Inductores de metalotioneína

La metalotioneína es una proteína intracelular muy rica en cisteína (por tanto, en grupos sulfurados), responsable de varios procesos de detoxificación de metales pesados, cuyo papel en la protección frente al CDDP ha sido objeto de reciente interés (155,156). Sustancias diversas como el bismuto (157,158), el zinc (159) y la dexametasona (30) pueden inducir la expresión de dicha proteína y contribuir a la nefroprotección frente al cisplatino; quizás un mecanismo análogo confiera un papel nefroprotector al selenio (160-162). En todo caso, ninguno de estos métodos está cercano a la clínica cotidiana en la actualidad.

#### 4.3. Agentes vasoactivos

Sobre la base de que en la azotemia inducida por CDDP subyace una hiperactividad del sistema renina/angiotensina que actuaría finalmente a través de un canal de calcio (92,106), se ha propuesto el uso del captopril (105) y de bloqueantes del calcio, como el verapamil (134,163) y la nicardipina (164). Acerca del valor real de estos compuestos perdura hoy una polémica que analizaremos más adelante.

#### 4.4. Inhibidores del transporte del CDDP

Hemos visto que el CDDP se moviliza a través de las células renales gracias a sistemas enzimáticos de transporte (42-45,115). Los que manejan aniones orgánicos se localizan sobre todo en el polo tubular de la célula, y podrían responsabilizarse tanto de una secreción de CDDP como quizás de una reabsorción del CDDP previamente filtrado; en cualquier caso, estos sistemas podrían inhibirse con probenecid (42), sustancia que recientemente se ha demostrado útil en ensayos clínicos (165).

Por otra parte, las bombas para cationes orgánicos se encuentran ampliamente representadas en la porción laterobasal de la membrana de estas células, y podrían ser claves para la secreción tubular activa de CDDP. Se ha demostrado experimentalmente que estos transportadores se pueden inhibir competitivamente (44), con cimetidina (46) y otros fármacos como la quinidina (166). En esta línea, la cimetidina ya ha sido empleada en clínica para paliar la nefrotoxicidad por CDDP (134).

#### 4.5. Estabilizadores de membranas

Aunque el apoyo fisiopatológico y experimental es pobre, se han ensayado la fosfomicina y los corticoides (116,120) por su supuesta acción a favor de la integridad de las membranas lisosomiales ante estímulos tóxicos, entre los que pudiera encontrarse el CDDP. Así, estos fármacos evitarían fenómenos de autofagia celular que serían desencadenados por el CDDP. Al lado de esta hipotética acción estabilizadora, se ha reportado otros mecanismos de acción de la fosfomicina sobre la ototoxicidad por CDDP (63) y de la dexametasona sobre cultivos de células renales de rata (30). Ambos fármacos serán objeto de atención más detenida a lo largo de esta Tesis.

### **III. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

## **HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

### **1. INCONVENIENTES DEL CISPLATINO**

Pese a los indudables avances operados en el control de la nefrotoxicidad por CDDP (80,123), en un 5 al 15% de los enfermos según las series se sigue observando una reducción de la filtración glomerular y, sobre todo, estigmas clínicos y bioquímicos de tubulopatía tóxica (9,87,97,112,122,167). Los problemas clínicos asociados con esta nefrotoxicidad y su tratamiento son de diversa índole:

a. Los esquemas de hidratación forzada son mal tolerados por algunos pacientes, y en todo caso suelen aconsejar la estancia hospitalaria del enfermo, con el consiguiente coste económico, emocional y de sobrecarga asistencial.

b. Una insuficiencia renal puede comprometer la intensidad de dosis de la quimioterapia (101), o bien ser indeseable en sujetos con un deterioro previo de la función renal, o por último puede condicionar el uso clínico de otros fármacos como los aminoglucósidos (168).

c. Los trastornos electrolíticos secundarios a la lesión tubular por CDDP son bien tolerados en el sentido de que sólo el 10% de los pacientes se objetivan signos de su existencia (97,112,169). No obstante, es verosímil que ciertos síntomas más vagos (astenia, adinamia muscular, anorexia, náuseas, irritabilidad) sean inadvertidos por los clínicos, pero quizás no por el enfermo, quien puede sufrir una gran merma en su calidad de vida (36,97).

d. No se puede descartar que el tratamiento con CDDP deje secuelas funcionales indeseables en el caso de enfermos jóvenes potencialmente curables (22,103,169).

En aras de todas las cuestiones mencionadas, el empleo clínico del CDDP sigue planteando numerosos inconvenientes prácticos. Fundamentalmente, aún hoy el paciente no está exento del riesgo de padecer una disfunción renal importante de cara a su pronóstico. Por ello, en nuestra opinión está plenamente justificado que la nefrotoxicidad del CDDP siga siendo objeto de investigación, y ésta es la razón primordial de esta Memoria de Tesis.

## 2. CRITICA DE LOS FARMACOS NEFROPROTECTORES

La nefrotoxicidad del CDDP podría conducir al reemplazamiento total del mismo por carboplatino, un derivado virtualmente no nefrotóxico y con una actividad similar, si bien al coste de un mayor gasto económico y de una más intensa mielosupresión (170). En otro sentido, una nefroprotección eficaz frente al CDDP podría deducirse de un conocimiento más profundo de los mecanismos de resistencia celular a este fármaco, lo cual está probablemente lejano en la actualidad (31,171,172). En este contexto, continúa siendo un fértil campo de investigación la busca de fármacos moduladores de la nefropatía por CDDP (16,135,149,173,174).

Los resultados de los múltiples fármacos supuestamente útiles como quimioprotectores han sido diversos aunque en su mayoría poco esclarecedores. Se ha generado así una cierta confusión que ha llevado a algunos autores a un escepticismo irónico sobre los avances en este campo (154). En nuestra opinión, el factor que mejor explica esta situación es la disociación entre los datos experimentales y los ensayos clínicos.

A veces una sustancia se ha incorporado a la práctica clínica, incluso existiendo dudas sobre su eficacia a nivel experimental. Así, aunque una diuresis profusa se ha venido aceptando como el principal método para controlar la nefrotoxicidad del CDDP en clínica (87,127), el verdadero mecanismo de acción de una sueroterapia abundante con salino isotónico no se ha podido establecer, y podría ir desde simplemente imponer mayor dificultad "mecánica" al contacto del túbulo renal con el CDDP por la dilución de éste (6,87), hasta suscitar una modificación molecular

del CDDP para transformarlo en metabolitos menos tóxicos (19), pasando por un posible efecto vasodilatador renal por inhibición de la angiotensina (108). Respecto del suero salino hipertónico como vehículo del CDDP, que fue defendido ampliamente para su utilización rutinaria con muy altas dosis de CDDP (80,130), al menos podemos afirmar que existen serias dudas sobre su contribución al alivio de la nefrotoxicidad por esta droga (131), si bien siguen proponiéndose mecanismos de acción específicos, como la estimulación de la producción endógena de péptido natriurético atrial, quizás dotado de efectos nefroprotectores frente al CDDP (175). Más aún, respecto de agentes diuréticos muy difundidos, como la furosemida o el manitol, a nivel experimental no existe evidencia incuestionable de que sean beneficiosos (19,82,83,126-128). Para otros fármacos nefroprotectores subsisten lagunas similares en el plano experimental; tal sucede con el mesna (139,140,176), y con el verapamil, al cual unos autores atribuyen una acción nefroprotectora (177) en contraste con otros que han observado incluso un empeoramiento de la función renal en el curso de experimentos con CDDP en ratas (164).

Otras veces se ha empleado una sustancia en el humano, sin apenas una mínima base experimental, sino solamente con unas escasas nociones de farmacocinética en el animal, como ha sucedido con la cimetidina (44,134). De este fármaco se sabía que era capaz de inhibir el sistema de secreción tubular para cationes orgánicos (178-180) y ello le prometía cierto valor como agente nefroprotector frente al CDDP (44), motivo por el que fue ensayada en humanos portadores de neoplasias altamente curables (134), pero sin que en la literatura existiesen estudios que refrendasen tal supuesta nefroprotección a nivel experimental. Ni la dosificación de la cimetidina ni su seguridad, en el sentido de que no interfiriese con la actividad antineoplásica del CDDP, se habían establecido con seguridad. Posteriormente, la investigación con este fármaco ha vuelto al terreno puramente experimental, bien que fragmentario (166). Análogamente, los corticoides se ensayaron clínicamente en 1988 como nefroprotectores frente al CDDP, sobre la hipótesis de que pueden actuar como estabilizantes de las membranas lisosomales en el interior de las células tubulares (116), pero sin existir en la bibliografía previa ninguna base experimental para esta indicación; habrán de pasar 4 años para que surjan trabajos que intenten demostrar **experimentalmente** la eficacia y seguridad de este procedimiento (181,182), así como la posible existencia de mecanismos de acción alternativos como la sobre/expresión de metalotioneína (30).

También hemos asistido a polémicas y contradicciones sobre temas especialmente serios como la conservación de la actividad antitumoral del CDDP o la toxicidad intrínseca de los fármacos nefromoduladores. Como ejemplo, la fosfomicina parecía comportarse como agente nefroprotector en modelos experimentales (183-185), y directamente pasó a ensayarse en el humano (116,186). No obstante, con posterioridad se alertó de que la combinación de fosfomicina con CDDP podía aminorar la actividad antitumoral del último (120); y aunque más recientemente se ha descartado esta posibilidad en líneas celulares procedentes de osteosarcoma humano (187), hubiera sido preferible disponer de estos últimos datos antes de abrir un ensayo clínico. Esta consideración adquiere especial relevancia en el caso de compuestos que actúan como nefroprotectores mediante una modificación de la molécula de CDDP (19,136), pues ello entraña el riesgo de inhibir tanto la toxicidad del CDDP como su actividad antitumoral, como se ha señalado con respecto al salino hipertónico y a algunas sustancias como el mesna y el tiosulfato (120,188,189). Por último, recalamos que algunos nefroprotectores pueden añadir una toxicidad no despreciable al tratamiento quimioterápico; así el verapamil, que se empleó en clínica antes de contar con alguna base experimental (134), además de ser ésta objeto de controversia ulteriormente (164,177), ha generado dudas experimentales sobre una excesiva toxicidad (por otra parte no explicitada) al combinarse con CDDP (190).

### 3. HIPOTESIS TERAPEUTICA

Acerca de la fisiopatología del daño renal inducido por CDDP, está bien establecido que contribuyen factores glomerulares -posiblemente una constricción arteriolar mediada por angiotensina II, en todo caso sin expresión morfológica-, y que paralelamente se desencadena una necrosis tubular aguda severa, verosímilmente por lesión directa de las células de los túbulos renales, aunque la patogenia de ese daño permanezca ignota (10,81,87,90,92,97,105,108,134). Hasta la fecha la hidratación abundante del paciente ha sido el principal método para el control de la toxicidad glomerular (19,87,108).

Se sabe también que, aunque la mayor parte del CDDP que accede al riñón es excretado por filtración glomerular, el fármaco experimenta también procesos de secreción y reabsorción tubular, mediados por mecanismos enzimáticos de trans-

porte transmembrana (42-46). Uno de ellos es el sistema transportador de cationes orgánicos que puede inhibirse competitivamente, entre otros productos, con cimetidina (44). Se ha propuesto que la cimetidina podría disminuir el aclaramiento renal del CDDP (166) y, por tanto, aminorar la acción tubulotóxica de aquél, aunque en este terreno los ensayos clínicos han sustituido por completo a la experimentación animal (134).

Una vez en el interior de la célula renal, análogamente a otros agentes nefrotóxicos como los aminoglucósidos, el CDDP podría desestabilizar las membranas lisosomiales, liberando enzimas autolíticas. Se han propuesto la fosfomicina y los esteroides como agentes bloqueantes de dicha acción (116,120,183-186), aunque para ambos compuestos caben dudas acerca de su real utilidad y acerca de sus mecanismos de acción (30,63,81,82,187). Creemos que retiene cierto interés la investigación sobre estos fármacos, hipotéticamente capaces de modular una toxicidad celular de patogenia indeterminada.

Proponemos un estudio integral que evalúe la eficacia y seguridad de la Cimetidina, la Fosfomicina y la Metilprednisolona como moduladores de la tubulopatía tóxica inducida por CDDP. Para ello, se empleará primero uno de los diversos modelos experimentales de NTA por CDDP (10,110,191), cual es la rata Wistar tratada con CDDP por vía intraperitoneal. En segundo lugar, emplearemos el modelo experimental de linfoma experimental L5178Y implantado subcutáneamente en el ratón DBA<sub>2</sub> (192,193), para estudiar la actividad del CDDP frente al mismo. Si, como esperamos, el CDDP se muestra activo frente a este modelo, que permite evaluar no sólo la supervivencia de los animales sino el tamaño de las masas tumorales que portan, este modelo sería un buen banco de pruebas para comprobar que la actividad antitumoral del CDDP no se verá menoscabada por las sustancias nefro-protectoras. Por último, el o los fármacos considerados útiles y seguros, serán sometidos a un ensayo clínico prospectivo, comparativo y aleatorizado, para comprobar sus efectos sobre la hipomagnesemia inducida por CDDP en el enfermo oncológico.

Los ensayos serán llevados a cabo de forma secuencial por motivos técnicos, materiales y humanos. Por consiguiente, los resultados de un estudio pueden condicionar notablemente el planteamiento de los estudios sucesivos. La originalidad de esta metodología estriba fundamentalmente en la premisa de que ninguna sustancia teóricamente nefroprotectora debería testarse en el humano antes de comprobar su

eficacia y seguridad en modelos experimentales. Fieles a esta filosofía, el o los fármacos que no exhiban propiedades ventajosas en una etapa cualquiera del análisis, no será sometido a investigación en las etapas sucesivas. Específicamente se busca con ello no someter a ningún paciente a tratamientos sin visos de eficacia o capaces de interferir con la actividad antitumoral de la quimioterapia.

#### 4. OBJETIVOS

**PRIMERO-**. Comprobar, en un modelo experimental de nefropatía tóxica por CDDP en la rata Wistar, si las combinaciones del Cisplatino con otras sustancias, en concreto con suero salino isotónico, Cimetidina, Fosfomicina y Metilprednisolona, ejercen acciones protectoras frente a la tubulopatía tóxica por el citostático.

**SEGUNDO-**. Valorar la repercusión que, sobre los niveles plasmáticos de platino, puedan tener dichas sustancias hipotéticamente nefroprotectoras.

**TERCERO-**. Estudiar la actividad antitumoral del Cisplatino frente al linfoma L5178Y implantado subcutáneamente en el ratón DBA/2.

**CUARTO-**. Determinar si los agentes que sean identificados como protectores de la rata Wistar frente a la nefropatía por CDDP, respetan asimismo la actividad citotóxica de éste sobre el linfoma L5178Y implantado en ratón DBA/2.

**QUINTO-**. Analizar el poder protector de aquellos fármacos en la tubulopatía tóxica inducida por CDDP en el humano, mediante ensayo clínico controlado y prospectivo que demuestre su capacidad de paliar la hipomagnesemia, expresión de la tubulopatía tóxica por Cisplatino.

# **IV. MATERIALES Y METODOS**

## MATERIALES Y METODOLOGIA

### 1. ESTUDIO EXPERIMENTAL DE VARIOS NEFROPROTECTORES

#### 1.1. Cambios de la $DL_{100}$ de CDDP en rata Wistar.

##### 1.1.1. Fundamento

Existen varios modelos experimentales de nefrotoxicidad letal por dosis únicas o repetidas de Cisplatino (CDDP), tanto en animales como en cultivos celulares (10,194). Por razones de disponibilidad, reproductibilidad y bajo nivel de exigencias experimentales, seleccionamos el modelo de nefropatía aguda letal por dosis única de CDDP por vía intraperitoneal en la rata Wistar (110,191,195). Este modelo reproduce estados agudos de uremia con expresión histopatológica de NTA, cuya frecuencia y severidad es dosis/dependiente (110,195). No existe pleno acuerdo sobre las dosis necesarias para inducir una determinada mortalidad, pero datos previos de la literatura (36,136,190) y de nuestro grupo de investigación (176) nos llevan a seleccionar una dosis única de CDDP de 20 mg/Kg diluïdos en agua destilada y administrado por vía intraperitoneal (i.p.) como dosis  $DL_{100}$ , es decir la que provoca el fallecimiento de virtualmente el 100% de las ratas Wistar a lo largo de los 8 días siguientes a la aplicación del CDDP. El examen postmortem de estos animales sólo demuestra una dilatación gástrica importante y una severa nefropatía, con adelgazamiento e isquemia del córtex, junto a amplias zonas de infarto hemorrágico en la región yuxtacortical y medular; subyacen en el estudio por microscopía óptica una isquemia cortical sin lesiones vasculares ni glomerulares, y una necrosis tubular de predominio proximal (10,17,81).

Se dispondría de varias cohortes de ratas, en condiciones experimentales adecuadas, de forma que cada grupo representaba un ensayo acerca de los efectos sobre el riñón de ciertas sustancias tóxicas y nefroprotectoras. La mayoría de los animales recibirá CDDP a la  $DL_{100}$  en la mañana del "día 0", y en lo sucesivo serán mantenidos en condiciones ambientales apropiadas y se les valorará diariamente para establecer sus curvas de supervivencia. Algunas cohortes recibieron, en combinación con el CDDP, diversos agentes supuestamente nefroprotectores. Hemos partido de la hipótesis de que cualquiera de estos agentes debiera ser capaz de reducir la mortalidad asociada a la  $DL_{100}$  de CDDP, asociándose a curvas de supervivencia claramente discernibles de las que conlleva el CDDP a la  $DL_{100}$  en solitario.

### 1.1.2. Modelo experimental

Se emplearon ratas Wistar hembra, de 6 a 7 semanas de vida, con pesos que oscilaban entre 180 y 220 gramos, según se determinó con una misma balanza electrónica. Cada rata era identificada mediante marcas efectuadas en la cola con rotulador indeleble. Las ratas fueron tratadas con distintos fármacos por vía intraperitoneal, sin anestesia previa, a través de punciones repetidas en línea media abdominal, para lo cual dispusimos de agujas y jeringuillas de tamaños apropiados a los volúmenes a inyectar. Los animales fueron alojados en cajas de plástico, en grupos de cinco, bajo condiciones lumínicas y térmicas equiparables y estables en todos los experimentos. Todos gozaron de libre acceso a recipientes conteniendo pienso comercial sólido y a tanques de agua para garantizar una ingesta *ad libitum*.

El tratamiento correspondiente se inició en la misma mañana de un día arbitrariamente llamado "día 0". En cualquier caso, tanto si los animales no requerían dosis adicionales como si recibían ulterior medicación experimental, las cajas de plástico que los alojaban fueron observadas dos veces diariamente en los días sucesivos. Así se vigiló la estabilidad de las condiciones ambientales y se registraron los fallecimientos. Las ratas muertas eran retiradas para evitar interferencias conductuales en las que aún permanecían vivas y para efectuar estudios necrópsicos.

### 1.1.3. Tratamiento farmacológico

Todos los procedimientos terapéuticos fueron administrados por vía i.p., pues en todo caso se emplearon moléculas de bajo peso molecular con una farmacocinética apropiada para los objetivos del estudio (20,39,196,197). Se emplearon agua destilada, suero salino isotónico (ClNa 0,9%) y dextrosa 5% como líquidos reconstituyentes (todos ellos manufacturados por Laboratorios Grifols, para su empleo rutinario en hospitales españoles). Algunas ratas se trataron exclusivamente con agua destilada para comprobar que el procedimiento en sí no revestía riesgos para la salud de los animales, en concreto para descartar la concurrencia de factores mecánicos o infecciosos que pudieran invalidar los estudios de nefroprotección propiamente dicha. Un pequeño número de animales fue expuesto a Carboplatino, un agente escasamente nefrotóxico (170,198,199), para reducir al mínimo el riesgo de

que surgiesen toxicidades extrarrenales severas como consecuencia de una especial sensibilidad de nuestros animales de experimentación a compuestos de platino. El Carboplatino era suministrado en viales con 150 mg de compuesto liofilizado (PARAPLATIN<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb); se reconstituía con dextrosa al 5% en una dilución de 3 mg/ml, y se empleó la dosis de 60 mg/Kg, mediante dosis i.p. única.

Una gran mayoría de los animales fue tratada con Cisplatino (CDDP), siempre a dosis de 20 mg/Kg, por una dosis única. Este fármaco se extraía de viales conteniendo 10 ó 50 mg de producto liofilizado (NEOPLATIN<sup>®</sup>, Laboratorios Bristol-Myers Squibb), y se reconstituía, en función del experimento a efectuar, con agua destilada o con suero salino isotónico a la dilución de 1 mg/cc.

Los fármacos que se testaron como supuestos agentes protectores frente a la tubulopatía tóxica por CDDP fueron la Cimetidina, la Fosfomicina y la Metilprednisolona. Elegimos dosis previamente sugeridas como atóxicas en el caso de la Cimetidina (44) y de la Fosfomicina (116,120,185); las dosis de Metilprednisolona se eligieron por aproximación a dosis útiles en ensayos clínicos para el control de la nefrotoxicidad (116) o de otras toxicidades como la emesis por CDDP (200), al no existir datos experimentales con anterioridad a esta Tesis. Por mayor seguridad, varias ratas serían tratadas exclusivamente con estos agentes para comprobar que no aparecían toxicidades específicas que dificultasen el análisis de la mortalidad atribuible al CDDP. Los tratamientos experimentales, en general, se prolongaron durante varios días, intentando contrarrestar la fijación duradera del CDDP al tejido renal (22,41,201).

La Cimetidina se seleccionó por su capacidad para inhibir el sistema de secreción tubular para cationes orgánicos (44,166), y sobre la base de ensayos clínicos preliminares (134) que sugerían un papel nefroprotector para esta sustancia. Se ensayaron varias pautas de administración, que aparecen detallados en la **Tabla IV**. La Cimetidina se extrajo de ampollas de 2 cc conteniendo 200 mg de producto activo (TAGAMET<sup>®</sup>, Laboratorios SKF), inyectándose las cantidades requeridas por cada rata sin dilución adicional.

La Fosfomicina se seleccionó por su papel nefroprotector frente al CDDP en varios modelos experimentales (183-185), y porque ya se había empleado en clínica (116,186). Se emplearon dos niveles de dosis, siempre en combinación con CDDP (20 mg/Kg el día 0):

- FOS 1: 40 mg/Kg cada 12 horas, los días 0, +1 y +2.
- FOS 2: 200 mg/Kg cada 12 horas, los mismos días 0 a +2.

Empleamos Fosfomicina procedente de viales comerciales conteniendo 1 g de producto activo (FOSFOCINA *Intramuscular*<sup>R</sup>, Laboratorios CEPA), que se reconstituían con 10 cc de agua destilada, de manera que las dosis correspondientes de Fosfomicina se derivaron de una concentración previa de 100 mg/ml.

La Metilprednisolona se probaría por haber sido ya estudiada en ensayos clínicos (116), aunque no se han reportado bases experimentales hasta varios años después (181,182). Las dosificaciones utilizadas fueron:

- MTP 1: Metilprednisolona 1 mg/Kg/día, en dosis i.p. única, los días 0, +1 y +2.
- MTP 2: El mismo fármaco a 30 mg/Kg/día, durante los mismos días 0 a +2.

**TABLA IV. PAUTAS DE CIMETIDINA USADAS EN RATA WISTAR, COMBINADAS CON CDDP: 20 mg/Kg**

|        |   |
|--------|---|
| CMT 1: | 300 mg/Kg en dosis ip. única el día 0, dos horas antes del CDDP   |
| CMT 2: | 50 mg/Kg/día, por 3 dosis, los días -1, 0 y +1  |
| CMT 3: | 100 mg/Kg/día, por 5 dosis consecutivas, los días -1, 0, +1, +2 y +3, ambos inclusive   |
| CMT 4: | 50 mg/Kg/día, de nuevo 5 dosis durante los mismos días -1 a +3  |
| CMT 5: | 200 mg/Kg/día, en dosis única dos horas antes del CDDP el día 0, seguidos de 50 mg/Kg/día, por 5 dosis, de los días +1 a +5 ambos inclusive |

La Metilprednisolona se extrajo de viales liofilizados comerciales (SOLU-MODERIN<sup>R</sup>, Laboratorios Upjohn), conteniendo 40 mg de producto base, que eran disueltos en agua destilada; se desestimó el agua estéril para inyección que se adjunta adjunta con el vial por su contenido en un 0,9% de alcohol bencílico. La dilución fue de 50 mg/ml.

#### 1.1.4. GRUPOS TERAPEUTICOS

Doscientas setenta ratas hembra fueron distribuidas al azar y consecutivamente en cohortes definidas por el tratamiento a ensayar:

**Ensayo 1.** - Grupo Control: 10 ratas a las que se infundió por vía i.p. sólo agua destilada en volumen de 20 ml/Kg.

- Grupo JM8: 10 ratas tratadas con Carboplatino i.p. a la dosis de 60 mg/Kg diluido en dextrosa 5%, a razón de 3 mg/ml.
- Grupo CDDP: 20 ratas tratadas con CDDP i.p. a la dosis de 20 mg/kg reconstituido en agua destilada (dilución de 1 mg/ml).

**Ensayo 2.** - Grupo CDDPa: 20 ratas tratadas con CDDP i.p. (20 mg/Kg) vehiculado en agua destilada (1 mg/ml).

- Grupo CDDPs: 20 ratas tratadas con igual dosis de CDDP diluido en la misma proporción, pero no en agua destilada sino en suero salino isotónico (CINa 0,9%).

**Ensayo 3.** 30 ratas, 10 tratadas con Cimetidina (300 mg/Kg/día por dos días consecutivos en dosis única), 10 tratadas con Fosfomicina (200 mg/Kg cada 12 horas por 3 días), y 10 tratadas con Metilprednisolona (30 mg/Kg/día por 3 días consecutivos).

**Ensayo 4.** - Grupo Control: 10 ratas sometidas a CDDP i.p.: 20 mg/Kg, disuelto en suero salino fisiológico, a razón de 1 mg/ml.

- Grupo CMT 1: 20 ratas tratadas con la misma pauta de CDDP, y además con Cimetidina: bolus de 300 mg/Kg en dosis i.p. única, dos horas antes del CDDP el día 0.

EN LOS ENSAYOS 5 Y SUCESIVOS, todos los animales recibieron CDDP el día 0 como se indica en el Grupo Control del Ensayo 3, bien de forma exclusiva (en el caso de que formasen parte, como fue lo usual, grupos control), bien en combinación con la sustancia nefroprotectora a estudio.

**Ensayo 5.** - Grupo CMT 2: 10 ratas tratadas con CDDP como ya se ha expuesto; y con Cimetidina, 50 mg/Kg/día, en dosis i.p. única, por tres días consecutivos, los días -1, 0 y +1.

- Grupo CMT 3: 10 ratas sometidas al CDDP del mismo modo; y tratadas además con Cimetidina i.p., 100 mg/Kg/día, en inyección única los días -1, 0 y +1.
- Grupo CMT 4: 10 ratas expuestas a CDDP el día 0, y a Cimetidina i.p., 50 mg/Kg/día, por 5 dosis únicas extendidas consecutivamente del día -1 al día +3.

**Ensayo 6.** - Grupo Control: 10 ratas tratadas sólo con CDDP según el esquema ya repetido.

- Grupo CMT 5: 20 ratas tratadas con CDDP de igual manera; y además tratadas con Cimetidina i.p., con un bolus de 300 mg/Kg el día 0, dos horas antes del CDDP, y después con 50 mg/Kg/día, durante los días +1 a +5 del estudio.

**Ensayo 7.** - Grupo Control: 10 ratas tratadas sólo con CDDP reconstituído en suero salino isotónico, como ya se ha descrito.

- Grupo FOS 1: 10 ratas expuestas a CDDP de la misma forma, y además receptoras de Fosfomicina i.p. a la dosis de 40 mg/Kg cada 12 horas, a lo largo de los días 0, +1 y +2 (6 dosis en total).
- Grupo FOS 2: 10 ratas tratadas análogamente, pero con Fosfomicina i.p. a la dosis de 200 mg/Kg cada 12 horas, también los días 0 a +2 (6 dosis)

**Ensayo 8.** - Grupo Control: 10 animales que reciben sólo CDDP, vehiculado en suero fisiológico.

- Grupo MTP 1: 10 ratas que, además del CDDP, son tratadas con Metilprednisolona i.p., a dosis de 1 mg/Kg/día, en dosis matutina única, en los días 0, +1 y +2.
- Grupo MTP 2: 10 ratas expuestas a CDDP en igual modo, y al corticoide i.p., 3 mg/Kg/día, también en dosis única diaria, los mismos días 0, +1 y +2.

## 1.2. Estudio funcional e histopatológico de la rata Wistar tratada con DL<sub>50</sub> de Cisplatino

### 1.2.1 Fundamento

Para analizar las repercusiones bioquímicas y morfológicas del CDDP, solo o combinado con los fármacos que exhibiesen algún efecto nefroprotector, se emplearían ratas sacrificadas *ex-profeso* el día 5º. Una dosis similar a la DL<sub>100</sub> sería inadecuada para este propósito, pues morirían demasiados animales en los intervalos de no observación de sus habitáculos, y en ellos podrían existir cambios postmortem no directamente achacables a los fármacos bajo experimentación. Seleccionamos por ello una dosis capaz de inducir reconocidamente nefrotóxica, pero que permitiese disponer de algunas ratas vivas y sacrificables hacia el 5º día de observación; por datos previos de la literatura (17,158,176,188,204) elegimos una dosis de CDDP próxima a la DL<sub>50</sub>, en concreto 7 mg/Kg.

### 1.2.2. Grupos de estudio

Se repartieron 40 ratas Wistar hembra, de edad y peso similares a las ya descritas, entre 4 grupos terapéuticos con el fin de estudiar las repercusiones funcionales e histológicas de una dosis única de CDDP. Todos los animales recibieron una dosis de 7 mg/Kg, diluída en suero salino isotónico a razón de 1 mg/ml, por vía i.p., como la injuria tóxica frente a la que testar el poder de los fármacos que previamente, en el estudio de mortalidad inducido por la DL<sub>100</sub>, no se hubiesen mostrado claramente ineficaces.

Cada grupo terapéutico constaba de 10 ratas. Diez de ellas fueron tratadas exclusivamente con CDDP el día 0, en la forma ya comentada. Las 30 ratas restantes, además de CDDP en la misma forma, recibieron una de las siguientes pautas:

CMT: Diez ratas que recibieron Cimetidina según protocolo CMT 5 previamente descrito: 200 mg/Kg en dosis i.p. única dos horas antes del CDDP el día 0, seguidos de 50 mg/Kg/día, por 5 dosis, los días +1 a +5, ambos inclusive.

FOS: Diez ratas tratadas con Fosfomicina, según esquema FOS 1: 40 mg/Kg i.p. cada 12 horas, por 6 dosis totales, administradas los días 0, +1 y +2 del experimento.

MTP: Diez animales tratados con Metilprednisolona según esquema ya referido, que recordamos aquí: 1 mg/Kg/día, los mismos días 0, +1 y +2.

Los fármacos se obtuvieron de las mismas fuentes y se emplearon con las mismas diluciones que ya se han explicitado. El marcaje y tratamiento de los animales se efectuó con materiales y en condiciones idénticas a las ya referidas. La alimentación y alojamiento de los animales se mantuvo con las mismas características de idoneidad que en los ensayos con DL<sub>100</sub>. Los animales que fallecieron en el período de días +1 a +4 no fueron objeto de estudio, pues al no poder determinarse con exactitud el momento del fallecimiento, no se podría descartar la interferencia de fenómenos postmortem no directamente relacionados con la toxicidad del CDDP o con los efectos de las sustancias bajo estudio. Las ratas que permanecían vivas en el día +5 fueron sacrificadas, para proceder al estudio bioquímico de su sangre y al estudio histológico de sus riñones. Se fijó esta fecha porque en torno a ella se han descrito las anomalías morfofuncionales más acusadas (10,17,145,205).

### 1.2.3. Métodos bioquímicos e histológicos

Los animales aún vivos el día +5 eran pesados. El cociente peso inicial/peso final en gramos se tomó como estimación física de la poliuria y desvitalización inducida por el CDDP (108,151). A continuación eran anestesiados mediante inmersión en una cámara de vidrio con atmósfera saturada en éter. Inmediatamente después se les efectuaba una laparotomía media. Mediante punción transdiafragmática del ventrículo izquierdo se extraían muestras de 3 a 5 c.c. de sangre, que se introducían en tubos heparinizados y eran centrifugadas a 1.000 g, a 4° C, durante 10 minutos, para separar los elementos formes.

Alicuotas de 0,5-1,5 ml de plasma servían para determinaciones de urea y creatinina, que se efectuaban con un autoanalyzer Technicon RA-1000. No se contempló la realización de determinaciones de magnesio y potasio, pues dado el elevado hematócrito fisiológico de la rata, que se acentúa en condiciones de poliuria severa, es muy frecuente que la sangre se hemolice durante la extracción, y bajo tales condiciones experimentales, las cifras séricas de magnesio y de potasio carecen de fiabilidad. Alícuotas de 0,5-1,0 ml de plasma se congelaron a  $-80^{\circ}$  C, hasta ser analizadas para determinar la concentración de platino (206). Sólo se efectuaría la determinación de niveles de platino circulante en los sueros extraídos de animales tratados con el/los fármacos que demostrasen cierto papel nefroprotector. El método fue la espectrofotometría de absorción atómica, con un equipo marca Perkin Elmer Zeeman/3030. Los resultados se expresaron en microgramos/ml, tras haber calculado el área pico de cada muestra, que fue medida en absorbancia por segundo.

En un segundo tiempo se practicaba una nefrectomía bilateral, y finalmente se provocaba su muerte por asistolia. Los riñones quedaban fijados en medio de Bonin alcohólico (líquido de Duboscq-Brasil) y, previa inclusión en parafina, se obtenían cortes histológicos para microscopía óptica, efectuándose tinciones con Hematoxilina-Eosina, con Tricrómico de Masson y con Azul de Toluidina en caso de cortes semifinos. No se efectuaron estudios ultraestructurales. Los cambios histológicos se graduaron conforme a una escala cualitativa ordinal de 5 niveles; los niveles I a IV se definieron de acuerdo con Kempf y cols (207), y añadimos un nivel V correspondiente a la muerte tóxica previa a la fecha del sacrificio, asumiendo que tales ratas sufrieron una nefropatía de mayor severidad independientemente de su correlato morfológico. Los mencionados niveles se definen como:

- Nivel I: ausencia de cambios histológicos
- Nivel II: cambios mínimos (**Tabla V**)
- Nivel III: lesiones intermedias (**Tabla VI**)
- Nivel IV: lesiones severas (**Tabla VII**)
- Nivel V: muerte tóxica.

Las **Figuras 4 a 9** sirven para ilustrar las características morfológicas de cada uno de los niveles lesionales descritos.

**TABLA V. Nivel II (CORRESPONDE A LESIONES MINIMAS)**

---

- \* Túbulos normales, o bien con un epitelio algo aplanado o con leve degeneración vacuolar
  - \* Ligero edema o congestión del intersticio
  - \* Infiltración linfocitaria focal discreta
  - \* Ausencia de dilatación tubular y de atipias nucleares
- 

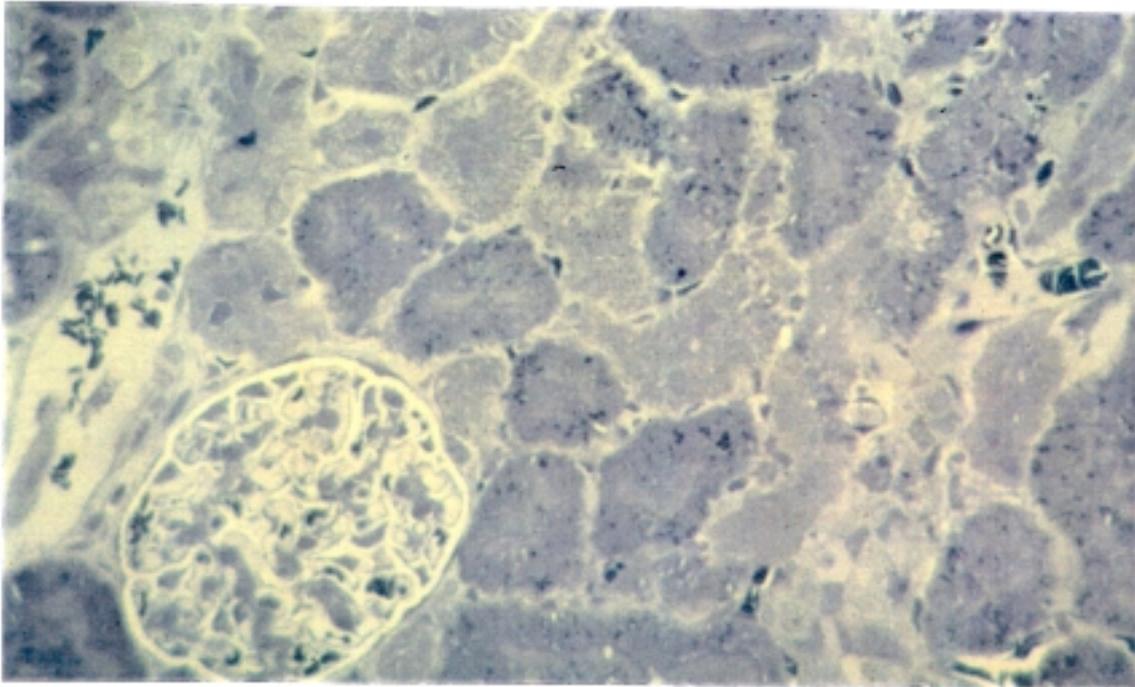
**TABLA VI. Nivel III (LESIONES INTERMEDIAS)**

- |   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>* Necrosis focal y epitelio tubular aplanado con degeneración vacuolar</li><li>* Dilatación moderada de la luz tubular</li><li>* Intersticio algo edematoso con infiltración linfocitaria focal</li><li>* Ausencia de atipias nucleares</li></ul> |
|---|

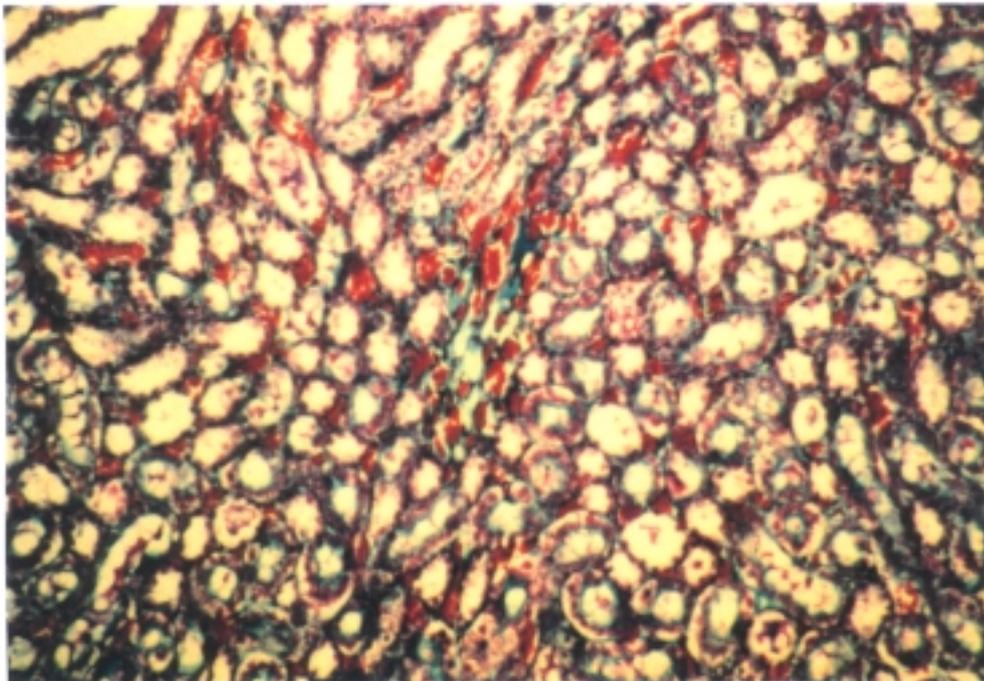
**TABLA VII. Nivel IV (LESIONES SEVERAS)**

---

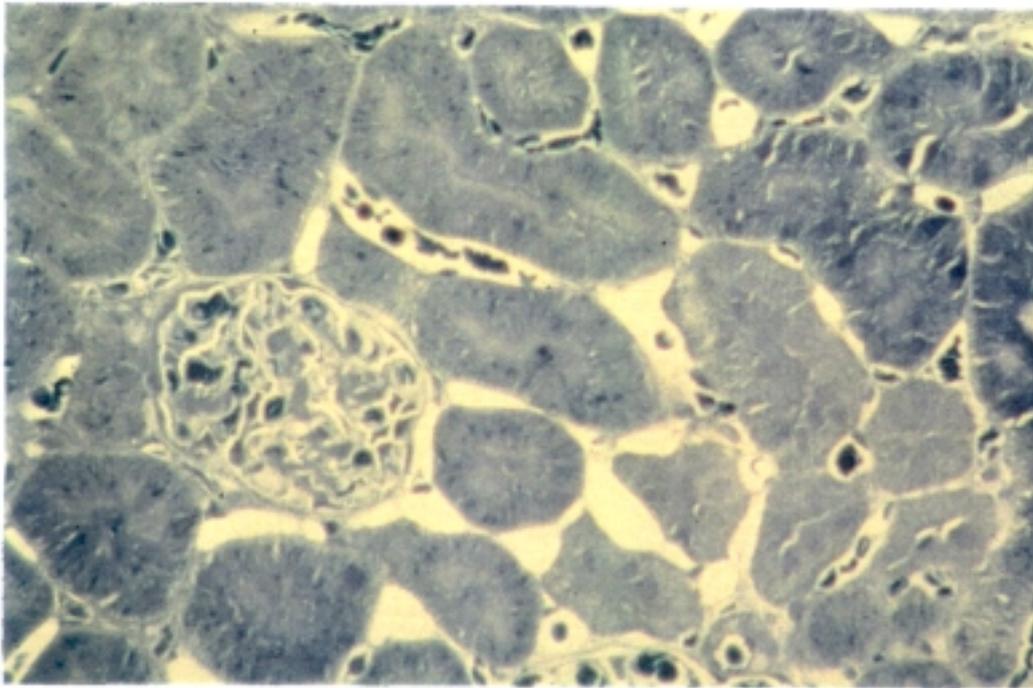
- \* Necrosis focal y epitelio tubular aplanado
  - \* Dilatación masiva de la luz tubular con células epiteliales necróticas
  - \* Intersticio muy edematoso con infiltración linfocitaria focal
  - \* Signos regenerativos
-



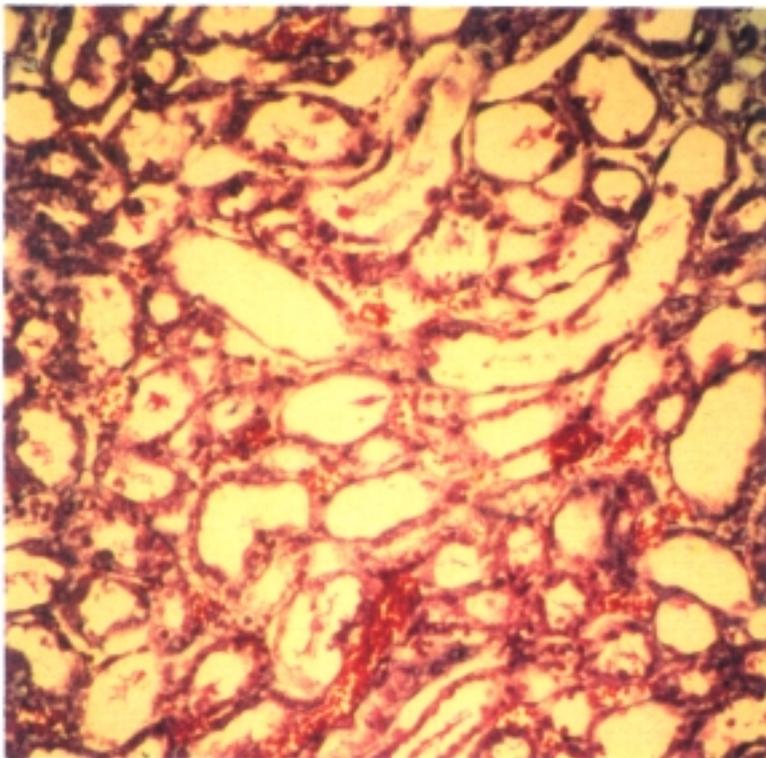
**FIGURA 4. Nivel I:** Ausencia de alteraciones histológicas. Corte semifino. Azul de Toluidina (200 x)



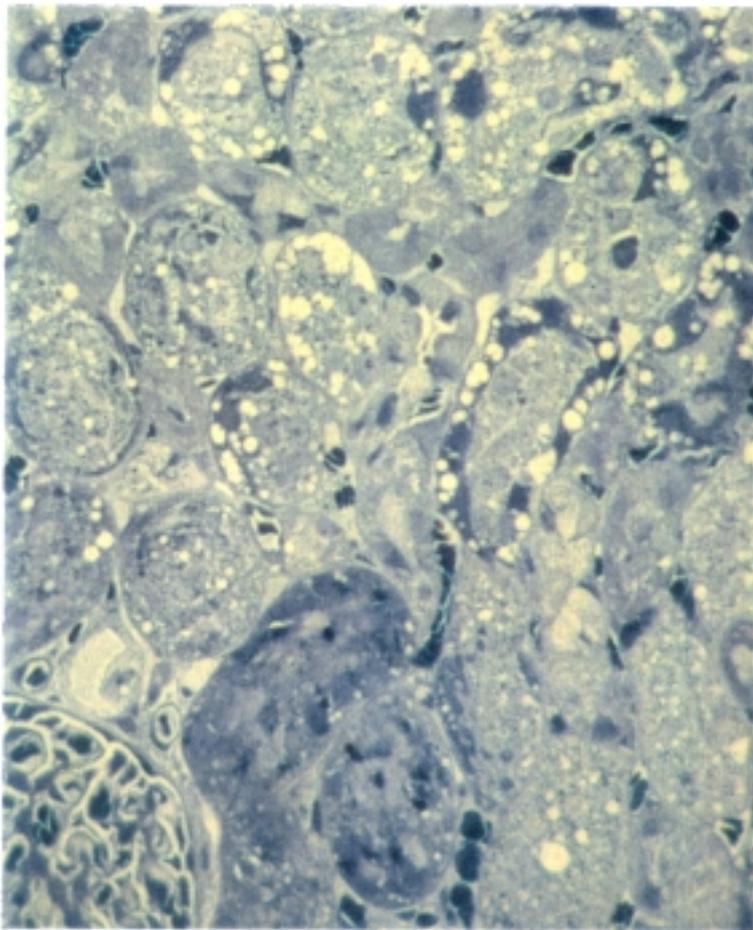
**FIGURA 5. Nivel II:** Congestión vascular intersticial. Tricrómico de Masson (125x)



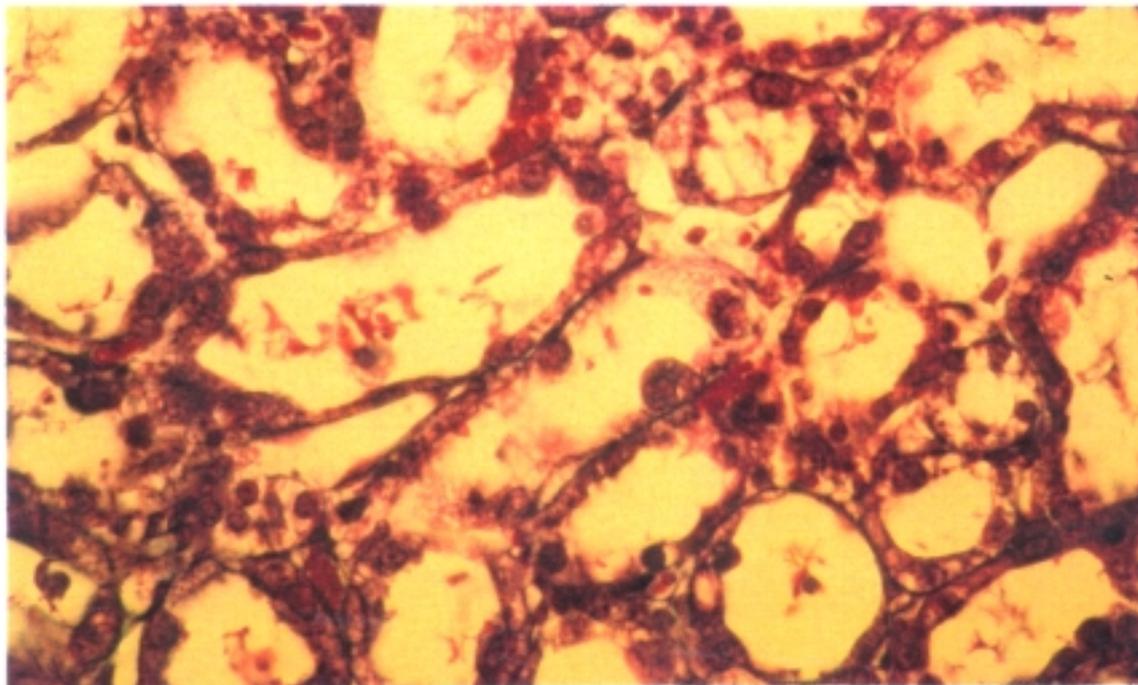
**FIGURA 6. Nivel II:** Edema intersticial. Túbulos sin alteraciones. Corte semifino. Azul de Toluidina (200 x)



**FIGURA 7. Nivel III:** Túbulos con luces dilatadas y epitelio aplanado. H-E (125 x)



**FIGURA 8. Nivel IV.** Necrosis del epitelio tubular con presencia de detritus celulares en las luces de los túbulos. Corte semifino. Azul de Toluidina (200x)



**FIGURA 9. Nivel IV:** Túbulos con epitelio denudado y claros signos de regeneración epitelial. HE (310 x)

## **2. ENSAYOS CON LINFOMA L5178Y IMPLANTADO EN RATON DBA/2.**

### **2.1. MODELO EXPERIMENTAL**

El CDDP se ha mostrado activo frente a muy diversas neoplasias experimentales leucémicas (18,136), también implantadas en la cavidad peritoneal (206), o bien inoculadas por vía intramuscular o subcutánea (189). Estos modelos han servido no sólo para determinar el interés del CDDP en terapéutica humana, sino también para calibrar interacciones farmacológicas que pudiesen aminorar el poder antitumoral del CDDP. Para el oncólogo médico, habituado a manejar la masa tumoral como un índice pronóstico y un criterio de respuesta a la quimioterapia, los modelos experimentales con tumores leucémicos o intraperitoneales presentan el inconveniente de la no mesurabilidad de las lesiones. Además, los tumores implantados por vía i.p., cuando también el CDDP se administra por vía i.p., ofrecen resultados no fácilmente extrapolables a la mayoría de los tumores humanos, a los que el fármaco se enfrenta sin una ventaja farmacocinética tan evidente. Por estos motivos, estudiamos el linfoma L5178Y implantado en ratones DBA/2, un modelo experimental de conducta bien descrita (192), implantado por vía subcutánea. Este tumor es fácilmente medible (209), y además permite una evaluación fidedigna de la actividad del CDDP administrado vía i.p. y no en las inmediaciones del tumor. Este modelo experimental se ha empleado en estudios inmunológicos (193), pero en nuestro conocimiento no se había descrito la actividad del CDDP frente al mismo.

El linfoma L5178Y es una neoplasia de células no cohesivas, establecida y mantenida en el ratón DBA/2 por pasaje ascítico. Sucesivamente, los ratones son inoculados por vía i.p. y portan el tumor durante 1 semana, en cuyo momento se efectúa el pasaje a un ratón previamente sano que actuará a partir de entonces como reservorio. Cuando se inoculan células tumorales en el tejido subcutáneo de un ratón sano, se inicia un crecimiento local en forma de pápula no necrótica, que es palpable y medible al cabo de 1 semana de observación. La lesión crece paralelamente a la desvitalización del animal, el cual fallece en un período variable entre los 20 y 60 días de observación, dependiendo de la cantidad de células viables en el inóculo. Unos 7 a 10 días antes de su muerte, es común que aparezcan adenopatías regionales que pueden ser medidas independientemente del tumor principal (Figuras 10 a 12). Este comportamiento regular, predecible y fácilmente mensurable hace de este modelo un apropiado campo de pruebas sobre actividad antitumoral, siendo factible el análisis de la supervivencia y también la evolución de la masa tumoral (136,188,206).

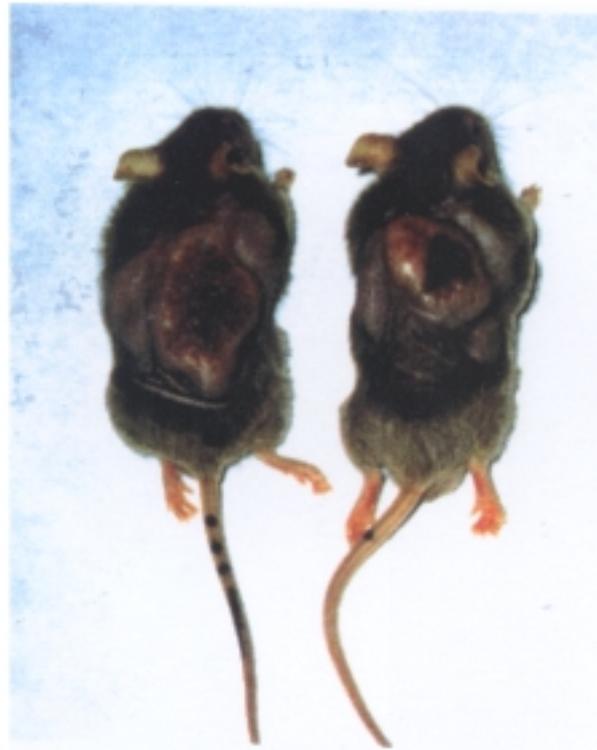
**FIGURA 10.** Ratones DBA/2 inoculados con  $4 \times 10^6$  células de linfoma L5178Y.  
Fotografía a los 9, 22 y 36 días del inóculo, de izda. a dcha. (x 1,25)



**FIGURA 11.** Ratón DBA/2 inoculado con  $10 \times 10^6$  células de L5178,  
a los 22 días de observación (x 4)

**FIGURA 12.** Ratones DBA/2. Portan linfomas L5178Y, 42 días después de un inóculo de  $10 \times 10^6$  células.

Véanse las adenopatías regionales, medibles distintamente de la masa principal.



## 2.2. METODO DE TRABAJO

El tumor se implantaba en ratones DBA/2 de 2 a 3 meses de edad, con unos 25 gramos de peso. En un primer estudio, en el "día 0" se les inocularon 0,1 ml de líquido ascítico conteniendo  $4 \times 10^6$  (cuatro millones) de células de linfoma L5178Y, según indicación de un citómetro Neubauer<sup>R</sup>, por medio de una inyección única en el tejido subcutáneo de la región del lomo. Se previó la posibilidad de requerir estudios adicionales con inóculos de  $10 \times 10^6$  (diez millones) de células tumorales. En el día +1 se les sometía a los tratamientos que más adelante se especifican. Para todas las inyecciones se emplearon agujas metálicas y jeringuillas de material plástico convencionales para insulino terapia. Posteriormente los ratones quedaban alojados en óptimas condiciones ambientales, con nutrición e hidratación *ad libitum* y eran sometidos a observación cada 2 días. Una vez que el tumor llegaba a ser palpable, se depilaba la zona correspondiente para facilitar las mediciones del tumor mediante un calibre (209).

La valoración cuantitativa de este modelo experimental se realizó conforme a los siguientes métodos:

1º) Elaboración de las curvas de supervivencia (probabilidad de supervivencia en función del tiempo de observación).

2º) Determinación del parámetro % T/C, que se define como el cociente entre la  $MST_t$  (supervivencia mediana de los ratones tratados con el fármaco) y la  $MST_c$  (supervivencia mediana de los ratones-control), expresado en porcentaje; este parámetro clásico se calcula considerando solamente los ratones que fallecen en el curso del seguimiento, y desestimándose además los ratones que fallecen durante los 7 primeros días del experimento, pues se trataba de evaluar el impacto pronóstico negativo debido al linfoma L5178Y, y no la mortalidad atribuible a la nefropatía por CDDP (210). Es usual considerar que un % TC superior a 125 indica actividad antitumoral probable, mientras un % TC superior a 150 indica actividad antitumoral segura.

3º) Cuantificación de la tasa de animales curados, esto es en remisión completa (ausencia de cualquier signo físico de tumor residual), mantenida más allá del día sexagésimo de observación.

4º) Medición seriada del área tumoral, definida como el producto de los diámetros perpendiculares de la pápula tumoral, expresado en  $cm^2$ . En el caso de que la lesión primaria llegare a acompañarse de adenopatías regionales (a menudo observables en una o ambas regiones axilares), el área tumoral incluiría sólo la del tumor primario exclusivamente, salvo que se produjese una aposición del tumor y de sus adenopatías que hiciera imposible su medición separada (ver **Figura 12**).

### 2.3. DESCRIPCION DE EXPERIMENTOS

Se emplearon 138 ratones DBA/2 para efectuar cinco ensayos consecutivos. El **Experimento 1** pretendía valorar la actividad del CDDP como agente único, frente al modelo ya comentado, y se trataron 15 ratones de las características ya descritas. Todos ellos fueron inoculados por vía s.c. el día 0 con  $4 \times 10^6$  células linfomatosas (cuatro millones) en suspensión en un volumen de 0,1 ml. Sólo 8 de los animales fueron tratados el día +1 con CDDP, en una dosis única de 10 mg/Kg por vía intraperitoneal, diluído en salino isotónico a la dilución de 0,5 mg/ml. Los siete ratones restantes servirían como control y recibieron el día +1 por vía i.p. sólo salino isotónico a volúmenes equiparables. Todos los ratones fueron observados diariamente para establecer las oportunas curvas de supervivencia y sus tumores se midieron los días 8, 18 y 34.

En previsión de que el inóculo de 4 millones de células no revistiese la suficiente agresividad como para estimar fehacientemente la actividad antitumoral del CDDP, se planificó un **Experimento n° 2**, con 14 ratones en un grupo control y otros

15 tratados con CDDP. El diseño sería idéntico al de la experiencia previa, pero en este caso el inóculo de células de L5178Y contendría  $10 \times 10^6$  células (diez millones de células tumorales). Las mediciones del área tumoral se efectuaron los días 10, 17 y 22.

Los ENSAYOS Nos. 3,4 y 5 se diseñaron para valorar el efecto de la administración concurrente de CDDP y Cimetidina (CMT) sobre la actividad antitumoral de aquél.

En el **Experimento 3**, cuatro ratones serían inoculados con 4 ó 10 millones de células tumorales de L5178Y por vía s.c. (según resultados de las experiencias anteriores) el día 0 y no recibirían más tratamientos; otros cinco ratones recibirían además CDDP a la dosis de 10 mg/Kg el día +1; y por último cinco animales más serían tratados con CDDP a la misma dosis y con CMT i.p. en forma de un bolus de 200 mg/Kg dos horas antes de la dosis de CDDP el día +1 y a continuación con 50 mg/Kg/ /día en dosis únicas administradas los días +2 a +6, ambos inclusive. La CMT se obtendría de ampollas comerciales de TAGAMET<sup>R</sup> (Laboratorios SKF). De nuevo, habría una observación diaria para establecer las curvas de supervivencia, y se programaron mediciones del área tumoral los días 10, 14 y 22.

El **cuarto experimento** repetiría el mismo diseño, ahora con 9 ratones en el grupo control, y 10 en cada uno de los grupos terapéuticos. Además, la dosis de CDDP se redujo a 9 mg/Kg, en una dosis única por vía i.p administrada el día +1 del estudio. Todos los demás parámetros experimentales se mantuvieron constantes. Se prefijaron los días 9, 15, 22, 29 y 36 para la medición de las masas tumorales.

Por último, se realizó un **Ensayo n° 5** confirmatorio, con el mismo diseño que el del Experimento 4 en términos de inóculo tumoral y dosis de fármacos, pero con el siguiente número de animales: 11 en el grupo control, 20 en el grupo tratado con CDDP solo, y otros 20 ratones tratados con CDDP y CMT. Además de la observación diaria de los animales, se determinó que en los días 9, 15, 22 y 36 se determinarían las áreas de los tumores que portasen.

Por la relativa homogeneidad de los Ensayos 3, 4 y 5, cuyo objetivo era determinar si la Cimetidina presenta riesgo de interferir con la actividad antitumoral del CDDP, y cuyos diseños y realización práctica se mantuvieron bajo condiciones muy equiparables, existió la previsión de efectuar un análisis adicional

conjunto por compilación de los resultados de los 3 estudios. El análisis de esta "agrupación" no se efectuaría conforme a las exigencias formales del metaanálisis y no sustituiría al análisis estadístico de los Ensayos 3, 4 y 5 por separado; pensamos practicarlo y exponerlo únicamente como un elemento adicional de reflexión, sobre la experiencia obtenida en el tratamiento de 94 ratones DBA/2 sometidos a similares condiciones de experimentación.

### **3. ENSAYO CLINICO CONTROLADO PROSPECTIVO**

#### **3.1. Justificación del ensayo**

El CDDP es un agente de fuerte poder nefro-tóxico, capaz de inducir cuadros de insuficiencia renal aguda y estados de disfunción tubular; los primeros se combaten en la actualidad con esquemas de hidratación vigorosa con o sin diuresis forzada, pero para los segundos no existe un tratamiento profiláctico de eficacia reconocida (87,113,138). Un gran número de pacientes tratados con CDDP experimentan algún grado de hipomagnesemia al cabo de varios ciclos de quimioterapia (97,211). Sin embargo, pocos estudios hasta la fecha han tratado de encontrar métodos profilácticos útiles frente a este fenómeno tóxico; casi todos ellos han valorado el efecto del aporte exógeno suplementario de magnesio (113,212-214), y sólo esporádicamente se ha estudiado el papel protector de un fármaco no citotóxico en combinación con el CDDP (138,215).

Se ha descrito que la Cimetidina puede proteger al humano de la tubulopatía tóxica por CDDP (44,134,166), aunque no existe suficiente base experimental para tal indicación terapéutica. A la luz de los resultados obtenidos en el modelo de nefropatía tóxica por CDDP en la rata Wistar, y de los resultados observados en el modelo de linfoma L5178Y implantado en el ratón DBA/2, pretendimos llevar a cabo un ensayo clínico controlado entre pacientes del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario San Carlos. Serían objeto de estudio aquellos pacientes necesitados de una quimioterapia basada en el CDDP, con un diseño aleatorizado y paralelo entre dos grupos, uno que sólo sería tratado con la quimioterapia correspondiente, y otro que recibiría Cimetidina además del CDDP. Se incluirán los enfermos que otorguen su consentimiento informado, según las guías de buena práctica clínica recomendadas en 1.990 para la Comunidad Económica Europea (216). Desde la aparición del único ensayo clínico que sobre el uso de Cimetidina en esta indicación se llevó a cabo en 1987 (134), de acuerdo con la revisión bibliográfica efectuada, no se ha publicado ningún trabajo similar.

### 3.2. Diseño del estudio

Los pacientes sometidos a cursos repetidos de CDDP a altas dosis desarrollan con gran frecuencia signos de tubulopatía tóxica, entre los que destaca la hipomagnesemia, junto con otros más secundarios como hipocalcemia, hiperuricemia e hipokaliemia (87,167). En gran medida, esta toxicidad es dosis/dependiente y puede estar acompañada o no de azoemia como expresión de insuficiencia renal (79). Se ha descrito que al cabo de 4 ciclos con CDDP a dosis de 100 mg/m<sup>2</sup>, casi el 90% de los pacientes devienen hipomagnésicos (97). La combinación de Cimetidina (CMT) con el CDDP, si en verdad aquel fármaco se comporta como inhibidor de la tubulopatía tóxica por CDDP, debiera impedir la aparición de hipomagnesemia en tal magnitud.

Se distribuyeron aleatoriamente 48 pacientes entre dos ramas terapéuticas paralelas. Aquellos pacientes a los que se indique una quimioterapia con CDDP, al menos por 4 ciclos a dosis de 100 mg/m<sup>2</sup> i.v. cada 3 semanas (acompañado o no de otros citostáticos, siempre que éstos no estuvieren claramente asociados con una nefropatía tóxica), fueron asignados aleatoriamente por el método de sobres cerrados, a recibir una de las siguientes formas de terapia:

- Rama A (de control): pacientes que recibirán las dosis correspondientes de CDDP.
- Rama B (de ensayo): enfermos que serán tratados con el CDDP en igual manera que los anteriores, pero recibiendo combinadamente Cimetidina (CMT).

Todos los pacientes recibieron Cisplatino (NEOPLATIN<sup>R</sup>, Laboratorios Bristol-Myers Squibb), a dosis de 100 mg/m<sup>2</sup> disuelto en 500 cc de suero salino isotónico, por vía i.v. a pasar en 2 horas, cada 3 semanas (independientemente de los otros citostáticos, que no se explicitaban en el protocolo). El CDDP fue acompañado de una pre y poshidratación con 3 litros/m<sup>2</sup> de suero glucosalino, conteniendo 3 g/l de cloruro sódico y 33 g/l de glucosa), junto con un suplemento de 60 mEq de cloruro potásico a lo largo de 18 horas. Se pautaron regímenes antieméticos a título profiláctico, sin más especificación que la de no incluir corticoides como adyuvantes de la antiemesis, por su posible efectos nefroprotector *per se*. Tampoco se permitió el empleo de furosemida u otros diuréticos a lo largo del estudio, ni por supuesto el aporte exógeno de magnesio durante el período de valoración del ensayo. Se permitió el uso de manitol, pero sólo durante el día de la perfusión de CDDP, a la dosis de 250 ml de una solución al 20% exclusivamente en caso de que la diuresis fuese en algún momento inferior a 80 cc/hora.

Los pacientes de la rama B, además de la mencionada quimioterapia, fueron tratados con Cimetidina del modo siguiente: bolus i.v. de 400 mg dos horas antes del CDDP, y mantenimiento con 200 mg p.o. cada 8 horas durante los días 1 a 21 de cada ciclo, es decir durante todo el período de tratamiento con CDDP (134). La Cimetidina se empleará bajo la forma comercial TAGAMET<sup>R</sup> (Laboratorios SKF), ampollas de 400 mg y comprimidos de 200 mg.

Por consiguiente, el diseño fue el de un ensayo comparativo, aleatorizado, de dos brazos terapéuticos paralelos, propiamente en régimen de Fase IV con metodología de Fase III, pues todos los fármacos a testar están disponibles comercialmente desde hace años y se conoce perfectamente su índice terapéutico y toxicidad esperable. Este ensayo clínico quedó enmarcado en las labores asistenciales, investigadoras y docentes propias del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario San Carlos, bajo la dirección y supervisión del Prof. Eduardo Díaz-Rubio, y bajo la responsabilidad asistencial directa de D. José Manuel López Vega, como Doctorando y Médico Residente del mencionado Servicio. La inclusión de los pacientes se llevaría a cabo entre Septiembre de 1.989 y Enero de 1.991; varios meses de seguimiento prolongarían el análisis de resultados hasta finales de 1.991.

### 3.3. Criterios de selección de pacientes

Se consideraron elegibles para el ensayo los enfermos sometidos por primera vez a tratamiento quimioterápico con CDDP, siempre que se previera que habrían de recibir al menos 400 mg/m<sup>2</sup> de dosis total acumulada. Se exigió una edad superior a 18 años y menor de 75, un estado general definido por un índice de Karnofsky igual o superior a 70, y una expectativa de vida superior a 9 meses. Se requirió que la creatinina sérica estuviese por debajo de 1,3 mg/dL, con aclaramiento superior a 90 ml/min, y que no existieran antecedentes de hipertensión arterial, nefropatía, cardiopatía ni uropatía obstructiva de cualquier etiología. En cambio, no se exigió ninguna cifra mínima de magnesio sérico. Por último, se recabó el consentimiento informado y escrito por parte del enfermo, tras poner en conocimiento de él y de un familiar la naturaleza de su enfermedad, el tipo de tratamiento requerido, y los objetivos y diseño del presente estudio.

Por el contrario, los enfermos que ya hubieran recibido compuestos de platino, o los que tengan estados clínicos o analíticos distintos de los recabados en el párrafo anterior, no fueron elegibles para este estudio. Tampoco fueron aleatorizados aleatorización los enfermos que no emitieron un consentimiento específico, mediante las hojas al efecto empleadas por el Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario San Carlos.

Las causas de exclusión fueron: violaciones mayores del protocolo terapéutico, por cualquier motivo; deseo expreso del enfermo de finalizar el ensayo, aún sin interrumpirse por ello el protocolo quimioterápico previsto; suspensión de la quimioterapia por progresión de la enfermedad o por toxicidad intolerable. En principio, el objetivo era analizar la evolución de la magnesemia al menos después de 2 y 4 ciclos; se tomarán no obstante en consideración los datos de los enfermos que reciban sólo 2 ciclos y los de aquellos que superen ese límite, en este caso siempre que la dosis acumulada haya sido al menos de 400 mg/m<sup>2</sup>. En cualquier caso, se detallarían las causas de no evaluabilidad de cada paciente que se considerase excluido del estudio en cualquier fase del mismo.

### 3.4. Características de los pacientes

A lo largo de 18 meses, 48 enfermos fueron asignados aleatoriamente a una de las dos ramas del ensayo. Veinticinco correspondieron a la rama A y 23 se incluyeron en la rama B. Inmediatamente después de la aleatorización, un varón de la rama A y dos pacientes de la rama B, también de sexo masculino, rehusaron proseguir en el ensayo. El primero no llegó a recibir quimioterapia en nuestro Hospital. Los incluidos en el brazo B rechazaron la quimioterapia después de recibir un ciclo y no acudieron a sucesivas revisiones. Ambos recibieron una combinación de CDDP y Fluorouracilo según la pauta clásica de Al-Sarraf para sendos carcinoma escamosos de cabeza y cuello, y se pudo documentar que el abandono del tratamiento no estuvo directamente relacionado con el motivo de este ensayo clínico, esto es con la hipomagnesemia inducida por cursos repetidos de CDDP. Por consiguiente, consideramos que los 3 enfermos se podían excluir del análisis, y que el número de pacientes evaluables sería de 45 (24 en la rama A y 21 en la rama B).

Los principales rasgos clínicos previos al tratamiento de estos 45 pacientes quedan reseñados en la **Tabla VIII**. También se recoge el número de ciclos de quimioterapia que se administraron en cada brazo terapéutico. Respecto de las características basales de los pacientes, ambos grupos aparecen bien balanceados, con una ligera desproporción entre los tipos histológicos de neoplasia. En el grupo B hubo más pacientes con carcinoma de cabeza y cuello y ovario, mientras que en el grupo A había más acumulación de casos de cáncer de pulmón, si bien en su mayoría éstos correspondían a la variedad de células pequeñas, y por tanto no era previsible que recibiesen menos ciclos de quimioterapia que los enfermos incluidos en la rama B.

Los tratamientos quimioterápicos fueron comparables en ambos grupos del estudio: combinaciones de CDDP y etopósido para los cánceres pulmonares; de CDDP y ciclofosfamida para los tumores ováricos; y de CDDP con fluorouracilo en los cánceres de cabeza y cuello. Hubo un tumor germinal en cada grupo, y ambos fueron tratados con CDDP, vinblastina y bleomicina. Los pocos casos restantes fueron neoplasias de tiroides y vejiga que recibieron combinaciones de CDDP y doxorubicina. En todos los casos, cada dosis unitaria de CDDP fue de 100 mg/m<sup>2</sup>.

**TABLA VIII. CARACTERISTICAS DE LOS ENFERMOS SOMETIDOS A ENSAYO CLINICO CON CIMETIDINA vs CDDP**

|                          |                 | <u>Nº DE PACIENTES</u> |           |
|--------------------------|-----------------|------------------------|-----------|
|                          |                 | Rama A                 | Rama B    |
| Pacientes evaluables     |                 | 21                     | 24        |
| Nº de ciclos por enfermo |                 |                        |           |
|                          | Dos             | 1                      | 3         |
|                          | Tres            | 5                      | 1         |
|                          | Cuatro          | 13                     | 8         |
|                          | > 4             | 2                      | 12        |
| Sexo:                    | Femenino        | 10                     | 12        |
|                          | Masculino       | 11                     | 12        |
| Edad:                    | Mediana         | 60                     | 60        |
|                          | Límites         | 37-70                  | 32-72     |
| Tumores:                 | Pulmón          | 7                      | 4         |
|                          | Cabeza y Cuello | 6                      | 9         |
|                          | Ovario          | 5                      | 9         |
|                          | Otros           | 3                      | 2         |
| Magnesemia basal:        | Mediana         | 1.80                   | 1.82      |
| (mg/dl)                  | Límites         | 1.60-2.16              | 1.55-2.26 |
| Creatinina basal:        | Mediana         | 0.89                   | 0.88      |
| (mg/dl)                  | Límites         | 0.52-1.20              | 0.60-1.22 |

### 3.5. Estudios analíticos

El día previo a cada ciclo se realizaron determinaciones de magnesio sérico, de creatinina, y secundariamente de otros parámetros hematométricos y bioquímicos de relevancia para este tipo de tratamientos), evitando en todo caso los períodos de hidratación forzada. Se desecharon las muestras de sangre hemolizada. No se efectuaron determinaciones de magnesio urinario por la variabilidad de sus cifras en función de la dieta del paciente, la cual no estuvo condicionada por ninguna restricción ni suplementación específicas. Los niveles de magnesio sérico se cuantificaron por espectrofotometría de absorción atómica; en el Hospital Universitario San Carlos de Madrid, los valores normales oscilan entre 1,75 y 2,40 mg/dl. Las magneemias previas al ensayo, en general, estuvieron dentro de estos límites, aunque varios pacientes exhibían cifras menores, en ausencia de cualquier evidencia clínica de patología rena, y no por ello fueron desestimados para el ensayo. Por la discordancia que se ha descrito entre la afectación glomerular y la tubulopatía inducida por CDDP (112,217), se analizaron separadamente los niveles de creatinina sérica, expresados en mg/dl. No procedimos a estudios isotópicos para estimación del flujo plasmático renal o de la fracción de filtración glomerular (22). No se efectuaron determinaciones de enzimas urinarias porque la variabilidad de sus valores las hace indicadores muy poco fiables de tubulopatía activa (102,218-220).

Los datos relativos a la respuesta de los tumores a la quimioterapia no fueron tenidos en cuenta, salvo para interrumpir la indicación de CDDP si se documenta progresión de la enfermedad durante dicho tratamiento. Los criterios de respuesta serán los apropiados para cada tipo de neoplasia, de acuerdo con las recomendaciones usuales de la OMS, e igual patrón se seguirá para la evaluación de la toxicidad. Todos los datos clínicos del paciente, así como todos los resultados de analíticos, y los estudios radiológicos destinados a comprobar la evolución de la enfermedad, así como las hojas de consentimiento informado por escrito para recibir quimioterapia y para ser incluíble en este ensayo clínico, quedaron recogidas en las historias clínicas del Hospital Universitario San Carlos, según modelos formalizados por la Comisión de Historias Clínicas y el Servicio de Oncología Médica de dicho Centro.

El número de ciclos de quimioterapia que recibieron los pacientes de los dos grupos terapéuticos se recoge en la **Tabla VIII**. En el brazo con Cimetidina más enfermos sobrepasaron los 4 ciclos de quimioterapia. No obstante, más allá de ese umbral se produjo una gran variación en los regímenes de quimioterapia de cada paciente, siendo difícil analizar los datos bioquímicos de forma sistemática. Por ello,

a efectos del ensayo sólo se valoraron los efectos de los 4 primeros ciclos de quimioterapia, y en este contexto los dos brazos del estudio estuvieron bien balanceados. Los pacientes que no llegaron a recibir un mínimo de 400 mg/m<sup>2</sup> de CDDP fueron 6 (28.5%) en el brazo-control y 4 (16.7%) en la rama B. La diferencia no es estadísticamente significativa. En todos los casos, el motivo para no continuar el tratamiento con CDDP fue la progresión de la enfermedad.

#### **4. METODOS DE ANALISIS ESTADISTICO**

Las curvas de supervivencia de las ratas Wistar expuestas a CDDP 20 mg/Kg y las de los ratones DBA/2 inoculados con células de linfoma L5178Y, al ser estos animales observados diariamente, se expresaron en términos de porcentaje absoluto de animales supervivientes a lo largo de los días de observación. Las comparaciones entre curvas de este tipo se realizaron mediante tests de Mantel-Haenszel (221).

Cuando interesó comparar las proporciones de ratas Wistar curadas de su nefropatía aguda (vivas y con aspecto normal al día +12) o bien las de ratones DBA/2 en remisión completa mantenida, se confeccionaron tablas de contingencia de m filas por n columnas, que se contrastaron por el test de  $J_i^2$ . Si las tablas consistían en modelos 2 x2, se empleó el test exacto de Fisher (222).

Las variaciones en el peso y las determinaciones de urea, creatinina y platino circulante, efectuadas en ratas Wistar tratadas con CDDP a la dosis de 7 mg/Kg (entre otros fármacos) se sometieron a tests de Smirnov-Kolmogorov para valorar su grado de ajuste a una distribución normal. Cuando existió un suficiente grado de aproximación, se contrastaron mediante pruebas "t" de Student. Si las distribuciones contenían un número escaso de casos o se alejaban ampliamente de la normal, se contrastaron mediante tests no paramétricos, en concreto el test de rangos de Wilcoxon para datos no apareados (223).

Los niveles lesionales observados en riñones de ratas Wistar expuestas a CDDP 7mg/Kg darán lugar a la generación de "índices de severidad" de acuerdo con el método descrito por Litterst y cols (18). Cada nivel lesional (de I a V) se valorará por los guarismos 1 a 5; el número de animales contenido en cada nivel se multiplicará por el guarismo correspondiente; la suma de todos los términos así obtenidos se dividirá por el número total de animales expuestos al experimento. En la literatura consultada, no se han descrito métodos estadísticos para analizar estos "índices de severidad". Por ello, adicionalmente los niveles IV y V se agruparán como

"lesiones graves", frente al resto de los niveles, que se agruparán como "lesiones leves". Así se podrán construir tablas de contingencia 2 x 2 para cada grupo terapéutico, a las que poder aplicar el test exacto de Fisher para estimar el posible efecto nefroprotector de distintos fármacos experimentales frente a la acción tóxica del CDDP.

Las mediciones del área tumoral de las neoplasias inoculadas a los ratones DBA/2, al constituir datos cuantitativos estimados de forma repetida en el tiempo, se sometieron a tests de análisis de varianza (test ANOVA en una vía para un factor repetido), procediéndose a comparaciones múltiples con ayuda del test secuencial de rangos de Newman-Keuls (224). Aplicamos un procedimiento análogo para contrastar las cifras de magnesemia y de creatinina sérica en los pacientes incluidos en el ensayo clínico con CDDP y Cimetidina. Cuando interesó comparar los datos obtenidos en un determinado día o fase del estudio, ya fuesen de masas tumorales en los ratones DBA/2, o de resultados bioquímicos en el ensayo clínico, de nuevo mediante test de Smirnov-Kolmogorov se determinó la normalidad de los datos, y conforme a ese criterio se aplicó la "t" de Student o bien un test de rangos de Wilcoxon para datos inapareados.

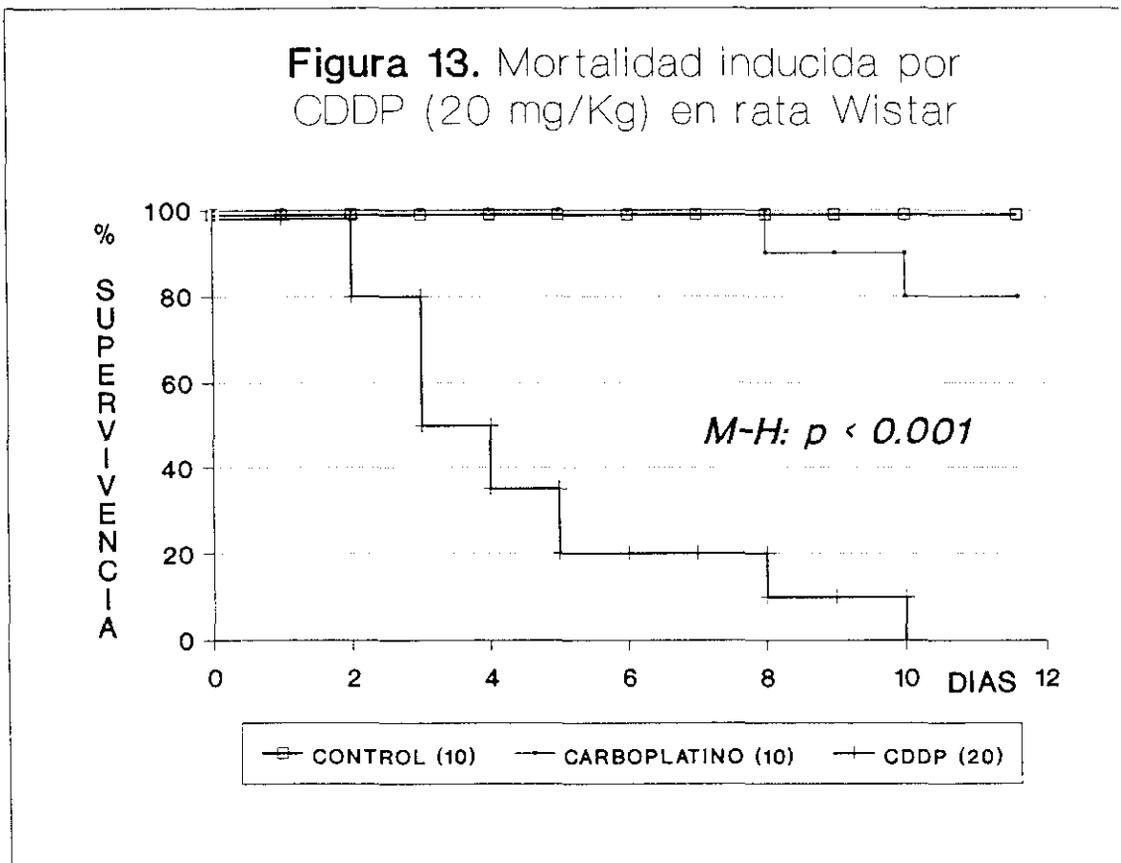
Para todos los test estadísticos aplicados, se seleccionará una  $p < 0,05$  como nivel de significación estadística. Todos los cálculos estadísticos se realizaron con ayuda de un programa RSIGMA, en un ordenador PC compatible dotado de microprocesador Intel 80386DX a 33 MHz, sin coprocesador matemático.

## **V. RESULTADOS**

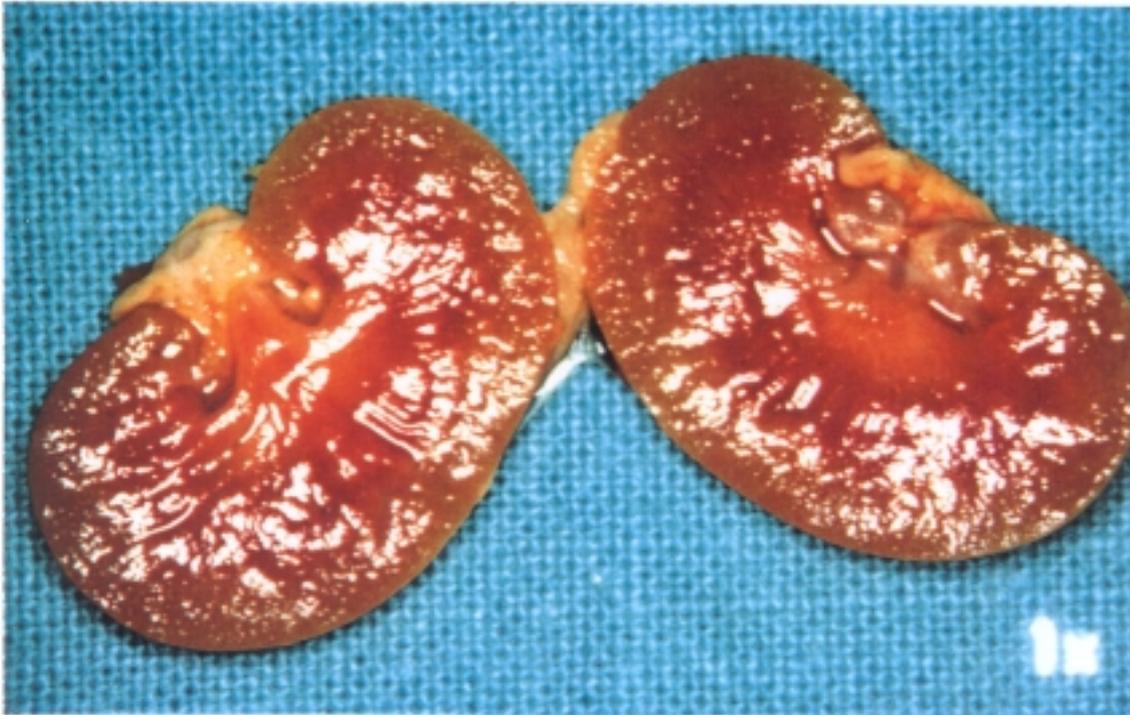
## RESULTADOS

### 1. MORTALIDAD DE RATA WISTAR CON CDDP (20 mg/Kg)

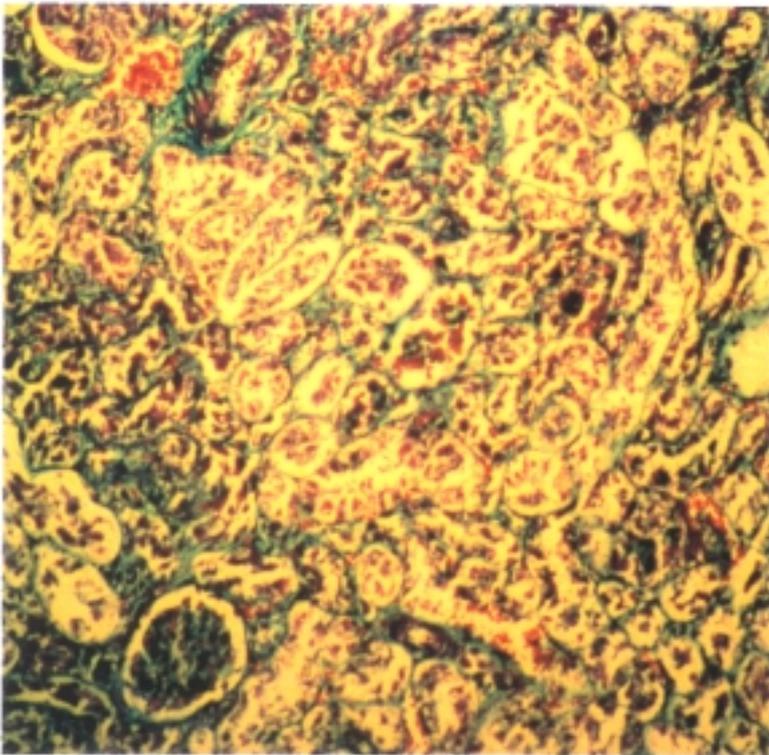
Se estudiaron un total de 260 ratas hembra de raza Wistar, distribuidas en 8 ensayos terapéuticos consecutivos, en los que se les aplicaban distintos tratamientos por vía i.p. El primer ensayo consistió en tratar un total de 40 animales, 10 de ellos con agua destilada, otros 10 con Carboplatino, y finalmente 20 ratas más con CDDP diluido en agua destilada. La observación diaria de los animales dio lugar a las curvas de supervivencia absoluta que se recogen en la **Figura 13**. Se comprobó una variación estadísticamente significativa entre la curva asociada al tratamiento con CDDP y las observadas en animales tratados con agua o Carboplatino mediante el test de Mantel-Haenszel (M-H). En el examen postmortem, todas las ratas tratadas con CDDP perdieron peso de forma notable; macroscópicamente en los órganos internos vimos una importante dilatación gástrica y sobre todo una grave afectación renal, con nefromegalia moderada y al corte una combinación de oligohemia cortical y congestión hemorrágica de las áreas medular y córtico/medular (**Figura 15**). Por microscopía óptica se demostraban extensos fenómenos de necrosis tubular (**Figura 16**); no se apreciaban lesiones en hígado, corazón ni pulmón.



**FIGURA 14.** Riñón de rata Wistar al 8° día de tratamiento con Carboplatino. No se aprecian lesiones macroscópicas.

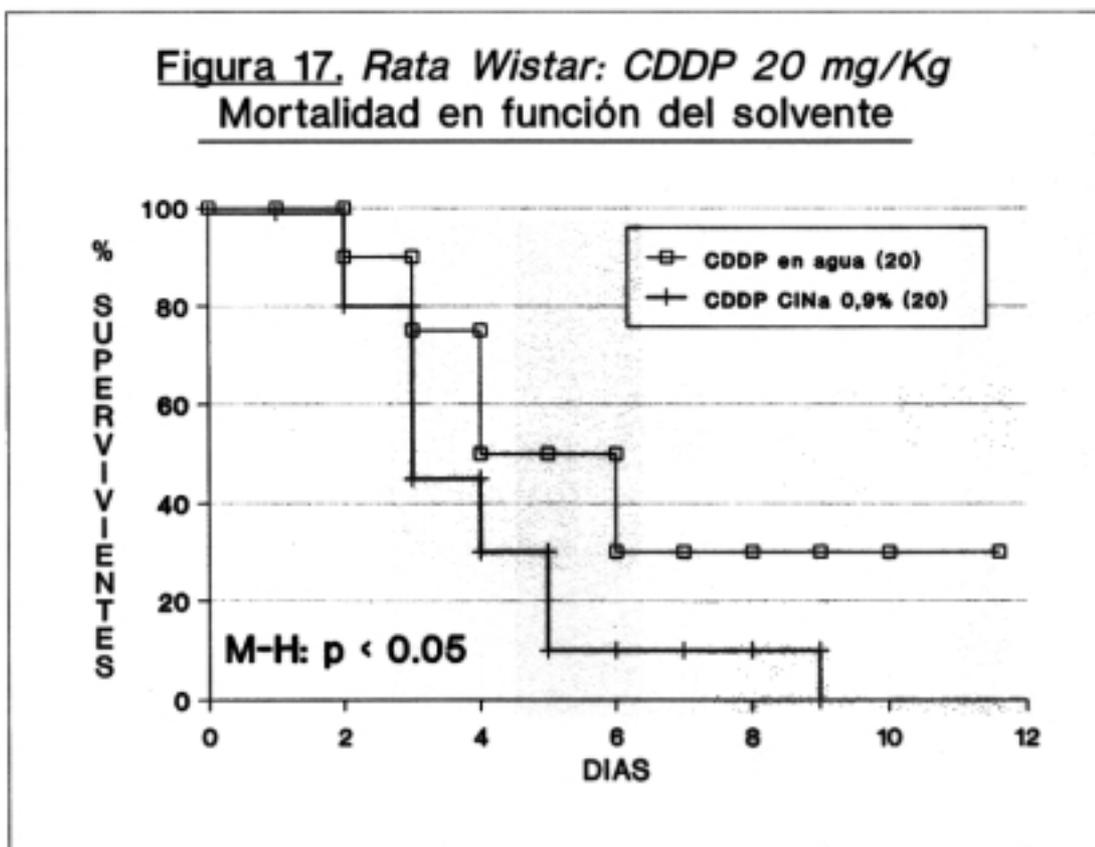


**FIGURA 15.** Riñón de rata Wistar expuesta a CDDP disuelto en agua destilada. Dosis de 20 mg/Kg. El animal falleció al 4° día de observación. Véanse la oligohemia cortical y la congestión medular.

**FIGURA 16**

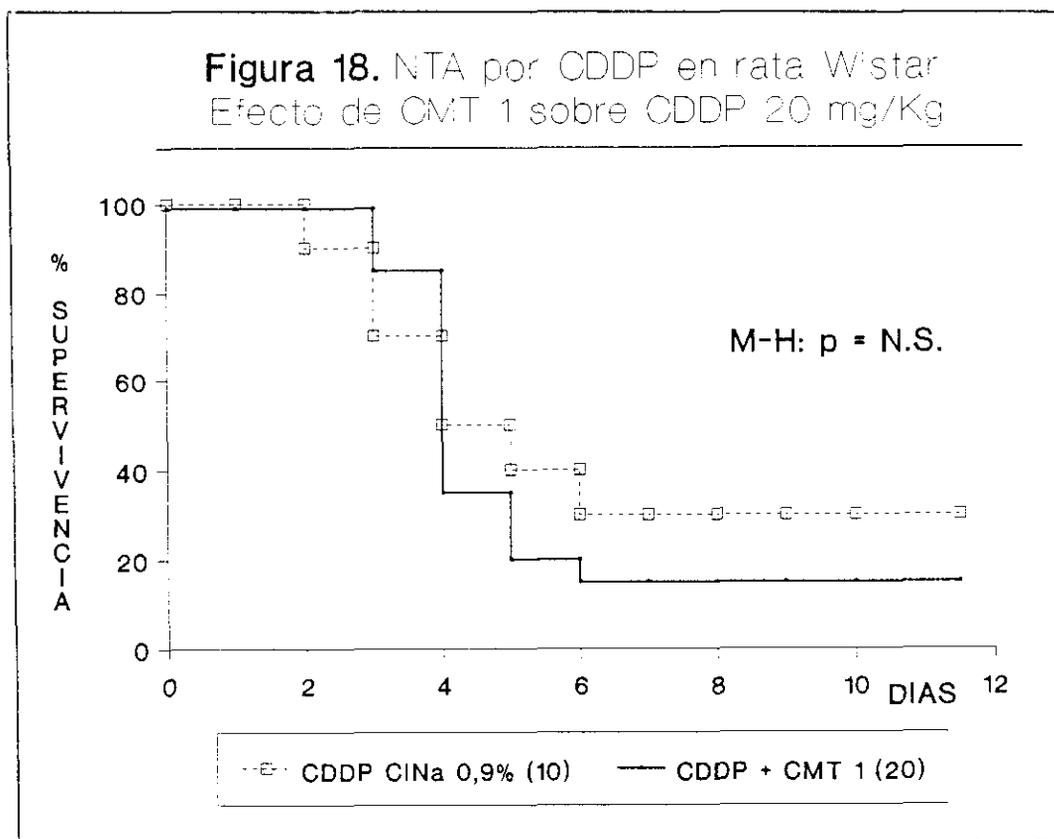
Riñón de rata Wistar, 8<sup>o</sup>  
 día pos-CDDP: 20 mg/Kg.  
 Extensa necrosis del  
 epitelio tubular.  
 Tricróm. de Masson (125x).

Un segundo ensayo comparó la evolución de 40 ratas, divididas en: 20 tratadas con CDDP diluído en agua destilada, y 20 más tratadas con CDDP disuelto en suero salino isotónico; en ambos casos se mantuvo la dosis de 20 mg/Kg. Las curvas de supervivencia se reflejan en la **Figura 17**. El test de M-H revela una diferencia estadísticamente significativa entre ambas.

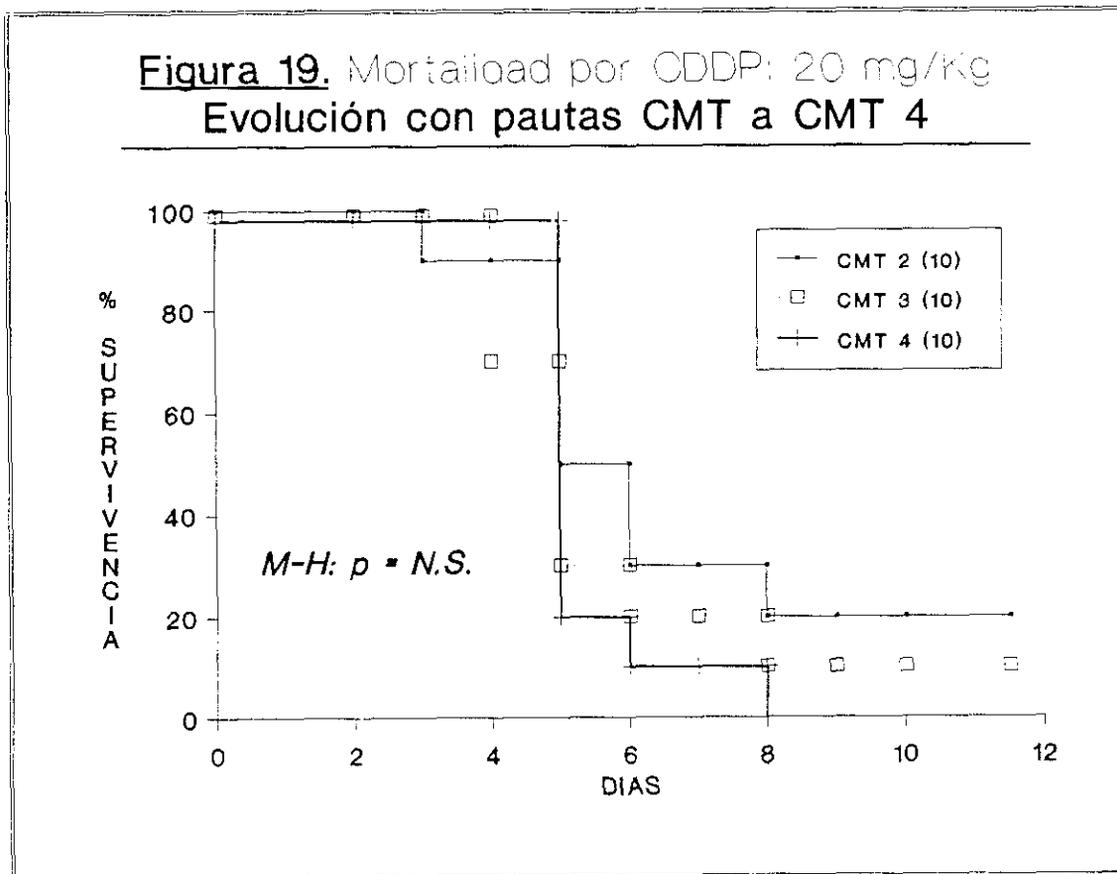


En los ensayos subsiguientes, se pretendía comprobar un efecto favorable de varios fármacos sobre la toxicidad letal inducida por el CDDP. Antes de proceder a ninguna comparación, se llevó a cabo un tercer experimento prospectivo en el que se trataron 10 ratas con Cimetidina (300 mg/Kg/día, repetidos 2 días consecutivos), otras 10 con Fosfomicina (200 mg/Kg cada 12 horas por 6 dosis consecutivas), y 10 más con Metilprednisolona (30 mg/Kg/día, en 3 días consecutivos). La tolerancia aguda fue aceptable. Se apreció un estado de apatía transitoria de escasas horas de duración el segundo día de tratamiento en los animales tratados con Cimetidina. En los días 3<sup>o</sup> al 5<sup>o</sup>, las ratas tratadas con Fosfomicina y Metilprednisolona exhibieron leves signos de irritación peritoneal. Todos los efectos revirtieron espontáneamente y no se produjo ningún fallecimiento entre estos animales. Todos fueron sacrificados, sin encontrarse lesiones en el examen postmortem.

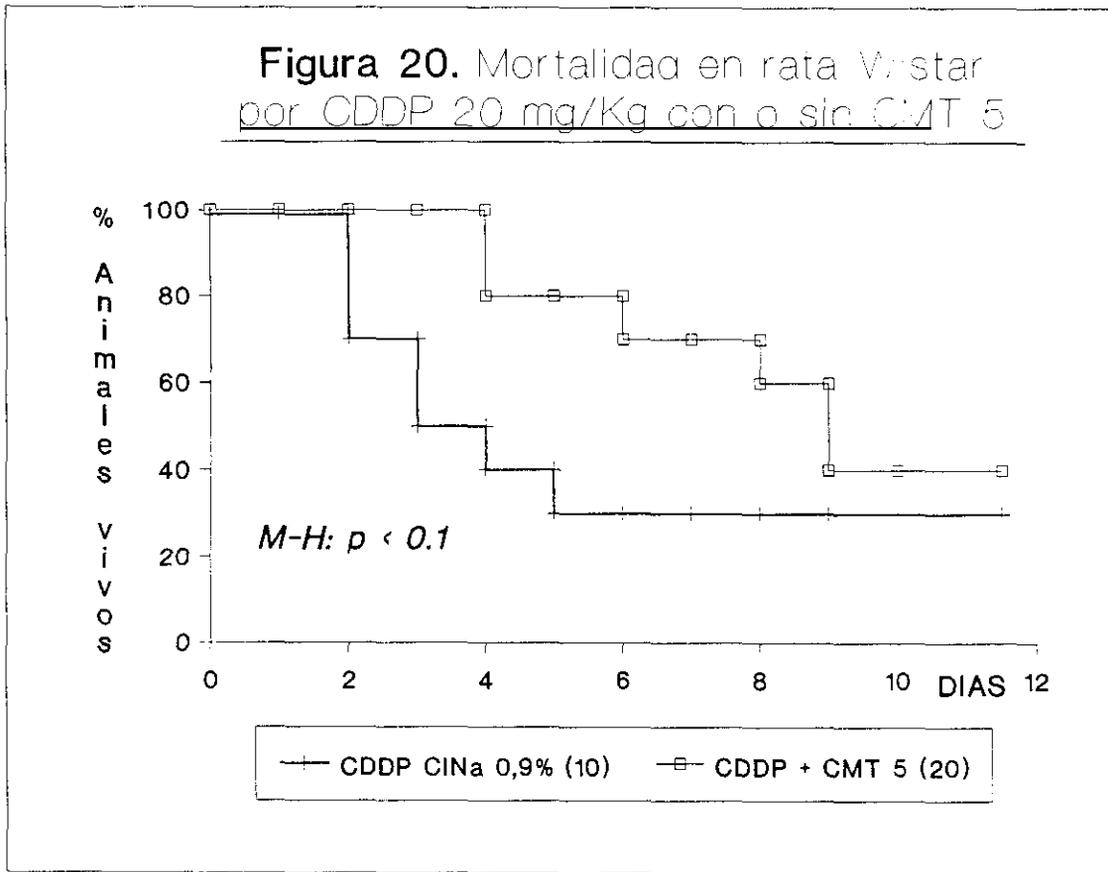
El cuarto ensayo se efectuó con un grupo de 10 ratas tratadas sólo con CDDP (20 mg/Kg, diluido en suero salino isotónico), junto a otros 20 animales tratados, además, con Cimetidina según protocolo CMT 1. Las curvas de supervivencia se representan en la **Figura 18**. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre ambas. En esta ocasión los animales tratados con CDDP y CMT 1 exhibieron arreactividad a estímulos e incoordinación motora más duraderas que el estado apático descrito con el uso de CMT en el experimento anterior.



El Experimento n° 5 dividió 30 ratas de raza Wistar en 3 grupos de igual tamaño; cada uno de ellos recibió CDDP a dosis de 20 mg/Kg disuelto en suero salino isotónico, además de Cimetidina, según las pautas CMT 2, CMT 3 y CMT 4. Todos estos esquemas contemplaban repetir dosis de Cimetidina durante 3 ó 5 días. Los tratamientos se asociaron a las curvas de supervivencia que aparecen en la **Figura 19**. El análisis estadístico no apreció diferencias entre ellas. Retrospectivamente, aunque los animales no empezaban a fallecer masivamente hasta después del 5° día, en última instancia no se observaba ninguna mejoría de las curvas de supervivencia reflejadas en la **Figura 18**. No se apreció toxicidad neurológica en ninguno de los grupos.



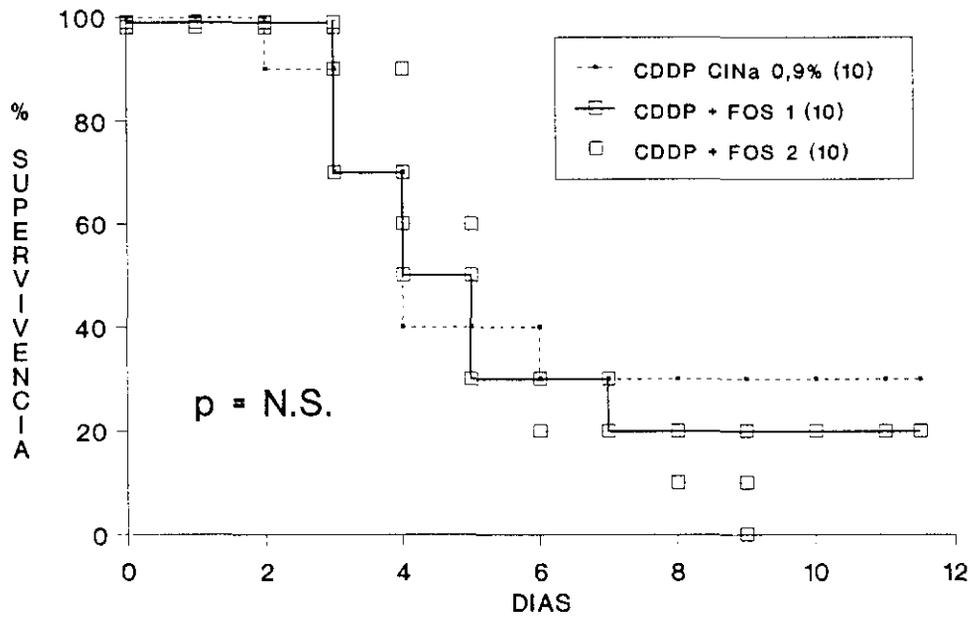
En el siguiente experimento comparamos las evoluciones de 10 ratas-control sometidas sólo a la acción de CDDP y de otras 20 ratas tratadas con CDDP combinado con el régimen de Cimetidina CMT 5. Aquí se disminuyó en un 30% la dosis de Cimetidina correspondiente al día 0, por las observaciones efectuadas en el cuarto ensayo con CMT 1. Se generaron las curvas de supervivencia que representamos en la **Figura 20**. El test de M-H arrojó una  $p < 0,1$ , lo que se consideró en todo caso en el límite de la significación estadística. En este ensayo no surgieron signos de encefalopatía en los animales que recibieron Cimetidina.



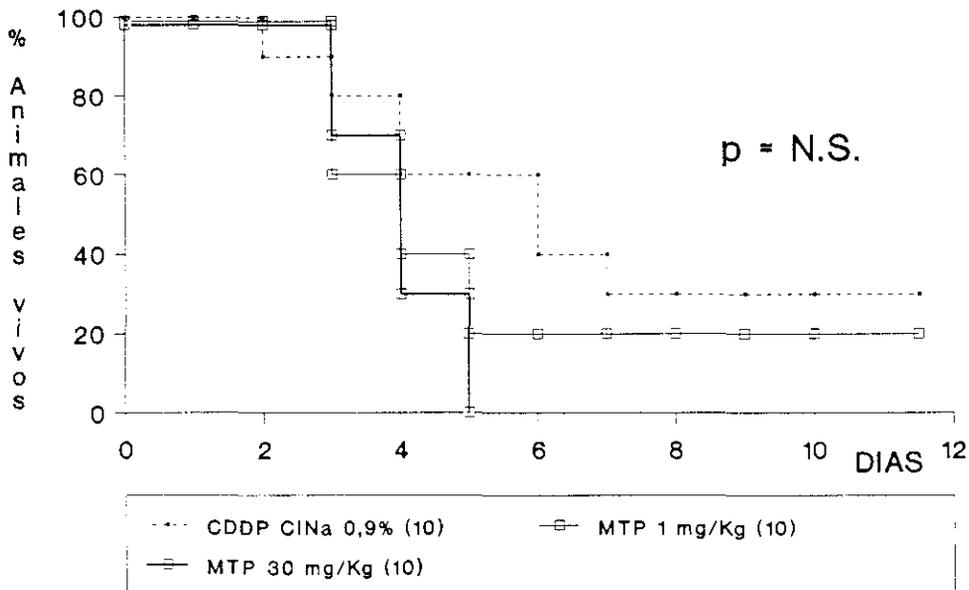
El estudio realizado a continuación (nº 7) consistió en ensayar los efectos del CDDP combinado con dos distintas dosificaciones de Fosfomicina (según pautas FOS 1 y FOS 2) frente al tratamiento exclusivo con CDDP, a la dosis constante de 20 mg/Kg diluidos en salino fisiológico. Se emplearon 10 ratas Wistar en cada grupo terapéutico, cuyas curvas de supervivencia quedan recogidas en la **Figura 21**. El test de M-H no arroja en ningún caso diferencias significativas, si bien la mortalidad con el esquema FOS 2 parecía exceder claramente a la esperada; de hecho, las ratas tratadas con este esquema (200 mg/Kg de Fosfomicina cada 12 horas por 6 dosis) sufrían signos de irritación peritoneal muy evidentes, más intensos que los observados durante el Ensayo 3º, lo que no sucedía con los animales del grupo FOS 1.

En el último ensayo terapéutico se confrontaron 10 ratas tratadas sólo con CDDP con 20 ratas que se repartieron equitativamente entre dos ramas para recibir, además del CDDP, las pautas de Metilprednisolona definidos como MTP 1 y MTP 2. Las curvas de supervivencia de cada grupo están representadas en la **Figura 22**. Nuevamente, la estimación por el método de M-H resultó carente de significación estadística. También sucedió que los animales sometidos al tratamiento MTP 2 exhibían intensos signos de irritación peritoneal, en las horas previas a su fallecimiento, que se produjo siempre en el curso de los 5 primeros días de observación.

**Figura 21. CDDP 20 mg/Kg en rata Wistar:  
Efecto de dos pautas con Fosfomicina**



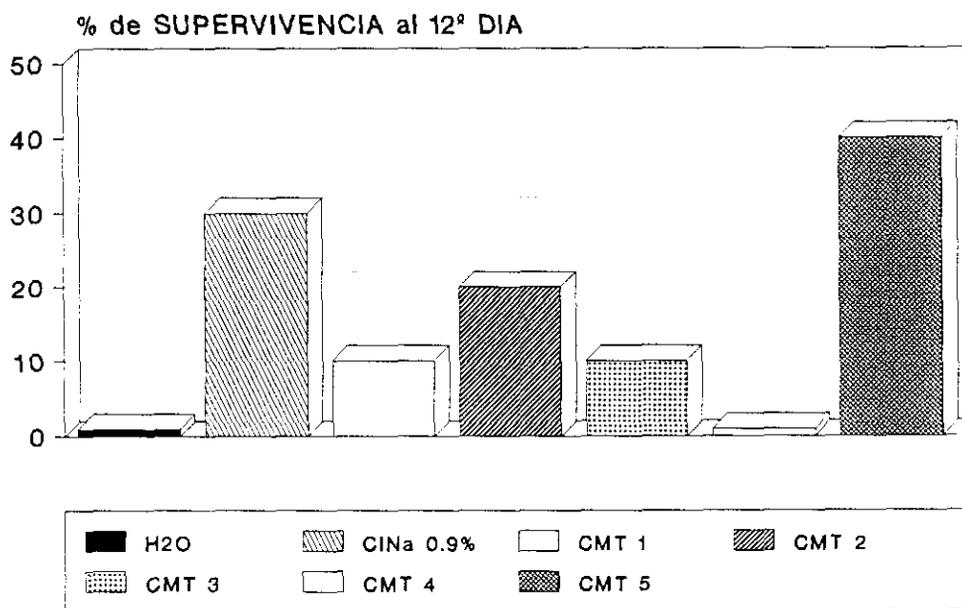
**FIGURA 22. Tubulopatía tóxica por  
CDDP 20 mg/Kg y Metilprednisolona**



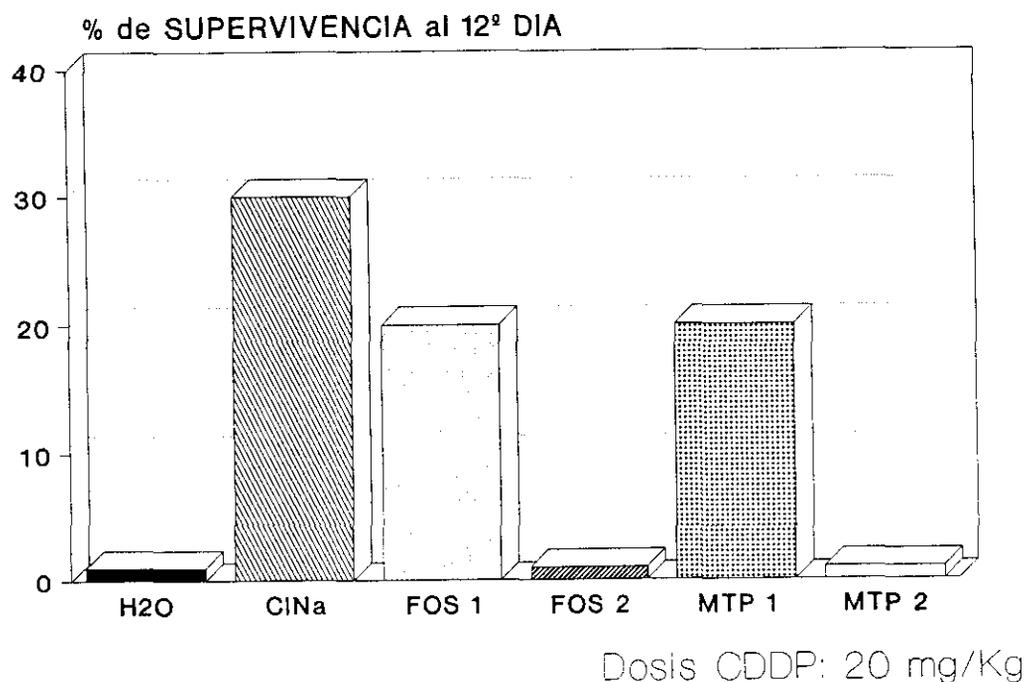
Para un análisis más completo, mostramos a continuación los resultados obtenidos por los diversos agentes nefroprotectores, en términos de porcentajes de animales supervivientes al 12° día de observación, más allá del cual no se documentan fallecimientos espontáneos atribuibles a la tubulopatía por altas dosis de CDDP. Exponemos en la **Figura 23** los resultados obtenidos con varios esquemas de Cimetidina, que pudieron ser sometidos a valoración estadística mediante sendos tests exactos de Fisher (EF). Obtuvimos una  $p < 0.001$  al comparar los efectos del Carboplatino frente a los del CDDP disuelto en agua destilada; este último tratamiento permite una supervivencia significativamente menor. En segundo término, la tasa de supervivencia al 12° día es mejorada significativamente por la adición de suero salino isotónico al CDDP ( $p < 0,05$  en el test EF). En cambio, desde el punto de vista estadístico, ninguno de los regímenes de tratamiento con Cimetidina dio lugar a supervivencias significativamente distintas en comparación con el suero salino isotónico, aunque parecía existir una ligera ventaja de la pauta CMT 5.

En la **Figura 24**, de forma análoga, resumimos los efectos observados con varias pautas de Fosfomicina y Metilprednisolona. Ningún esquema arrojó resultados significativamente distintos de los que se obtuvieron con suero salino isotónico. Es de señalar la muy baja supervivencia asociada con las dosis más altas de Fosfomicina y de Metilprednisolona; si bien el número de ratas observadas era pequeño y de hecho los correspondientes test EF no encontraron una diferencia significativa respecto de otros grupos.

**Figura 23.** Toxicidad letal por CDDP  
Resultados con Cimetidina



**Figura 24.** NTA letal por CDDP: Efectos de Fosfomicina y Metilprednisolona



## 2. ESTUDIO BIOQUIMICO Y MORFOLOGICO DE LA RATA WISTAR EXPUESTA A DOSIS UNICA DE CDDP DE 7 mg/Kg

En función de los resultados obtenidos en la fase previa, para valorar las repercusiones bioquímicas e histopatológicas del CDDP i.p. a la dosis de 7 mg/Kg sobre la rata Wistar, se trataron 40 ratas divididas en los siguientes 4 grupos terapéuticos, que recordamos aquí:

- Grupo 1: CDDP 7 mg/Kg diluido en salino isotónico
- Grupo 2: Igual tratamiento más CMT, 200 mg/Kg en bolus dos horas antes del CDDP, y 50 mg/Kg/día durante los 5 días siguientes
- Grupo 3: CDDP igual más FOS 40 mg/Kg cada 12 horas, durante 3 días
- Grupo 4: CDDP igual, más MTP 1 mg/Kg/día durante 3 días.

Fallecieron durante el período de observación inmediato 14 ratas (3, 2, 5 y 4 de cada respectivo grupo terapéutico). Tales animales no se tomaron en consideración en esta fase del trabajo. Los datos que proporcionó el estudio de los animales que llegaron a ser sacrificados el 5<sup>º</sup> día, se reportan en la **Tabla IX**.

**Tabla IX.** Estudio bioquímico al 5° día (CDDP: 7 mg/Kg)

|                                     | Peso inicial (g) | Peso final | PF/PIx100 | Urea (mg %) | Creatinina |
|-------------------------------------|------------------|------------|-----------|-------------|------------|
| <b><u>GRUPO 1: CDDP</u></b>         |                  |            |           |             |            |
| 1.                                  | 234              | 214        | 91.45     | 454         | 5.1        |
| 2.                                  | 219              | 217        | 99.08     | 72          | 1.0        |
| 3.                                  | 227              | 195        | 85.90     | 456         | 4.0        |
| 4.                                  | 210              | 187        | 89.04     | 530         | 5.8        |
| 5.                                  | 205              | 179        | 87.31     | 430         | 4.3        |
| 6.                                  | 229              | 202        | 88.20     | 526         | 6.2        |
| 7.                                  | 159              | 136        | 85.53     | 551         | 5.8        |
| <b><u>GRUPO 2: CDDP + CMT 5</u></b> |                  |            |           |             |            |
| 1.                                  | 224              | 214        | 95.53     | 215         | 3.7        |
| 2.                                  | 199              | 175        | 87.93     | 121         | 0.9        |
| 3.                                  | 237              | 206        | 86.91     | 146         | 1.6        |
| 4.                                  | 222              | 210        | 94.59     | 53          | 0.7        |
| 5.                                  | 211              | 186        | 88.15     | 313         | 3.5        |
| 6.                                  | 269              | 215        | 79.92     | 309         | 4.0        |
| 7.                                  | 246              | 237        | 96.34     | 52          | 0.8        |
| 8.                                  | 216              | 200        | 92.59     | 487         | 4.2        |
| <b><u>GRUPO 3: CDDP + FOS 1</u></b> |                  |            |           |             |            |
| 1.                                  | 216              | 154        | 71.29     | 741         | 7.5        |
| 2.                                  | 246              | 194        | 78.86     | 918         | 6.4        |
| 3.                                  | 255              | 207        | 81.17     | 1037        | 9.6        |
| 4.                                  | 222              | 205        | 92.34     | 68          | 0.9        |
| 5.                                  | 229              | 198        | 86.46     | 674         | 4.8        |
| <b><u>GRUPO 4: CDDP + MTP 1</u></b> |                  |            |           |             |            |
| 1.                                  | 229              | 171        | 74.67     | 946         | 7.9        |
| 2.                                  | 226              | 206        | 91.15     | 67          | 1.3        |
| 3.                                  | 189              | 157        | 83.06     | 994         | 10.5       |
| 4.                                  | 227              | 187        | 82.37     | 1046        | 9.4        |
| 5.                                  | 226              | 173        | 76.54     | 1074        | 11.6       |
| 6.                                  | 222              | 188        | 84.68     | 1148        | 10.1       |

Las ratas perdieron peso de forma constante. El grupo 2 (con Cimetidina) descendió hasta el 90% del peso inicial, como promedio, y fue el menos afectado por esta circunstancia, aunque las diferencias entre los grupos no llegaron a alcanzar significación estadística. Los tests estadísticos aplicados (comparaciones de medias mediante test "t" de Student y tests de rangos de Wilcoxon), indican que las cifras de urea y de creatinina alcanzan cotas significativamente menores en el grupo de Cimetidina que en el Grupo 1. Los estados de azoemia más importantes se encontraron en las ratas expuestas a Metilprednisolona, siendo significativamente peores sus resultados que los del Grupo 1. En cualquier caso, no se pudo demostrar ningún efecto nefroprotector de la Fosfomicina ni de la Metilprednisolona.

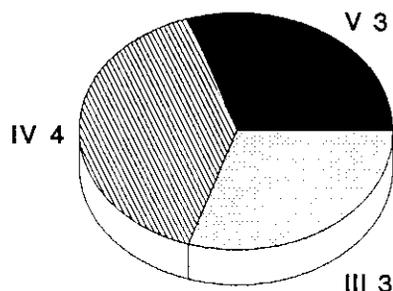
Los sueros de las ratas pertenecientes a los Grupos 1 y 2 se sometieron a determinación de niveles plasmáticos de platino, mediante técnica de espectrofotometría de absorción atómica. Con pequeñas oscilaciones, las medias aritméticas en ambos grupos fueron de 0,25 y de 0,30 microgramos/ml, respectivamente, y no se demostró diferencia estadísticamente significativa entre ellas.

En cuanto al estudio histológico de los riñones extraídos el 5º día de observación, tras el tratamiento con CDDP 7 mg/Kg (solo, disuelto en salino isotónico, o bien combinado con las pautas CMT 5, FOS y y MTP), se produjeron los resultados que se recogen en la **Tabla X** y se representan gráficamente en la **Figura 25**.

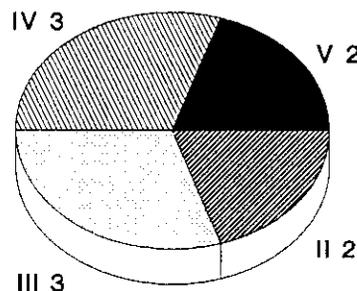
**Tabla X. LESIONES HISTOLOGICAS SEGUN GRUPOS TERAPEUTICOS**

|                                       | <u>Grupo 1</u> | <u>Grupo 2</u> | <u>Grupo 3</u>              | <u>Grupo 4</u> |
|---------------------------------------|----------------|----------------|-----------------------------|----------------|
|                                       | Cddp           | Cddp/Cmt 5     | Cddp/Fos 1                  | Cddp/Mtp 1     |
| Nivel I                               | 0              | 0              | 0                           | 0              |
| Nivel II                              | 0              | 2              | 0                           | 0              |
| Nivel III                             | 3              | 3              | 1                           | 0              |
| Nivel IV                              | 4              | 3              | 4                           | 6              |
| Nivel V                               | 3              | 2              | 5                           | 4              |
| Rata Wistar tratada con CDDP: 7 mg/Kg |                |                | N = 10, en todos los grupos |                |

**FIGURA 25. Histopatología al 5º día; CDDP: 7 Mg/Kg, solo o en combinación**

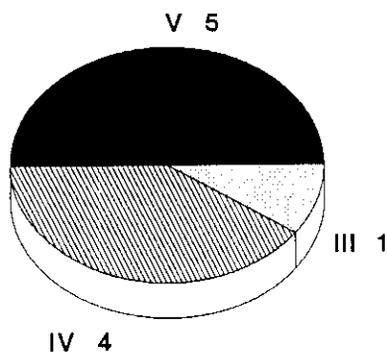


**CI Na 0.9 %**

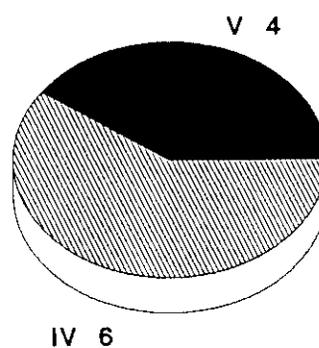


**CIMETIDINA**

Niveles I-IV: según ref. 207. Nivel V: muerte tóxica. N = 10, en todos los grupos



**FOSFOMICINA**

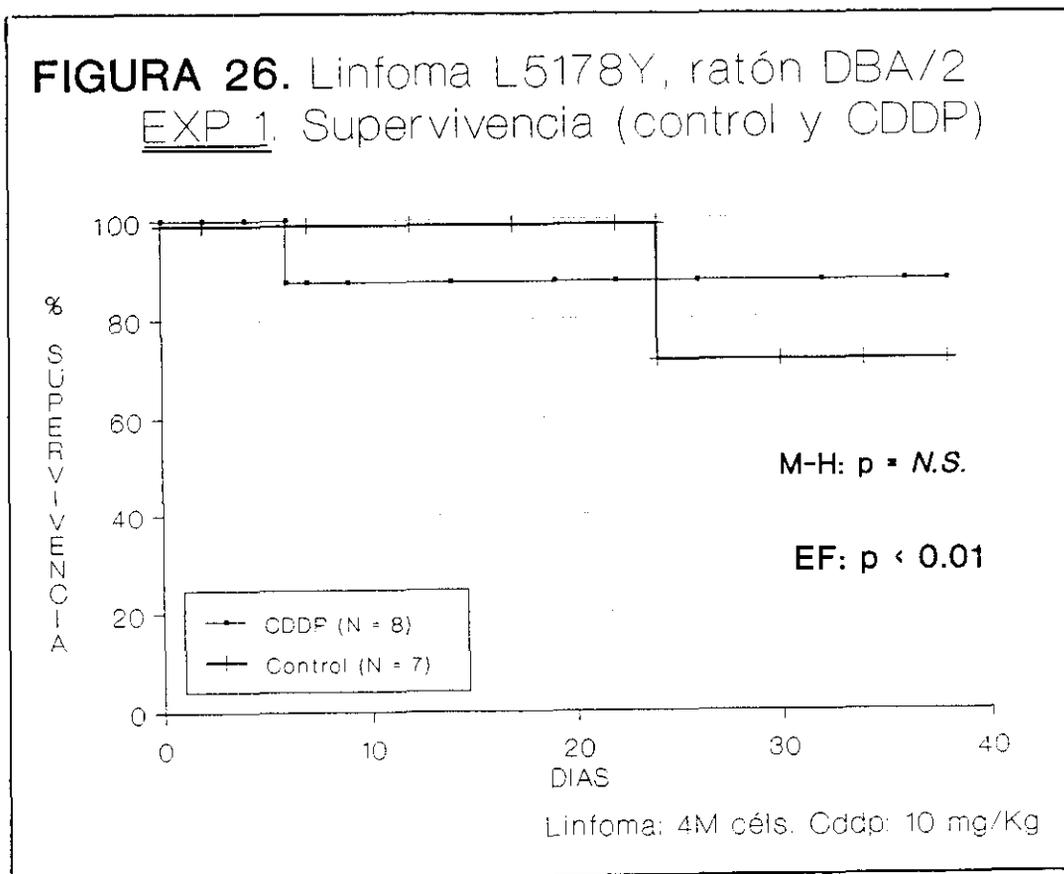


**PREDNISOLONA**

Los "índices de severidad" histológicos para cada grupo, según Litterst y cols (18), fueron los siguientes: CONTROL: 4.0. CIMETIDINA: 3.5. FOSFOMICINA: 4.4. METILPREDNISOLONA: 4.4. Se agruparon los niveles IV y V como "lesiones graves" y los demás grados como "lesiones ligeras". El test EF aplicado en estas condiciones, al comparar los Grupos 2,3 y 4 con respecto al Grupo 1, que fue considerado como grupo control, no arroja en ningún caso diferencias significativas. En cambio, se obtuvieron sendas  $p < 0.05$  y  $< 0.1$  al comparar el Grupo de Cimetidina con el grupo de Metilprednisolona y con el Grupo 4, respectivamente.

### 3. EXPERIMENTOS CON LINFOMA L5178Y EN RATON DBA/2

En el ENSAYO N° 1 se inocularon los ratones con  $4 \times 10^6$  células tumorales por vía s.c., junto con salino isotónico i.p. en el grupo control, o con una dosis única de CDDP diluido en suero salino isotónico a razón de 10 mg/Kg en el grupo terapéutico. Las curvas de supervivencia se representan en la **Figura 26**. No se detectó entre ambas una diferencia estadísticamente significativa por el test de Mantel-Haenszel (M-H). El parámetro % TC no se pudo evaluar porque en el grupo tratado con CDDP no se alcanzó la mediana de supervivencia. No hubo ninguna curación espontánea en el grupo control. En el grupo tratado se produjo sólo un fallecimiento (muy verosímilmente debido a nefrotoxicidad y no al linfoma) y al día 36 estaban vivos y además libres de tumor 6 de los 7 ratones restantes, resultando pues una tasa global de curaciones del 75% (85% si no tomamos en consideración la muerte precoz). El test exacto de Fisher (EF) aplicado a la contingencia "curados vs. no curados" en el día 36°, arrojó una  $p < 0.01$  a favor del grupo tratado con CDDP.



Efectuamos mediciones de las áreas tumorales en los días 8, 22 y 34, cuyos resultados quedan reflejados en la **Tabla XI**. Mediante análisis de la varianza para mediciones repetidas, se comprueba que el linfoma L5178Y en la rama control crece de forma significativa sólo a partir del día 22, y que en el grupo tratado con CDDP no se aprecian diferencias significativas entre las masas de los distintos períodos de observación, aunque en todo caso hay una tendencia a la regresión tumoral en todos los puntos. Comparativamente, en todos los puntos del seguimiento, son significativamente menores las masas linfomatosas en el grupo tratado con CDDP que en el grupo control ( $p < 0.01$ ).

**TABLA XI. PROGRESION DE LA MASA TUMORAL EN EL LINFOMA L5178Y.**  
**Exp. 1: Inóculo de 4 millones de células, sin o con CDDP: 10 mg/Kg**

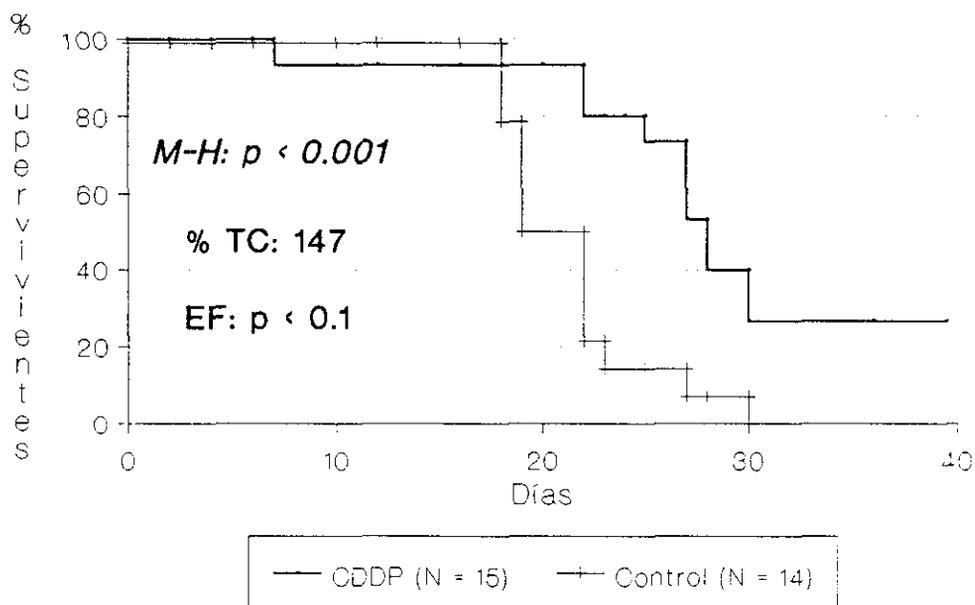
|         | Día 8 (mm <sup>2</sup> ) | D. 18 (cm <sup>2</sup> ) | D. 22 (cm <sup>2</sup> ) | Día 34 (cm <sup>2</sup> ) |
|---------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Control | 3.60                     | 8.82                     | 14.00                    | -- (*)                    |
|         | 3.30                     | 3.78                     | 4.71                     | 7.50                      |
|         | 3.04                     | 7.13                     | 13.78                    | --                        |
|         | 2.52                     | 3.52                     | 3.73                     | 4.37                      |
|         | 2.47                     | 3.36                     | 4.32                     | 7.20                      |
|         | 2.34                     | 1.80                     | 1.90                     | 2.21                      |
|         | 3.00                     | 3.74                     | 4.30                     | 5.98                      |
| CDDP    | 2.25                     | 0                        | 0                        | 0                         |
|         | 1.50                     | 0.63                     | 0.47                     | 0                         |
|         | 1.50                     | 0                        | 0                        | 0                         |
|         | 1.40                     | 0.63                     | 0.47                     | 0                         |
|         | 1.30                     | 1.68                     | 1.93                     | 2.70                      |
|         | 0.36                     | 0                        | 0                        | 0                         |
|         | 1.08                     | 0                        | 0                        | 0                         |

(\*): El animal había fallecido con anterioridad

En el 2° EXPERIMENTO, los ratones control fueron inoculados con  $10 \times 10^6$  millones de células linfomatosas, y el grupo terapéutico fue tratado con la misma dosis de CDDP. Las supervivencias de estos grupos a lo largo de 40 días de observación se reflejan en la **Figura 27**. El test de M-H detectó una diferencia entre las curvas con alta significación estadística.

Todos los ratones/control fallecen por progresión tumoral, mientras que en el grupo terapéutico fallecen 11 animales, uno de ellos muy probablemente por nefropatía y el resto (10) por efecto directo del linfoma L5178Y. Las medianas de supervivencia de ambas cohortes de ratones fallecidos por progresión tumoral, fueron respectivamente 19 días y 28 días; por consiguiente, el % TC quedó establecido en 147. En el grupo tratado con CDDP, a partir del trigésimo día de observación, permanecen vivos 4 animales, los cuales además alcanzan el día 60° completamente libres de tumor, de modo que la tasa de curaciones es del 26,6%, la cual está en el límite de la significación estadística con respecto al grupo control según el test EF.

**FIGURA 27.** Linfoma L5178Y, ratón DBA/2  
EXP 2. Supervivencia sin y con CDDP



Linfoma:  $10 \times 10^6$  céls. CDDP: 10 mg/Kg

Se realizaron mediciones de las áreas tumorales los días 10, 17 y 22, siendo los resultados los que aparecen en la **Tabla XII**. Nuevamente, se constató la evolutividad espontánea del linfoma L5178Y, esta vez ya con significación estadística a partir del 10° día de observación ( $p < 0.001$ ). Bajo tratamiento con CDDP, el inóculo de diez millones de células provoca la aparición de tumores también con

potencial evolutivo ( $p < 0.01$ ), pero sólo relevante desde el punto de vista estadístico a partir del día 17°. La comparación múltiple de varianzas confirma que las masas tumorales son significativamente menores en los ratones tratados con CDDP, no en el día 10°, pero sí en todas las mediciones ulteriores ( $p < 0.01$ ).

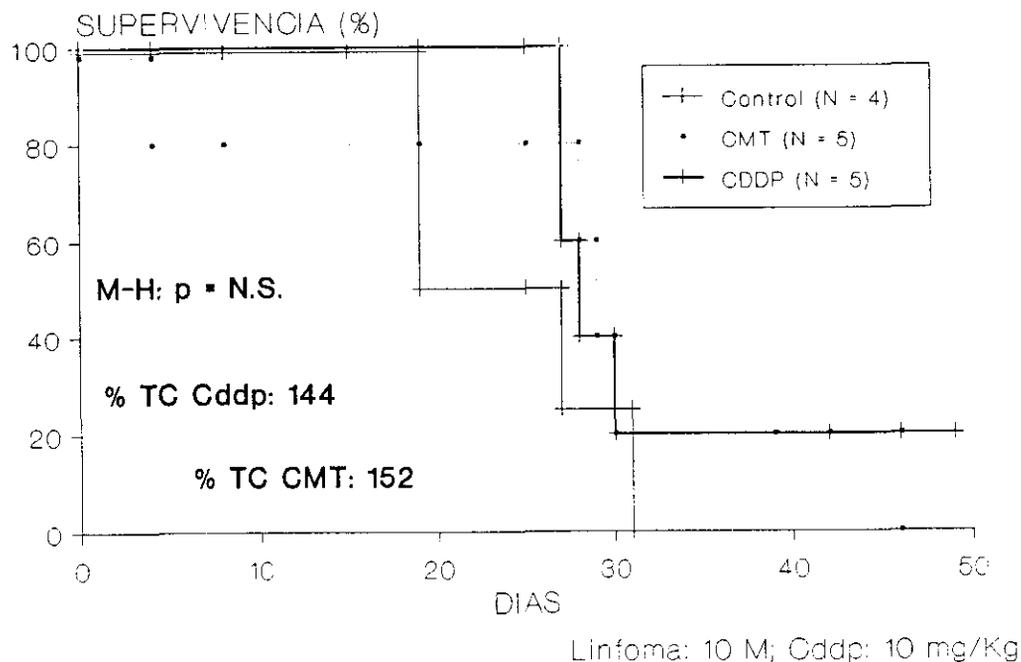
**TABLA XII.** Linfoma L5178Y. EXPERIMENTO 2. Progresión tumoral con inóculo de 10 millones de células, sin o con CDDP (en  $\text{cm}^2$ )

|            | Día 10 | Día 17  | Día 22 |
|------------|--------|---|--------|
| Controles  | 5.60   | 13.33   | -- (*) |
|            | 5.50   | 13.80   | --     |
|            | 5.20   | 15.54   | --     |
|            | 4.75   | 12.48   | --     |
|            | 4.68   | 11.78   | --     |
|            | 4.64   | 8.58  | 10.90  |
|            | 4.50   | 11.00   | 13.60  |
|            | 4.50   | 13.60   | --     |
|            | 4.42   | 9.36  | --     |
|            | 4.25   | 8.88  | 11.80  |
|            | 3.90   | 9.80  | 10.96  |
|            | 3.70   | 10.90   | 11.72  |
|            | 3.36   | 3.78  | 9.72   |
|            | 2.72   | 9.60  | 13.90  |
|            |        | (*) : Fallecimiento del animal con anterioridad |        |
| Cisplatino | 4.10   | 12.10   | --     |
|            | 3.00   | 11.70   | --     |
|            | 2.94   | 3.08  | 5.95   |
|            | 2.70   | 2.70  | 2.52   |
|            | 2.66   | 2.08  | 1.80   |
|            | 2.24   | 1.80  | 1.68   |
|            | 2.16   | 1.65  | 1.26   |
|            | 2.10   | 2.40  | 3.50   |
|            | 2.00   | 7.20  | 7.80   |
|            | 2.00   | 3.20  | 5.20   |
|            | 1.80   | 2.88  | 8.06   |
|            | 1.54   | 2.66  | 7.35   |
|            | 1.54   | 2.70  | 10.08  |
| 0.96       | 2.90   | 11.07   |        |

El ENSAYO N° 3 comparó la evolución de 4 ratones inoculados con 10 millones de células linfomatosas L5178Y, con la de otros 5 que recibieron tratamiento con una dosis de CDDP de 10 mg/Kg, y con la de otros 5 que fueron tratados con una combinación de CDDP y Cimetidina. Las curvas de supervivencia se recogen en la **Figura 28**. Exceptuando un ratón en el tercer grupo que falleció a consecuencia de nefropatía inducida por CDDP, y uno que resultó curado de su neoplasia en el grupo tratado con CDDP solo, todos los demás animales murieron por progresión tumoral. Las medianas de supervivencia de los animales fallecidos por dicha causa fueron:

- Grupo control: 19 días
- Grupo CDDP: 27,5 días
- Grupo CDDP-CMT: 29 días.

**FIGURA 28.** Linfoma L5178Y, ratón DBA/2  
Exp 3. Efecto de la Cimetidina



Por consiguiente, el CDDP en solitario dio lugar a un % TC de 144, y el tercer grupo se asoció con un % TC de 152. El test de M-H revela diferencias no significativas entre las curvas. Al curarse sólo un ratón y ser pequeño el número de individuos observados, no podemos extraer cifras válidas desde el punto de vista estadístico. Procedimos a mediciones seriadas de las áreas tumorales los días 10, 14 y 22; los resultados aparecen recogidos en la **Tabla XIII**. El estudio estadístico no apreció un crecimiento significativo del tumor ni en el grupo control, ni en el grupo que se trató con Cimetidina, sin duda por la parquedad de observaciones. Sí existió

un crecimiento significativo del tumor tratado con CDDP, con  $p < 0.05$  sólo más allá del día 14. Las comparaciones intergrupos arrojaron diferencias no significativas en los días 10 y 14, pero sí alcanzaron significación estadística hacia el día 22; con una  $p < 0.01$ , cualquier forma de tratamiento con CDDP redujo el volumen tumoral, pero no se detectaron diferencias entre los animales tratados con o sin Cimetidina, en otros términos no se observó ningún efecto deletéreo de la Cimetidina sobre el poder del CDDP para frenar la progresión tumoral.

**TABLA XIII.** Linfoma L5178Y en ratón DBA/2. Crecimiento tumoral en el Experimento 3: efectos de CDDP 10 mg/Kg y Cimetidina

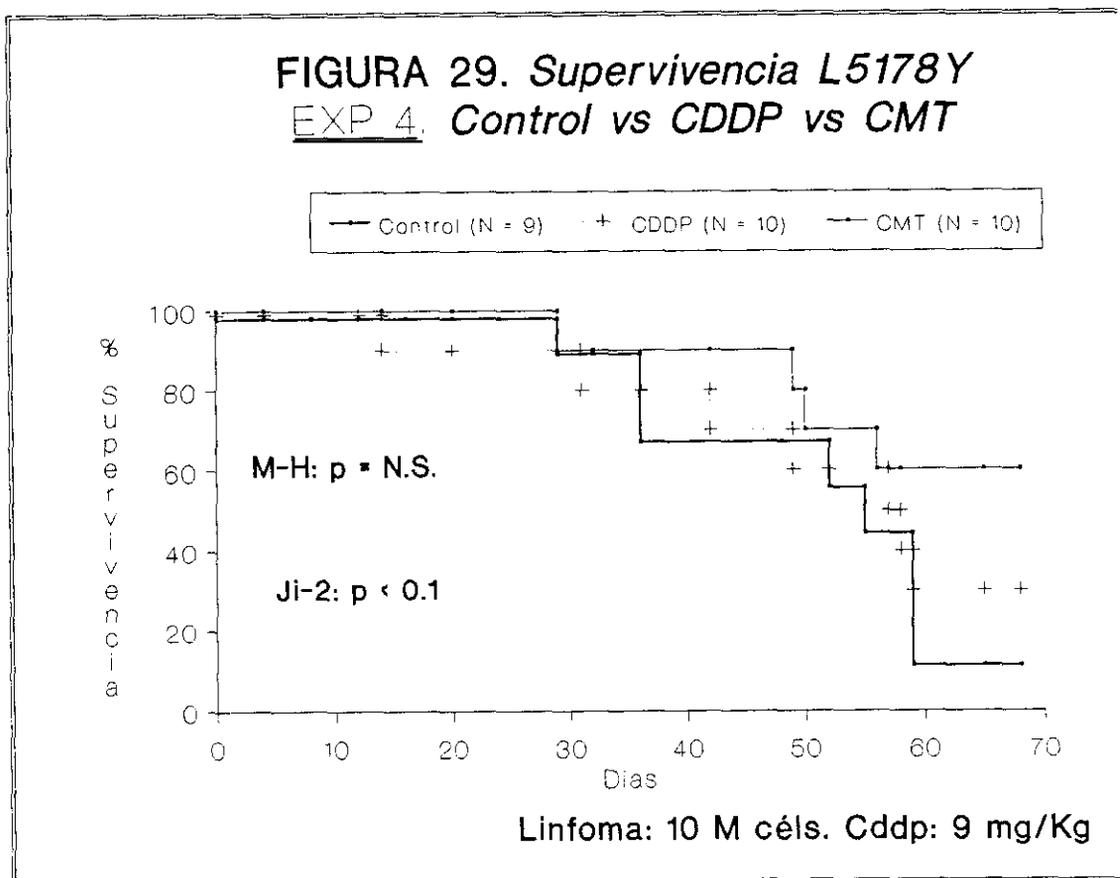
|            | Día 10 | Día 14 | Día 22 |
|------------|--------|--------|--------|
| Controles  | 4.64   | 8.58   | 11.90  |
|            | 4.42   | 9.36   | -- (*) |
|            | 3.36   | 3.78   | 14.50  |
|            | 2.72   | 9.60   | --     |
| CDDP       | 2.94   | 3.08   | 5.95   |
|            | 1.80   | 2.88   | 8.06   |
|            | 1.54   | 2.66   | 7.35   |
|            | 1.54   | 2.70   | 10.08  |
|            | 0.96   | 2.90   | 11.07  |
| Cimetidina | 2.65   | 3.74   | 7.59   |
|            | 2.03   | 1.82   | 9.12   |
|            | 1.90   | 2.48   | 1.78   |
|            | 1.54   | 1.82   | 0.98   |

(\*): El ratón había muerto anteriormente

El ENSAYO N° 4 reprodujo el esquema general de la anterior experiencia. Se mantuvo el inóculo con diez millones de células linfomatosas en el grupo control, pero en este caso la dosis de CDDP fue reducida a 9 mg/Kg con el ánimo de eludir el 8% de mortalidad tóxica por nefropatía que había aparecido en los Ensayos 2° y 3°. En paralelo con los 9 ratones asignados al grupo control, se trataron 10 animales sólo con CDDP, y otros 10 recibieron una combinación de CDDP con

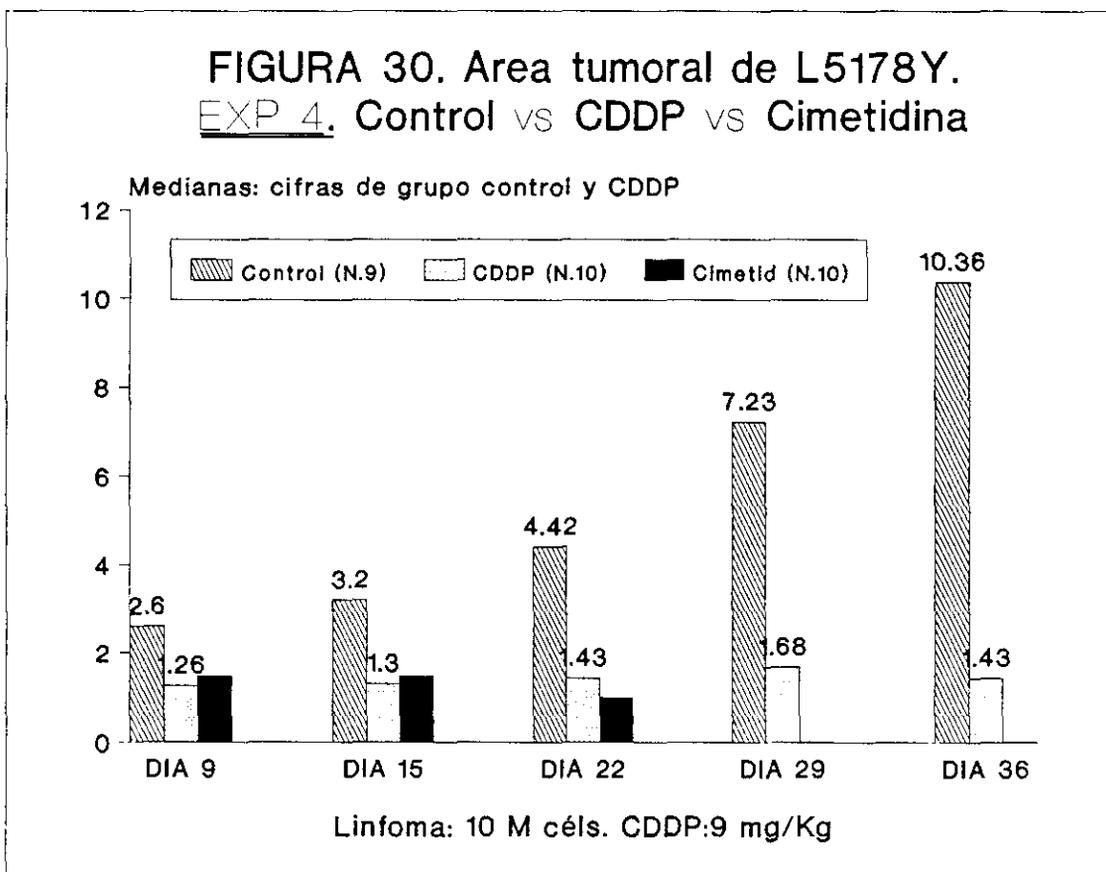
Cimetidina. Los resultados en términos de supervivencia se representan en la **Figura 29**. El método de M-H indica falta de significación estadística entre el grupo control y el grupo de CDDP solo, y señala una  $p < 0.1$  al comparar las curvas del control con las del grupo que recibió Cimetidina.

Del grupo control sólo 1 ratón se curó espontáneamente (11.1%), mientras que en el grupo de CDDP se curaron 3 (30%) y hubo un 60% de curaciones en el grupo de Cimetidina; con estos datos, un test de  $Ji^2$  al día 60° arroja una  $p < 0.1$ . Ahora bien, al considerar los tiempos de fallecimiento de los ratones de cada grupo, resultan medianas de 53.5 días en el grupo control, de 49 días en el grupo de CDDP, y de 49.5 días en el grupo de la Cimetidina. Así, en este caso, los % TC resultan ser inferiores a 100 para cualquier tratamiento antilinfomatoso.



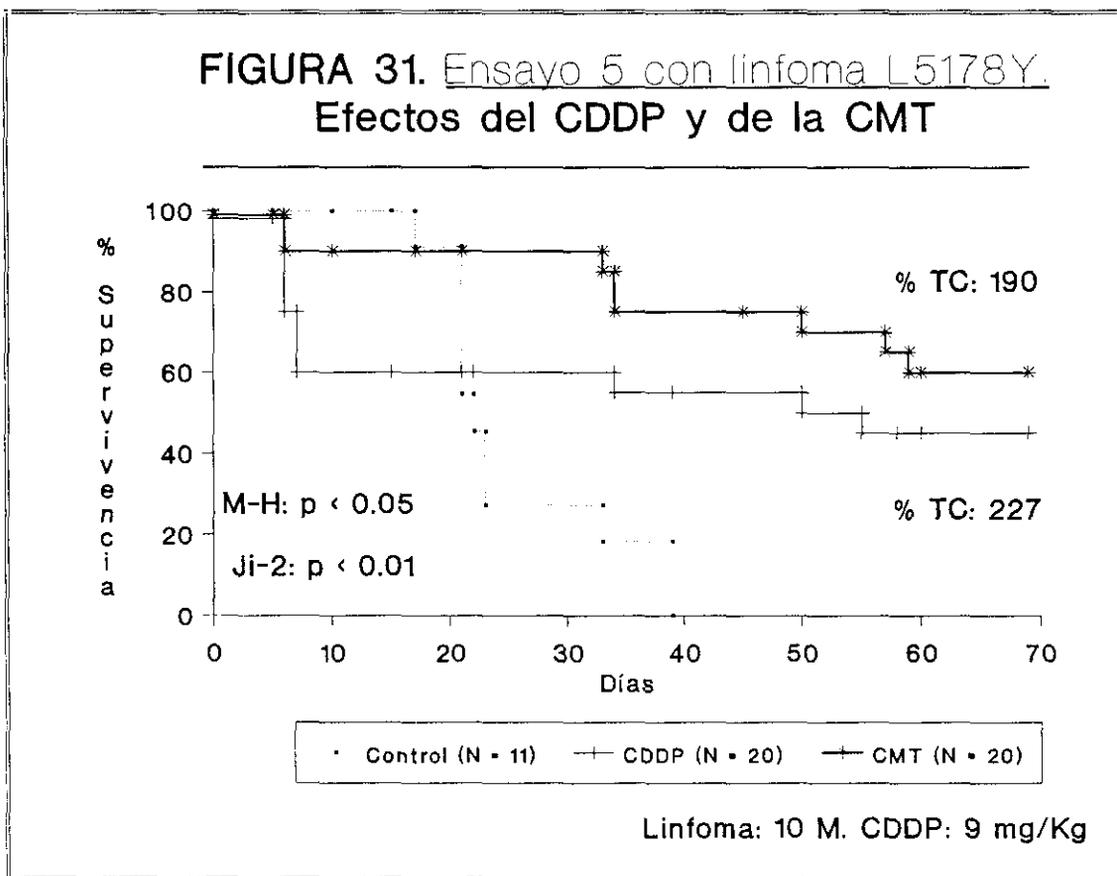
Las mediciones de las áreas tumorales en el curso del Ensayo n° 4, repetidas en los días 9, 15, 22, 29 y 36, aparecen en la **Figura 30**. De nuevo, existió evidencia estadística de que el linfoma L5178Y es un tumor con clara capacidad evolutiva, aunque su progresión es más acusada ( $p < 0.05$ ) a partir del día 22. Por el contrario, en cualquiera de los dos grupos terapéuticos, el análisis de varianzas indica que no hay un crecimiento estadísticamente significativo a lo largo del tiempo,

de forma que se constata que la progresión del linfoma L5178Y desaparece bajo tratamiento con CDDP, independientemente de si éste se combina con Cimetidina o no. Las comparaciones a lo largo del período de observación indican masas tumorales siempre de mayor tamaño, ya en el día 9 ( $p < 0.05$ ), y más claramente en días posteriores ( $p < 0.01$ ), a favor de cualquier rama de tratamiento con CDDP, pero en cambio no se comprueban diferencias estadísticamente significativas entre las evoluciones de los ratones tratados sólo con CDDP o también con Cimetidina, aunque la **Figura 30** diera incluso la impresión de que la actividad antitumoral del CDDP se reforzaba en presencia de CMT.



En parte por el resultado que acabamos de exponer, y con el fin de confirmar en un mayor número de animales los resultados de los Experimentos 3 y 4, se llevó a cabo un 5º ENSAYO prospectivo, con el mismo diseño que el inmediato anterior, pero incluyendo 11 ratones en el grupo control y 20 animales en cada uno de los dos grupos expuestos a CDDP con o sin Cimetidina. Se generaron las curvas de supervivencia que contiene la **Figura 31**. El método de M-H descubre diferencias significativas, con  $p < 0.05$  entre el grupo control y el grupo de CDDP, y con

$p < 0.001$  entre los grupos control y de Cimetidina; en cambio no hay diferencia apreciable entre las curvas de las dos ramas terapéuticas. Todos los ratones del grupo control fallecen por progresión tumoral, con una mediana de 22 días. En el grupo de CDDP mueren 11 ratones, pero ocho de ellos lo hacen en la primera semana de observación, y tan sólo 3 mueren por progresión tumoral, con una mediana de 50 días. Entre los ratones tratados con CDDP y Cimetidina hay dos pérdidas (10%) por muerte precoz, y seis más (otro 30%) fallecen por efecto del tumor, con una mediana de 42 días. De esta manera, los % TC son de 227 para el CDDP y de 190 para la combinación CDDP-CMT.



Las tasas de remisión completa sostenida más allá del día 60, son de 0%, 45% y 60% en los respectivos grupos control, CDDP y CDDP-CMT. En la **Tabla XIV** se exponen los resultados de las mediciones de tumores realizadas en los días 9, 15, 22 y 36 del Experimento 5°.

**TABLA XIV.** Linfoma L5178Y. Expto n° 5. Areas tumorales medidas en cm<sup>2</sup>, en relación con CDDP (9 mg/Kg) y Cimetidina

|           | Día 9 | Día 15 | Día 22 | Día 36 |      |
|-----------|-------|--------|--------|--------|------|
| Controles | 4.75  | 11.76  | --     | --     |      |
|           | 4.48  | 9.25   | 18.60  | --     |      |
|           | 4.32  | 7.92   | 9.00   | 14.08  |      |
|           | 4.00  | 7.82   | 12.58  | --     |      |
|           | 3.90  | 7.70   | 16.17  | --     |      |
|           | 3.60  | 7.75   | 15.84  | --     |      |
|           | 3.60  | 9.25   | --     | --     |      |
|           | 3.50  | 8.40   | --     | --     |      |
|           | 3.25  | 9.36   | --     | --     |      |
|           | 2.34  | 10.23  | --     | --     |      |
|           | 2.28  | 6.12   | 10.08  | 13.20  |      |
|           | CDDP  | 2.60   | 2.34   | 1.65   | 2.34 |
|           |       | 1.80   | 2.85   | 3.78   | --   |
| 1.76      |       | 2.04   | 1.54   | 0.42   |      |
| 1.76      |       | 4.34   | 5.12   | 4.80   |      |
| 1.70      |       | 1.98   | 1.62   | 1.53   |      |
| 1.70      |       | 1.50   | 0.56   | 0      |      |
| 1.68      |       | 3.40   | 5.67   | 5.67   |      |
| 1.40      |       | 1.87   | 2.16   | 5.10   |      |
| 1.35      |       | 2.28   | 2.20   | 9.57   |      |
| 1.20      |       | 1.32   | 0.88   | 0      |      |
| 0.96      |       | 0.96   | 0.72   | 0      |      |
| 0         |       | 0      | 0      | 0      |      |

**Nota:** Continúan en la siguiente página las mediciones correspondientes al grupo tratado con CMT.

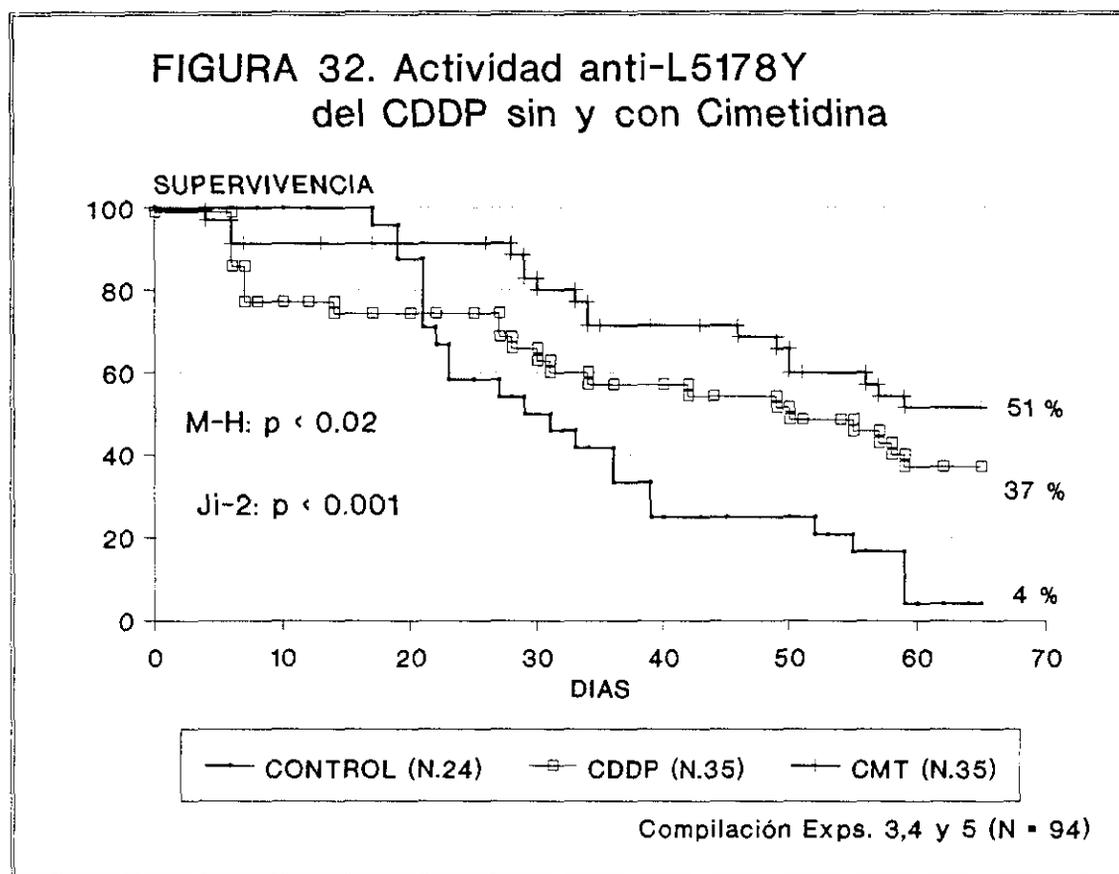
Donde aparezca un signo --, se indica que el animal había ya fallecido.

**Tabla XIV (Cont.): Experimento 5. Mediciones de áreas tumorales en dependencia de la Cimetidina**

|     | Día 9 | Día 15 | Día 22 | Día 36 |
|-----|-------|--------|--------|--------|
| CMT | 2.16  | 2.47   | 2.34   | 4.80   |
|     | 1.92  | 1.60   | 1.40   | 0      |
|     | 1.76  | 2.73   | 2.28   | 4.60   |
|     | 1.65  | 1.92   | 1.20   | 1.58   |
|     | 1.65  | 2.34   | 1.76   | 2.72   |
|     | 1.54  | 1.95   | 2.34   | 4.80   |
|     | 1.50  | 4.06   | 5.44   | --     |
|     | 1.40  | 5.44   | 7.98   | --     |
|     | 1.40  | 2.52   | 3.20   | 3.40   |
|     | 1.30  | 2.04   | 1.87   | 3.47   |
|     | 1.17  | 0.84   | 0.56   | 0      |
|     | 1.17  | 1.26   | 1.90   | 3.52   |
|     | 1.17  | 1.50   | 1.44   | 1.60   |
|     | 1.04  | 2.52   | 2.52   | 7.92   |
|     | 1.04  | 2.64   | 4.00   | 10.92  |
|     | 1.04  | 1.04   | 1.04   | 2.66   |
|     | 0.80  | 1.56   | 1.96   | 4.10   |

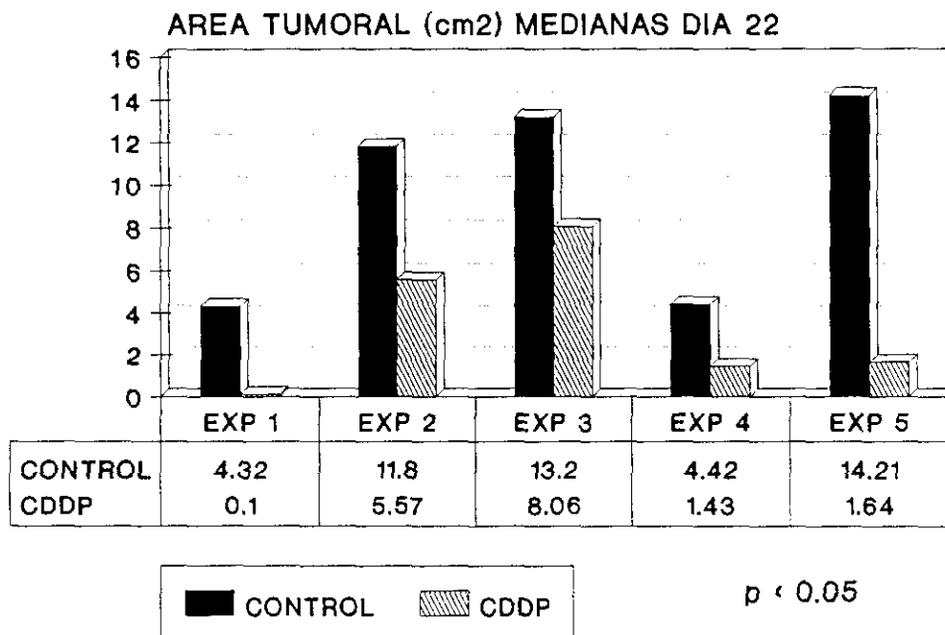
La valoración estadística, como en ensayos previos, confirma que el linfoma evoluciona espontáneamente de forma progresiva, ya desde el día 9º en adelante. Por contra, en el grupo que recibe CDDP no se detecta progresión tumoral en ningún punto del análisis; y en el grupo de CMT se detecta un crecimiento significativo, pero por test de Newman-Keuls se comprueba que este crecimiento sólo es ostensible ( $p < 0.05$ ) entre los días 22 y 36, esto es más tardíamente que en el grupo control. Comparativamente, cualquier forma de tratamiento con CDDP es capaz de reducir el tamaño de las masas linfomatosas en todos los días de observación ( $p < 0.01$  en todos los casos), y de nuevo no existen diferencias apreciables entre la rama de CDDP y la combinación de éste con CMT.

Los resultados de los experimentos 3, 4 y 5, que involucraron a 94 ratones DBA/2 tratados de un modo relativamente homogéneo, se han compilado para confeccionar la **Figura 32**, que representa las supervivencias de ratones inoculados con diez millones de células tumorales L5178Y, bien sin otro tratamiento, bien en grupos que han recibido además CDDP o una pauta con CDDP y Cimetidina; se han compilado ratones tratados con CDDP a dosis variables de 9 ó 10 mg/Kg, pero la dosis y el esquema de Cimetidina se ha mantenido invariable. La comparación estadística entre la curva del grupo control y las dos curvas restantes, tanto por el método de M-H, como si tenemos en cuenta sólo las proporciones de tumores curados (test de  $Ji^2$  aplicado en el día 60), revela una diferencia significativa a favor de cualquier tratamiento con CDDP. Sin embargo, no se aprecian diferencias significativas entre las curvas asociadas con el CDDP sólo o con la combinación del mismo con Cimetidina. Desestimando las muertes por nefropatía tóxica, las medianas de supervivencia de los ratones fallecidos en cada grupo de estudio fueron: 27 días para el control, 36 días para el CDDP, y 40 días para la combinación CDDP-CMT; de esta forma, los % TC son 133 y 148 para los dos respectivos grupos terapéuticos.



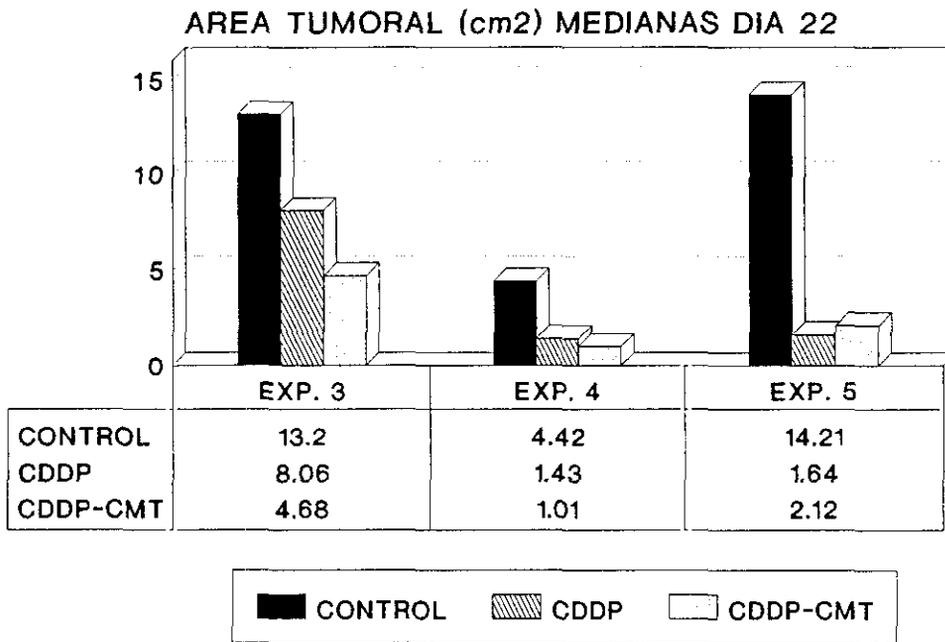
Los resultados de las mediciones del tumor en el día 22, en los Experimentos 2 a 5 (en los que se inocularon diez millones de células linfomatosas), se recopilan en la **Figura 33**. Puede observarse que, con la lógica variabilidad experimental, paliada siempre por la inclusión de un grupo control, el CDDP se muestra capaz de reducir significativamente las áreas tumorales, expresadas como medianas en el día 22 de observación. Todas las comparaciones previas por análisis de varianzas para el factor tratamiento, y el contraste de las medianas por test no paramétricos en el día 22 revelan diferencias estadísticamente significativas a favor del tratamiento con CDDP.

**FIGURA 33.** Efectividad del CDDP frente al linfoma L5178Y (N = 138)

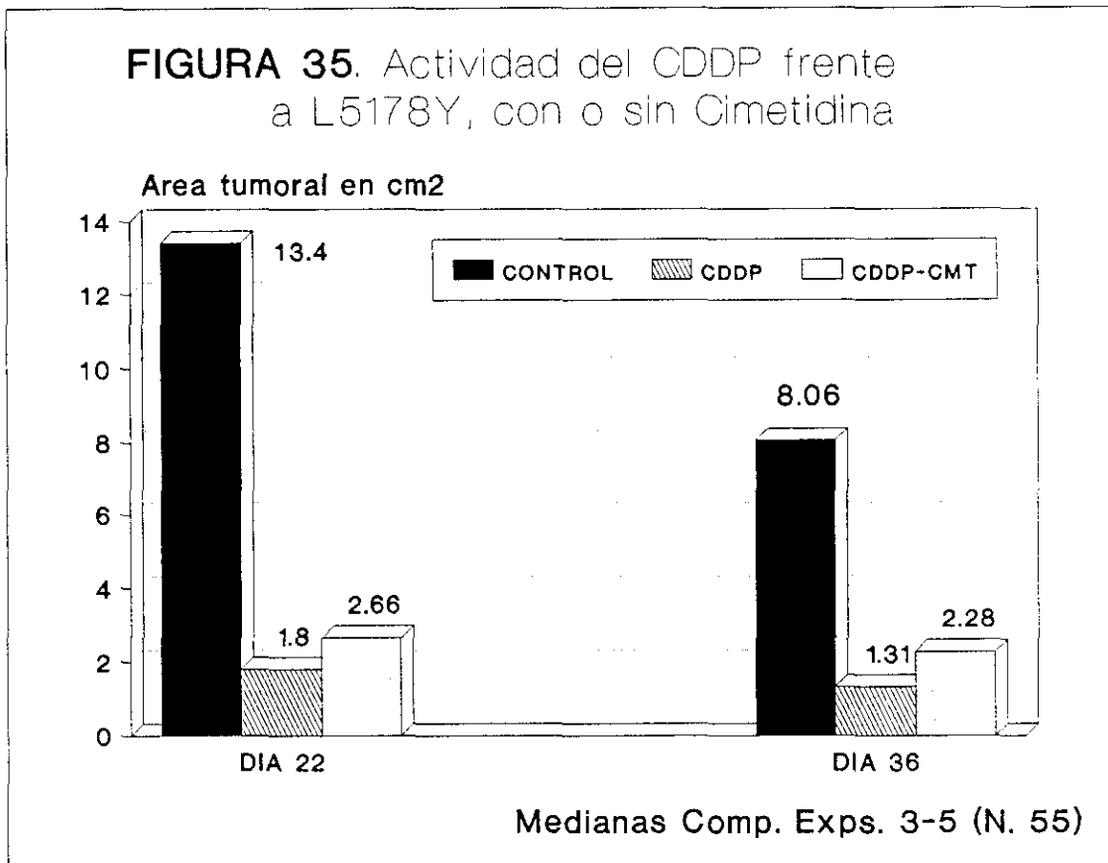


Análogas representaciones de las áreas tumorales observadas en los Experimentos 3, 4 y 5 (todos ellos involucrando a ratones tratados con Cimetidina en asociación con CDDP) se refleja en las **Figuras 34 y 35**. Como confirmación puntual del análisis de varianzas, las medianas de las áreas tumorales en los días 22 y 36 fueron significativamente distintas en todos los estudios, indicando que el CDDP es activo frente al linfoma L5178Y, sin que la Cimetidina interfiera apreciablemente sobre su capacidad para inducir remisiones del tumor.

**FIGURA 34.** L5178Y EN RATONES DBA2  
ACTIVIDAD DEL CDDP CON Y SIN CIMETIDINA



**FIGURA 35.** Actividad del CDDP frente a L5178Y, con o sin Cimetidina



#### 4. RESULTADOS DEL ENSAYO CLINICO

Se analizaron los efectos de una quimioterapia basada en el Cisplatino como único agente nefrotóxico sobre las cifras de creatinina y magnesio séricos en 45 pacientes, sometidos aleatoriamente a tratamiento convencional o a recibir Cimetidina en combinación con CDDP, tanto tiempo como se prolongase la quimioterapia. Ambos grupos terapéuticos estaban bien balanceados antes de iniciar el ensayo, con una ligera diferencia en la distribución de los tipos de neoplasias en ambos, que no se consideró trascendente para interpretar los resultados. El objetivo principal, que era valorar las repercusiones bioquímicas de al menos 4 ciclos de quimioterapia, se consiguió en el 71% de los pacientes de la rama control y en el 83% de los pacientes tratados con Cimetidina; los pacientes que no alcanzaron tal número de ciclos experimentaron progresión del tumor durante el tratamiento con CDDP, y también fueron tenidos en cuenta. No hay diferencias significativas según el test exacto de Fisher entre estas proporciones. Varios enfermos, sobre todo de la rama con Cimetidina, pudieron recibir más de 4 ciclos de quimioterapia, pero sus muy diferentes situaciones desde el punto de vista oncológico, hicieron imposible la evaluación ulterior de sus parámetros bioquímicos en una forma sistemática.

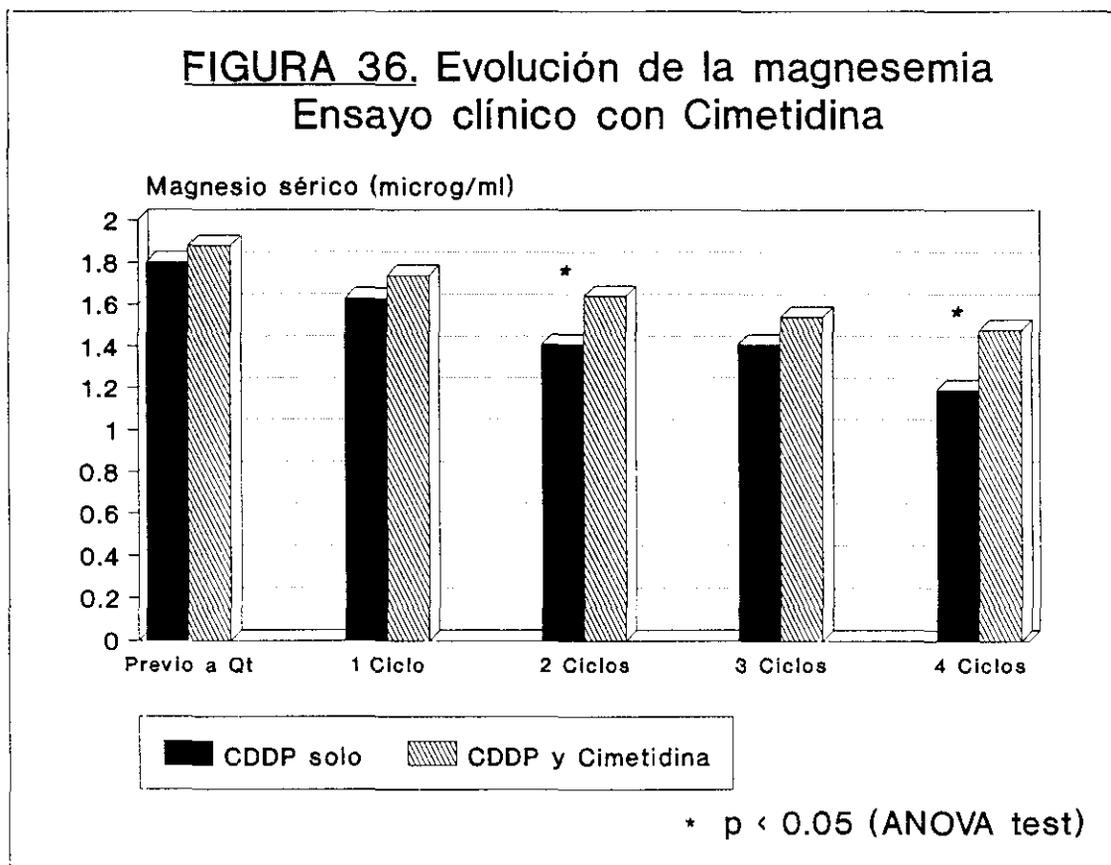
##### 1) Datos de magnesio.

En la **Figura 36** se recoge la evolución de las cifras de magnesio sérico en ambos grupos de tratamiento. Se han representado las medias aritméticas, verificándose que las desviaciones estándar fueron de magnitud irrelevante. El análisis de varianzas interno en el grupo control indica una disminución progresiva de la magneemia, que reviste significación estadística en cada uno de los ciclos ( $p < 0.01$ ), indicando que la hipomagneemia en estos pacientes es un fenómeno de instauración precoz y de intensidad evolutiva a lo largo del tratamiento. Dentro del grupo sometido a tratamiento con Cimetidina, también se comprueba un descenso paulatino de los niveles de magnesio sérico, aunque sólo a partir del 2º ciclo de tratamiento adquiere significación estadística.

Al comparar las dos series, resulta una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) a favor de que los pacientes tratados con Cimetidina mantienen cifra de magnesio más elevadas que los del grupo control; la diferencia se concreta en el momento en que los pacientes han recibido 2 ciclos de quimioterapia ( $p < 0.05$ ) y se amplía cuando reciben 4 cursos de tratamiento ( $p < 0.01$ ). Los test de Wilcoxon en ambos puntos arrojan el mismo resultado.

En el grupo control, de los 16 pacientes que llegan a recibir 4 ciclos de quimioterapia, 10 enfermos exhiben magnesemias inferiores a 1.20 microgramos/ml (62%), y entre ellos 3 enfermos (18%) llegan a tener magnesemias inferiores a 1 microgramo/ml. En el grupo tratado con Cimetidina, sólo 3 de los 20 enfermos que completan al menos 4 cursos de terapia devienen a cifras de magnesio sérico inferiores a 1,20 microgramos/ml (15%), y una magnesemia por debajo de 1.0 microgramo/ml sólo afectó a uno de ellos (5%).

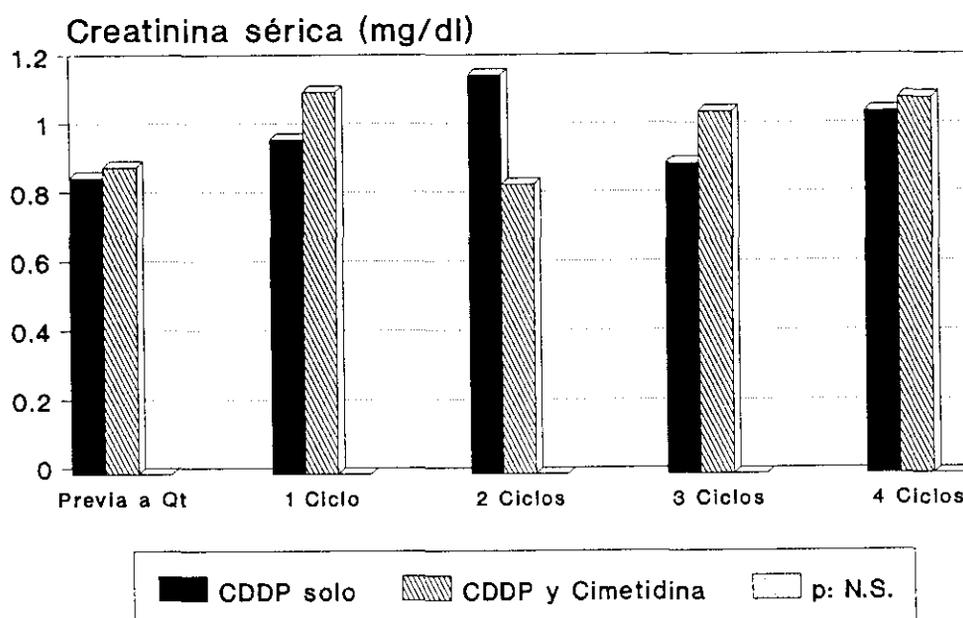
Cuando la evolución de los enfermos permitió seguirlos al término de los 4 ciclos de CDDP, en ausencia de otros tratamientos potencialmente nefrotóxicos, se observó que el 75% de los pacientes que entran en situación de hipomagnesemia llegan a recuperarse de ella en un plazo variable de 2 a 12 meses (mediana de 5 meses). En cambio, un 25% de los enfermos persisten hipomagnesémicos al cabo de 12 meses. Este patrón evolutivo fue prácticamente idéntico en las dos ramas terapéuticas del ensayo.



## 2) Datos de creatinina sérica.

La evolución de las creatininemias de los dos grupos terapéuticos, expresadas en medias aritméticas, se representan en la **Figura 37**. Como en el caso de las cifras de magnesio, las desviaciones estándar de estas medias fueron muy pequeñas. El análisis estadístico confirma una elevación progresiva de la creatinina en el grupo control ( $p < 0.05$ ), aunque una comparación múltiple sólo demostró diferencias significativas entre las cifras previas a la quimioterapia y las que se obtuvieron después de 4 ciclos de quimioterapia. Un fenómeno similar se constató en el grupo sometido a tratamiento con Cimetidina ( $p < 0.01$ ). Esto sugiere que la azoemia en estos paciente es una toxicidad que evoluciona de forma más solapada, con alteraciones menos perceptibles de uno a otro ciclo, que la hipomagnesemia antes descrita.

**FIGURA 37.** Evolución de la creatinina  
Ensayo clínico con Cimetidina y CDDP



La comparación estadística mediante test de Newman-Keuls basado en las varianzas de las muestras no demostró diferencias estadísticamente significativas en ningún punto del seguimiento de los pacientes.

El número de pacientes que en cada brazo terapéutico llegó a exhibir creatininemias superiores a 2.0 mg/ml fue de 2 (8.3%) y de 3 (14.3%) en los brazos control y con Cimetidina, respectivamente, lo que no alcanza significación estadística. Más del 90% de estos enfermos retornaron en pocos meses a cifras de creatinina en todo caso muy próximas a la normalidad.

### 3) Datos de respuesta y de toxicidad.

Aunque el ensayo no se diseñó para analizar específicamente las tasas de remisión tumoral en presencia de Cimetidina, de hecho no se observó ninguna variación apreciable del patrón de respuesta de los enfermos en ninguna de las dos ramas terapéuticas. Salvo en casos de adyuvancia (restringidos a carcinomas ováricos en etapa III de la FIGO sin enfermedad residual tras la laparotomía primaria), en los demás tumores se observó una tasa de remisiones similar a la esperable, independientemente del brazo terapéutico al que se asignó al enfermo.

La toxicidad fue concordante con la bien conocida de estos tratamientos. En la **Tabla XV** se resumen las toxicidades más relevantes recogidas en estos enfermos. Se señalan sólo las toxicidades de grado 2 ó superior según la escala convencional de la OMS.

**TABLA XV.** Toxicidades encontradas en el ensayo clínico de CDDP versus protección con Cimetidina

|              | Rama Control<br>N = 24 | Grupo con CMT<br>N = 21 |
|--------------|------------------------|-------------------------|
| Emesis       | 12                     | 9                       |
| Neutropenia  | 9                      | 8                       |
| Alopecia     | 4                      | 6                       |
| Parestesias  | 6                      | 3                       |
| Ototoxicidad | 3                      | 2                       |
| Mucositis    | 4                      | 5                       |

Refirieron cuadros de astenia profunda, no atribuibles a estados de mielosupresión, cuatro pacientes de la rama control (16%) y sólo una enferma de la rama con Cimetidina. Hubo dos cuadros con calambres musculares intensos y signos de tetania neuromuscular que requirieron atención hospitalaria, uno en cada rama terapéutica, coincidentes con magnesemias de 0.82 y de 0.95 microgramos/ml, respectivamente. No asistimos a ningún cuadro convulsivo.

Se produjo una muerte tóxica en cada grupo del ensayo, en ambos casos a resultas de neutropenia g.4 (una enteritis neutropénica en la rama con Cimetidina y una neumonía por gramnegativos en el grupo control). Otro enfermo del grupo control falleció como consecuencia de un infarto agudo de miocardio después del tercer ciclo de quimioterapia. No se apreció ninguna toxicidad atribuible al uso prolongado de Cimetidina.

**VI. DISCUSION Y  
COMENTARIOS**

## DISCUSION Y COMENTARIOS

### 1. COMENTARIOS GENERALES

El fallo renal agudo es un síndrome de pronóstico variable al que a menudo debe enfrentarse el oncólogo médico (4). Entre sus posibles etiologías siempre es necesario contemplar la nefrotoxicidad asociada al uso de ciertos citostáticos (5-7). Entre ellos ocupa un lugar preeminente el Cisplatino (CDDP), implicado en estados de FRA y en lesiones renales permanentes desde los primeros momentos de su introducción en la clínica (21,54,76,81,87,103,104). Es también destacable que el riesgo de nefrotoxicidad se acentúa cuando el CDDP se combina con otros fármacos de uso frecuente como los aminoglucósidos (168,225). Aunque la importancia relativa de estos fenómenos está en constante revisión (59,102), es cierto que tradicionalmente se ha venido considerando que el desarrollo clínico del CDDP no hubiera sido posible si no se hubiesen descubierto métodos para contrarrestar su nefrotoxicidad (8,53,80). El proceder más clásico, que aún hoy condiciona el uso rutinario de CDDP en todos los hospitales, consiste en una hidratación abundante del paciente (123-127), a pesar de lo cual se siguen viendo cuadros de uremia más o menos duradera y estigmas químicos y clínicos de tubulopatía tóxica (97,100,122,211).

Precisamente por la importancia clínica que todavía hoy reviste la nefropatía tóxica por CDDP, este campo suscita numerosas investigaciones en orden a determinar los mecanismos de resistencia celular al CDDP, y también en busca de sustancias que ejerzan un efecto nefroprotector al combinarlas con CDDP (16,135, 172-174). Acerca de los fenómenos biológicos que subyacen en la resistencia al CDDP, desgraciadamente el conocimiento es aún fragmentario e insuficiente. Se investiga en las bases genéticas de tales fenómenos (30,31,171,172), pero aún no se ha logrado una transmisión a la práctica clínica (226,227). Se ha querido aclarar el papel de la metalotioneína -una proteína encargada de procesos de detoxificación frente a metales pesados- en el control de la toxicidad por CDDP (155,156); varios autores han intentado incrementar la expresión de metalotioneína mediante diversas sustancias (30,157-162). En todo caso, ninguno de estos métodos está cercano a la clínica en la actualidad.

Hoy es un campo de amplios horizontes la modulación farmacológica de la nefropatía por CDDP, aunque su expansión está limitada por el aún incompleto conocimiento que tenemos acerca de la patogenia del daño renal por

Cisplatino. Generalmente se acepta que existe un fracaso glomerular agudo muy rápidamente seguido de una necrosis tubular aguda, siendo ambos fenómenos en buena medida independientes (79,84,90,92,97,103). En los últimos años se ha reportado que numerosos fármacos, con estructuras químicas muy diferentes entre sí, son capaces de aliviar la severidad de la nefrotoxicidad del CDDP, tanto en su aspecto glomerular como en su dimensión de tubulopatía tóxica. Se han estudiado más extensamente los agentes donadores de grupos sulfurados (136-152), aunque sólo dos de ellos han demostrado su utilidad en clínica: el tiosulfato (137,138) y más recientemente el glutathione (153,228). Sin embargo, la lista de sustancias supuestamente nefroprotectoras se hace interminable: antagonistas de receptores histamínicos (134,166), bloqueantes del calcio (163, 203,204), antibióticos como la fosfomicina (116,120,183,184,187), uricosúricos como el probenecid (165), inhibidores de proteinasas como la urinostatina (229), y otros virtualmente inclasificables del tipo de procaína (230), heparina (17), piperacilina (231), o clorpromazina (232).

La gran mayoría de estos fármacos no han accedido al terreno clínico, y quizás antes de que se ensayen clínicamente aparezcan nuevos hipotéticos moduladores de la tubulopatía por CDDP, como ciertos aminoácidos o algunos aminosteroides antioxidantes (233,234). Tal dispersión de los esfuerzos investigadores en este terreno ha generado cierto escepticismo en la bibliografía reciente (154,173). Quizás el factor que más interesaría evitar es la discordancia que existe entre la investigación básica y la aplicación clínica de los fármacos nefroprotectores. Es difícil de entender que algunos se hayan empleado en clínica sólo conociendo algunos aspectos de su farmacocinética (134,166), o cuando existía la posibilidad real de que interfiriesen la actividad antitumoral del CDDP (186,120,187), o sin haberse contrastado la hipótesis de que la combinación de CDDP con el supuesto nefroprotector añadiese más toxicidad que la quimioterapia en sí (134,164,190).

Afortunadamente, se han descrito múltiples modelos experimentales que reproducen con suficiente fidelidad los cambios patológicos de la NTA por CDDP (10); entre ellos el de la rata de laboratorio tratada con una dosis única de CDDP se ha extendido mucho como "banco de pruebas" para testar la eficacia nefroprotectora de diversos fármacos (86,110,158,164,182,191,193,195,204,233). Además, se han descrito múltiples tumores experimentales frente a los que el CDDP es activo (136, 189,206,208,210), y que pueden servir para comprobar que los fármacos hipotéticamente nefroprotectores no implican una reducción del poder citocida del CDDP. Así, no extraña que los estudios sean cada vez más completos y rigurosos desde el punto de vista metodológico, al testar simultáneamente ambos aspectos de las sustancias nefromoduladoras, antes de proceder a su recomendación para el uso clínico (149,151,176,232).

Esta Tesis participa de esta exigencia metodológica. Hemos querido testar si la Cimetidina, la Fosfomicina y los Glucocorticoides poseen la capacidad de modificar el curso de la nefropatía aguda por CDDP en la rata Wistar. Y en un segundo paso, quisimos comprobar que aquellas sustancias capaces de aminorar la nefrotoxicidad del CDDP en la rata, al mismo tiempo no interfieren con la actividad antitumoral del CDDP frente al linfoma L5178Y implantado en ratones DBA/2. Pero propusimos un paso adicional, al intentar comprobar la utilidad clínica de la Cimetidina como protector frente a la hipomagnesemia secundaria a tubulopatía inducida por CDDP en el humano. Los resultados de esta Memoria son a continuación objeto de comentarios específicos.

## 2. DISCUSION DE RESULTADOS EN RATA WISTAR

Dejando al margen modelos *in vitro* de evaluación de la citotoxicidad por CDDP (194), ya se ha mencionado aquí que la rata de laboratorio representa un modelo muy extendido para reproducir experimentalmente la nefropatía por CDDP, y ha sido ya utilizado en España para tal propósito (17,176), por su asequibilidad económica y fácil manejo práctico. Seleccionamos la vía intraperitoneal porque el CDDP se absorbe perfectamente a través de ella, según se conoce por datos experimentales y clínicos (20,39,197,235,236). La vía intravenosa para administrar el CDDP a las ratas se ha empleado en otros estudios (150,164,181,182), pero a nuestro juicio sólo añade dificultades prácticas. Empleamos ratas hembra de la misma edad y peso aproximados, porque el CDDP puede ser más tóxico en las ratas más jóvenes (93,237), y asimismo empleamos siempre ratas hembras, pues en otros modelos se han observado diferencias de severidad de la nefropatía en razón del sexo (95).

La rata Wistar, en respuesta a una dosis única de CDDP i.p., desarrolla un estado agudo de uremia cuyo sustrato patológico es una necrosis tubular aguda con daño preferente de los túbulos proximales (10). Se acepta que este efecto es dosis/dependiente, de modo que no se objetiva con dosis inferiores a 1 mg/Kg (110), y es paulatinamente más evidente con dosis situadas en el rango de 2 mg/Kg a 20 mg/Kg (177, 191), Los casos más leves se describen por una insuficiencia renal que alcanza en 4-5 días su máxima severidad, para luego dar paso a una recuperación total en el plazo de días o semanas. Sin embargo, es posible inducir estados de insuficiencia renal terminal que provocan el fallecimiento de los animales en menos de 8 días (195).

Los estudios discrepan en cuanto a las dosis necesarias para inducir un determinado umbral de efectos; así, no hay un consenso sobre las dosis requeridas para conseguir un 50% de letalidad, ni tampoco se ha descrito una  $DL_{100}$  aceptada por todos los autores. No hay duda del potencial nefrotóxico de dosis únicas de 5 mg/Kg (156,193,234). Se han reportado dosis  $DL_{50}$  del orden de 6 mg/Kg (139,207), de 6,5 mg/Kg (140), de 7,7 mg/Kg (195), de 10,8 mg/Kg (120), y hasta de 12 mg/Kg (191). Otros han considerado que 6,5 mg/Kg representa sólo la mitad de la  $DL_{50}$  (17,205). Estas variaciones pueden deberse al solvente en que se vehicula el CDDP, pues éste tendrá quizás mayor toxicidad disuelto en agua destilada que en suero salino (18); también pueden atribuirse a diferencias en la edad de los animales (93,237), o quizás a oscilaciones fisiológicas relacionadas con ritmos circadianos (36). En cualquier caso, repetidos datos de la bibliografía establecen que la  $DL_{50}$  de una sola dosis de CDDP en ratas de laboratorio oscila de 5 a 10 mg/Kg (188), y que dosis de 11 a 13 mg/Kg pueden provocar la muerte de hasta el 80% de los animales (36). Sin embargo, la experiencia de nuestro grupo es que se requiere llegar a 20 mg/Kg para provocar conspicuamente una mortalidad del 100% (176). Por tanto, aún sin efectuar un análisis específico de esta cuestión, seleccionamos la de 20 mg/Kg como  $DL_{100}$ , cuyos efectos deberían modificar los fármacos hipotéticamente nefroprotectores. Esta metodología no es habitual en los estudios sobre este problema, que suelen efectuarse a escalones de dosis mucho más bajos. Por ello, para un estudio más detallado a nivel bioquímico y morfológico, seleccionamos la dosis de 7 mg/Kg como una dosis claramente nefrotóxica, muy cercana a la  $DL_{50}$ .

El ENSAYO 1<sup>o</sup> mostró que las ratas tratadas con CDDP disuelto en agua destilada sufren una letalidad extensa y rápida, afectando al 100% de los animales con dosis de 20 mg/Kg; la curva de supervivencia de estos animales, y su tasa de supervivencia al 12<sup>o</sup> día de observación, son manifiestamente más desfavorables que los mismos parámetros de los animales expuestos a agua destilada tan sólo o a Carboplatino, alcanzándose entre ellos diferencias estadísticamente muy significativas. Pensamos que este modelo fácilmente reproducible representa una forma idónea de evaluar la nefrotoxicidad por CDDP, y fundamentalmente nos apoyamos en tres razones:

1<sup>a</sup>. Los animales que reciben sólo agua destilada por vía i.p., a volúmenes equiparables, no padecen mortalidad alguna (Figura 13), por lo que concluimos que el procedimiento técnico en sí mismo no entraña complicaciones mecánicas o infecciosas que pudieran invalidar el modelo experimental.

2<sup>a</sup>. Las ratas que reciben Carboplatino (ver la misma **Figura 13**) exhiben un patrón de mortalidad diferente. Prácticamente no existen muertes precoces, lo que está de acuerdo con experiencias previas de nuestro grupo, en que este fármaco provocó lesiones renales de grado a lo sumo intermedio (176), pero sin mortalidad asociada. En cambio, varios animales fallecen al cabo de 12 ó más días, verosímilmente a raíz de un fracaso hemopoyético.

3<sup>a</sup>. En la necropsias de los animales que mueren en respuesta a un tratamiento con CDDP, sólo se encuentran lesiones significativas en el riñón (**Figuras 15 y 16**). Las mismas coexisten con una importante dilatación gástrica que se ha usado como modelo experimental para testar la eficacia de fármacos antieméticos (238), pero en todo caso no se aprecian lesiones en otros órganos vitales.

Sentada la validez de este modelo de letalidad por CDDP en rata Wistar, partimos de la idea de que cualquier sustancia con propiedades nefroprotectoras debería, en principio, ser capaz de alterar el patrón de mortalidad ya descrito, en el sentido de que la dosis que antes se comportó como  $DL_{100}$  dejase en el futuro de provocar la muerte del 100% de los animales. En el ENSAYO 2<sup>o</sup> quisimos probar el efecto del suero salino isotónico, un método cuya eficacia se había establecido experimentalmente y que se emplea rutinariamente en clínica (18,82,87). La **Figura 17** refleja que al diluir el CDDP en suero salino se reduce la mortalidad al 70% de la que provoca la misma dosis de CDDP vehiculado en agua destilada. Existe entre las curvas una diferencia estadísticamente significativa y por tanto concluimos que el suero salino isotónico ejerce un efecto beneficioso sobre la nefrotoxicidad por CDDP. Para explicar este efecto nefroprotector se han invocado distintos mecanismos. El más simple es que una diuresis más profusa hace más improbable el contacto del CDDP filtrado con las células renales (6,82). Otros han sugerido que el medio rico en iones cloruro favorece la estabilidad del CDDP, en el sentido de evitar la aparición de especies acuáticas más reactivas y por tanto más tóxicas (15,129); así, una cloruresis muy elevada daría lugar en el tejido renal a una mayor concentración de formas químicas detoxificadas del CDDP, lo que tendería a mejorar el índice terapéutico del fármaco (18,19,79,119). Recientemente se ha cuestionado este último mecanismo, puesto que ratas diabéticas que presentan poliuria, pero con cloruresis anómalamente bajas, soportan bien una dosis de CDDP que en otros animales sería claramente nefrotóxica (108). Es muy posible que la acción nefroprotectora de la hidratación (en este caso, con suero salino) obedezca a cambios hemodinámicos, que pudieran consistir en una vasodilatación y aumento del flujo plasmático renales (108), o también en una hiperproducción de péptido natriurético atrial, al que se han atribuido funciones antitóxicas frente al CDDP (175).

Nuestro estudio no se diseñó para esclarecer estas cuestiones fisiopatológicas y no aporta ningún dato adicional, pero en todo caso quedó para nosotros establecido que el CDDP disuelto en salino isotónico debería ser siempre en lo sucesivo el tratamiento tomado como "control", porque remeda siquiera de lejos lo usual en la práctica clínica (13), y nuestro objetivo era determinar si algún nuevo fármaco nefroprotector iba a aportar alguna ventaja a los esquemas convencionales de hidratación con suero salino isotónico, sin esperar que alguno de ellos exhibiese un potencial nefroprotector capaz de sustituir a una medida ya ampliamente contrastada.

Sobre este modelo general, quisimos analizar el efecto modulador de la Cimetidina (CMT), de la Fosfomicina (FOS) y de la Metilprednisolona sobre la nefropatía aguda por CDDP. Por medio del ENSAYO 3<sup>o</sup> quisimos comprobar si nuestros animales de experimentación podían recibir dosis altas de estos fármacos sin que aparecisen efectos adversos que pudieran interferir la interpretación de los resultados. Todos los animales tratados con los fármacos en cuestión sobrevivieron a estas pruebas terapéuticas, y la tolerancia se puede considerar buena. Las ratas tratadas con una dosis alta de Cimetidina parecían quedar un tanto apáticas durante varios minutos, a lo sumo dos horas. Las que recibieron Fosfomicina y Metilprednisolona mostraban ligeros signos de peritonismo hacia el tercer día de administración de esos fármacos. No obstante, quedó para nosotros establecido que los 3 grupos de fármacos a ensayar eran suficientemente seguros como para testarlos en combinación con CDDP, frente al CDDP en solitario (siempre disolviendo el citostático en suero salino isotónico).

El primer fármaco que nos interesó ensayar fue la Cimetidina (CMT). Un ensayo clínico publicado en 1987 había planteado el posible efecto nefroprotector de la CMT junto con Verapamil, con un resultado favorable sobre parámetros como el flujo plasmático renal efectivo, la tasa de filtración glomerular, y la eliminación urinaria de ciertas enzimas (134). La metodología pudiera ser cuestionada por la no discriminación de efectos de la CMT y el verapamil, porque los parámetros de función glomerular no necesariamente deben reflejar la acción de la CMT, porque las enzimas inducidas por CDDP son malos indicadores de tubulopatía (101,218,219), y porque no se tuvo en cuenta una determinación mucho más útil, cual es la magnesemia al cabo de ciclos repetidos (97,112,122). Pero quizás más relevante es que para dicho ensayo clínico, al menos en lo referente a la CMT, sólo se contaba con datos acerca de la secreción tubular de cimetidina por parte de sistemas enzimáticos para cationes orgánicos situados en la membrana de la célula tubular (43,44), que eran compartidos por el CDDP; y con datos de farmacocinética general de la CMT (178-180). No se

contaba con ninguna base experimental acerca de su hipotética acción nefroprotectora. Posteriormente, en nuestro conocimiento no se han publicado estudios clínicos adicionales con este fármaco y únicamente ha aparecido un trabajo sobre aspectos farmacocinéticos, en concreto acerca de su eliminación renal en el perro (166).

El ENSAYO 4° queda resumido en la **Figura 18**. En él testamos frente al CDDP un esquema de dosis única de CMT, a la dosis e intervalo previo al CDDP señalado en la parca literatura experimental disponible (44). El resultado fue negativo, es decir que la inhibición competitiva del sistema de secreción de cationes orgánicos, por sí misma, no añade efecto beneficioso alguno al suero salino isotónico; hay que reseñar que la dosis de cimetidina de 300 mg/Kg, que en solitario se había asociado con tan sólo una ligera arreatividad a estímulos externos, en este experimento produjo signos de encefalopatía (somnolencia, incoordinación mnotor), de cualquier modo reversible, aunque sin duda más manifiesta que la observada con CMT sola.

Este resultado negativo, dada la corta vida media de la CMT, incluso en condiciones de fracaso renal (202,203), era posible que la inhibición de la secreción tubular de CDDP fuese excesivamente poco duradera. Ateniéndonos a referencias que sugerían una prolongada fijación del CDDP al tejido renal (22,41,201), efectuamos un ENSAYO 5° para testar distintas pautas de dosificación repetida de CMT (ver **Tabla IV** y **Figura 19**). Obtuvimos de nuevo un resultado negativo, lo que nos sugirió que, además de repetir las dosis del compuesto, podría ser importante mantener la dosis administrada dos horas antes del CDDP (44,134).

Así, se llevó a cabo el ENSAYO 6°, donde por primera vez observamos un cierto beneficio en los animales tratados con la pauta CMT 5 con respecto a los que sólo recibían CDDP. Al reducir la dosis inicial de CMT se eludió la encefalopatía observada con el régimen CMT 1. El contraste entre las curvas de CMT 5 y CDDP solo, quedó en el límite de la significación estadística, lo que en ningún otro tratamiento experimental pudo ser observado (ver **Figura 20**). La tasa de animales supervivientes al 12° día parecía también mejorar discretamente, aunque el test exacto de Fisher no reveló diferencias significativas, como por otro lado sucedió con otros tratamientos que, como luego veremos, no exhibían en absoluto ningún efecto nefroprotector frente al CDDP. Estos datos podrían sugerir un cierto papel nefroprotector del esquema CMT 5, siquiera marginal. Para precisar mejor este extremo, una estrategia podría haber sido repetir el ensayo 6° con un mayor número de animales, con el fin de incrementar la fiabilidad del análisis estadístico. Debemos señalar que este procedimiento no es común en la bibliografía revisada, donde se

exponen trabajos realizados con grupos de animales que oscilan entre 5 y 12 individuos (11,19,44,136,138,189,239), e incluso donde en ocasiones es no se reporta formalmente el número de animales empleados en cada experimento (18,120).

Nuestro criterio fue, en principio, aceptar que la Cimetidina, sólo en muy determinadas condiciones farmacocinéticas, puede aportar una protección a la rata Wistar de la nefropatía por CDDP, siquiera con un beneficio marginal con respecto a lo que el salino isotónico proporciona *per se*. Decidimos, en vez de someter más animales a la misma experiencia en esta fase del trabajo, realizar otro tipo de experimentos que aportasen más datos sobre esta posible nefroprotección, por motivos que luego se discutirán. En esta fase de esta Memoria, parecía que aportábamos cierta base experimental al ensayo clínico de Sleijfer y cols (134). Se ha dicho que hay dos tipos de nefroprotectores: por un lado aquellos que ejercen su papel por mecanismos "farmacodinámicos" (el exponente más claro sería el tiosulfato sódico, que se une al CDDP de forma covalente); y por otra parte encontraríamos los de tipo "farmacocinético", que sólo modifican de alguna manera la movilización y distribución del CDDP en el organismo (120,185,187). Aunque tal distinción probablemente es un tanto esquemática (152), nuestros resultados sugerían CMT pertenece al segundo grupo y que su acción nefroprotectora es críticamente dependiente del esquema posológico. Para estudios ulteriores, decidimos que sólo la pauta CMT 5 merecía un estudio más profundo.

Con el ESTUDIO 7º hemos valorado el efecto de dos niveles de dosis de Fosfomicina sobre la nefropatía letal por CDDP. Este antibiótico se había ensayado clínicamente en 1988 por varios autores japoneses (116,186), sobre la base de varios trabajos experimentales previos que sugerían una nefroprotección de tipo "farmacodinámico" (183-185). En el humano se emplearon dosis de aproximadamente 30 mg/Kg cada 12 horas, a lo largo de 4 días, sin especificarse la vía de administración, y se observó una menor eliminación urinaria de N-acetil-beta-D-glucosaminidasa (NAG) en la orina de pacientes con cáncer de pulmón tratados con fosfomicina y CDDP. Por eso elegimos un escalón de 40 mg/Kg para intección ip en ratas, manteniendo los intervalos y la prolongación del tratamiento durante varios días. Experiencias posteriores en ratas sugerían que dosis únicas de 500 mg/Kg eran bien toleradas, disminuyendo tanto la nefrotoxicidad por CDDP como la actividad antitumoral de éste en varios tumores experimentales (120). De ahí la selección de un nivel de dosis FOS 2 en nuestro 7º Ensayo.

Las dos ramas con fosfomicina no aportaron ventaja alguna con respecto al salino isotónico solo. Los animales tratados con la pauta FOS 2 (dosis más altas)

tuvieron si acaso una mortalidad mayor de la esperada, al tiempo que exhibían signos muy floridos de irritación peritoneal. No habíamos observado tal severidad en este fenómeno en el ENSAYO 3<sup>o</sup>, cuando las mismas dosis de fosfomicina se utilizaron en solitario. Por tanto, pensamos que a ciertas concentraciones puede existir una interacción local deletérea entre este antibiótico y el CDDP, y ello nos hizo desestimar la pauta FOS 2 para estudios ulteriores. El mecanismo de la nefroprotección con fosfomicina podría ser una estabilización de las membranas lisosomales en las células del túbulo renal (116), aunque quizás pueda haber acciones sobre sistemas enzimáticos de membrana, que puede lesionar el CDDP (118) y quizás restablecer la fosfomicina (63). Sea como fuere, nosotros no hemos comprobado tal supuesta nefroprotección en nuestro modelo.

Finalmente, con el ENSAYO 8<sup>o</sup> buscamos demostrar un efecto nefroprotector de la Metilprednisolona, que nuevamente había sido ensayada clínicamente antes de contar con bases experimentales (116). Las dosis se eligieron por aproximación a otros usos clínicos, tanto en Oncología (200) como en otras especialidades, y se repitieron varias veces para proteger al riñón de la acumulación diferida de CDDP (22,41,201). El hecho es que no pudimos apreciar ninguna acción favorable, y en el escalón MTP 2 observamos de nuevo un peritonismo exagerado que pudo contribuir a la mortalidad de los animales. Posteriormente se han reportado estudios experimentales con dosis variando de 10 a 250 mg/Kg, esto es bastante mayores que las que hemos empleado nosotros, al parecer con acciones protectoras frente al CDDP (181,182). Estos autores han elegido la vía subcutánea para el corticoide y la vía IV para el CDDP; también han empleado varias dosis repetidas de metilprednisolona, aunque insistiendo en que las primeras dosis fuesen previas a la administración de CDDP; y por último, su modelo consistía en una nefroprotección frente a dosis moderadas de CDDP (de 6,5 a 8,5 mg/Kg). Es posible que estas variaciones justifiquen nuestras observaciones discordantes. El hecho es que, en nuestro modelo, la Metilprednisolona no se muestra capaz de alterar la  $DL_{100}$  de CDDP, y que podría existir una interacción tóxica entre ambos fármacos en la cavidad peritoneal.

Al analizar las tasas de supervivencia que permiten distintos tratamientos al 12<sup>o</sup> día de observación, comprobamos mediante el test exacto de Fisher que sólo la adición de suero salino isotónico al CDDP altera sustancialmente la letalidad inducida por CDDP a la dosis de 20 mg/Kg disueltos en agua destilada. El resto de los tratamientos ensayados se mostraban incapaces de aminorar significativamente la letalidad asociada al CDDP, e incluso en algún caso pudieran

conllevar una mortalidad superior a la esperable, quizás por motivos de toxicidad local, que ya hemos comentado. La literatura experimental consultada no reporta datos toxicológicos comparables, pues las dosis o las vías de administración de la Fosfomicina y de la Metilprednisolona son diferentes, y no existen estudios con Cimetidina a este nivel.

En cualquier caso, desde el punto de vista biológico, nuestros animales exhibían sin duda comportamientos muy distintos según el tipo de tratamiento que recibieron; la validez del análisis estadístico depende críticamente del número de animales estudiados, que en algunos casos fue todo lo bajo que suele ser en este tipo de trabajos, y por consiguiente no se debe tomar como un criterio absoluto para descartar ningún tratamiento. Insistiremos más adelante en este punto.

En el segundo tipo de estudios con rata Wistar, empleamos una dosis de CDDP cercana a la  $DL_{50}$ , ya siempre disuelta en ClNa al 0,9%, considerando por nuestros datos previos que este tratamiento representaría la rama control. En este tipo de estudios, muy extendido en la literatura, se valoran las repercusiones sobre el peso corporal de los animales (151), sobre parámetros bioquímicos como la urea y la creatinina (175), sobre el aspecto histopatológico de los riñones (18,150,207), o bien sobre los niveles plasmáticos o tisulares de CDDP (11,17,156,164,235). Para nuestro trabajo, los tres primeros niveles de análisis se llevaron a cabo en 4 grupos terapéuticos; el del CDDP en salino, y tres correspondientes a CDDP combinado con diversos regímenes de Cimetidina, Fosfomicina y Metilprednisolona. El análisis de los niveles plasmáticos de platino sólo se llevaría a cabo en el grupo tratado con CDDP y en el grupo o grupos que demostrasen efectos favorables en la evaluación bioquímica e histológica.

Si nos atuviésemos estrictamente a los resultados obtenidos en la fase anterior, al no haber dado ningún resultado positivo los tratamientos con Fosfomicina y Metilprednisolona, y ser cuestionable desde el punto de vista estadístico el beneficio aportado por la pauta CMT 5 de Cimetidina, podríamos pensar que no eran necesarias más comprobaciones de las acciones bioquímicas y anatomopatológicas de estos fármacos. Sin embargo, recordemos que en la fase previa se empleó una dosis de CDDP bastante superior a la que han usado otros investigadores en ratas (36,181), y prácticamente similar a las dosis con las que se realizan estudios toxicológicos en especies más resistentes a la nefropatía por CDDP, como es el caso del ratón de laboratorio (11,18,136,189). De hecho, para seleccionar la dosis de 20 mg/Kg no se procedió a un análisis específico de escalonamiento progresivo de dosis (18,120).

Cabía, pues, la posibilidad de que eliminar sin más análisis a los fármacos que fracasaron previamente fuese erróneo, lo que sucedería en el caso de que tuviesen un cierto poder nefroprotector, pero no tan potente como para luchar contra dosis tan elevadas de CDDP. Por ello, quisimos testar de nuevo los esquemas FOS 1 y MTP 1 de Fosfomicina y Metilprednisolona, además de la pauta CMT 5 de Cimetidina. Desestimamos la continuación de ensayos con los esquemas de Cimetidina CMT 1 a CMT 4 por su eficacia en todo caso no superior a la de CMT 5. Rehusamos proseguir los estudios con los escalones de dosis más altos de Fosfomicina y Metilprednisolona porque observamos efectos adversos en los animales que cuestionaban su utilidad práctica.

Todos los animales expuestos a CDDP, independientemente del fármaco nefroprotector que lo acompañara, sufrieron una moderada pérdida de peso, secundaria a la poliuria y estado de deshidratación que se han asociado al CDDP (108). Sin embargo, los resultados bioquímicos, en términos de urea y creatinina, revelan que la Cimetidina ofrece una nefroprotección adicional con respecto al suero salino isotónico. Este hecho no se había descrito previamente y de nuevo coopera para dar un apoyo experimental al ensayo clínico que se había hecho con Cimetidina años atrás (134). En cambio, los ensayos con Fosfomicina y Metilprednisolona fueron negativos, lo que va en contra de observaciones previas (158-160,181,182). Desde el punto de vista histopatológico, de nuevo sólo la Cimetidina fue en apariencia capaz de modificar los grados lesionales asociados al tratamiento con CDDP. Los niveles de lesión se establecieron por una escala cualitativa ordinal, que siempre puede ofrecer cierto grado de subjetivismo en la evaluación. Se han propuesto métodos alternativos, al existir cierta correlación entre la excreción de ciertos productos bioactivos renales, como la calicreína, y el grado de necrosis tubular observado (240); no obstante, es difícil que tales métodos lleguen a ser en la práctica buenos sustitutos del examen histológico. La escala aquí empleada, en definitiva, es más precisa que la propuesta por el clásico trabajo de Litterst y cols. (18). Nosotros añadimos a los niveles descritos por Kempf y cols. (180) un 5º nivel, reservado para los animales que fallecieron antes de su sacrificio deliberado. Aunque se ha descrito que, como en otros modelos de insuficiencia renal aguda, los rasgos histopatológicos más floridos no siempre guardan una correlación estrecha con el grado de insuficiencia renal observado (2,3), nos pareció conveniente valorar como razonable la suposición de que las ratas fallecidas precozmente habían de hecho sufrido una nefropatía muy grave. Trabajos previos de nuestro grupo con Carboplatino habían mostrado que, aún no siendo éste un fármaco generalmente reconocido como nefrotóxico (198,199), sí podía suscitar lesiones de severidad intermedia en la rata Wistar expuesta a CDDP a dosis próximas a la  $DL_{50}$  (176).

La bibliografía consultada no sugiere métodos para la cuantificación y tratamiento estadístico de los resultados histopatológicos. Para Litterst y cols. (18), se

podría definir un "índice de severidad", aritméticamente muy simple, pero difícilmente contrastable por métodos estadísticos convencionales. De la **Tabla VIII** se desprende que los índices asociados al CDDP, Cimetidina, Fosfomicina y Metilprednisolona resultaron ser, respectivamente: 4.0, 3.5, 4.4 y 4.4. Intuitiva y gráficamente (**Figura 25**) parece confirmarse el papel protector de la Cimetidina, y la carencia de tal acción en los tratamientos con Fosfomicina y Metilprednisolona. La aplicación de tests estadísticos convencionales, como el test de la  $J_i^2$ , es inviable por el pequeño número de observaciones. El análisis automatizado convencional mediante el test exacto de Fisher, exigiría confeccionar tablas de contingencia  $2 \times 2$ , y nuestra aproximación al problema consistió en agrupar los niveles IV y V en una categoría de "lesiones graves", y los demás niveles observados en una clase de "lesiones ligeras". En términos biológicos este artificio no parece adolecer de una excesiva arbitrariedad y quizás ofreciese ventajas desde el punto de vista matemático (**222**). Al realizar este procedimiento, el test EF no detectó diferencias significativas entre el grupo control y los demás, pero sí se comprobó que los resultados de la Cimetidina eran mejores que los de los otros fármacos ensayados como nefroprotectores. En todo caso, este método de análisis no está refrendado por la bibliografía, y que ello no invalida las observaciones sobre la evolución de las cifras de urea y creatinina.

De este modo, con firme solidez a nivel bioquímico y con una base anatomopatológica creemos que al menos aceptable, pensamos que queda patente el papel modulador favorable de la Cimetidina sobre la tubulopatía aguda por CDDP. En cambio, de nuevo en contra de experiencias previas, la Fosfomicina y la Metilprednisolona han carecido de utilidad. En este caso no cabe atribuir el fracaso de estos fármacos a la dosis de CDDP, que se ha mantenido en un rango muy extendido en este tipo de trabajos (**44,139,140,188,195,207**). La dosis de Fosfomicina han sido equiparables a las previamente utilizadas en clínica, aunque haya que tomar este hecho con todas las reservas al no existir una correlación definida entre distintas especies (**116**). Por contra, sí es cierto que las dosis de Metilprednisolona han sido más bajas que las utilizadas por otros autores (por vía s.c.) (**181,182**). Ahora bien, el hecho de no emplear dosis más altas de Metilprednisolona obedeció a la toxicidad observada con ellas, al administrarlas por vía i.p. Naturalmente, las comparaciones entre este tipo de estudios, por las múltiples variables experimentales que pueden diferir entre ellos, no pueden ser absolutas. Sin embargo, de nuestra experiencia se deriva la impresión de que ulteriores ensayos con estos fármacos no serán probablemente exitosos. En otros términos, ensayos clínicos con Metilprednisolona como el que llevaron a cabo Umeki y cols en 1988 (**116**), para el que no ha existido ningún apoyo experimental hasta muy recientemente (**181,182**), no pueden ser sustentados por nuestros datos experimentales, sea cual fuere el pretendido mecanismo de acción para la nefroprotección con corticoides (**30,116**).

Con respecto a la Fosfomicina, se han propuesto distintos mecanismos de acción, que nuestra metodología no nos permite contrastar (63,116). Con posterioridad a su ensayo clínico (116), se han publicado datos contradictorios sobre la posible capacidad de la Fosfomicina para inhibir el efecto citocida del CDDP (120,187). En todo caso, aún aceptando que sea un fármaco seguro en este sentido, y que pueda frenar la acción nefrotóxica de diversas sustancias como los aminoglucósidos (120), nuestros resultados no confirman los experimentos positivos que se habían reportado (183-185), y de nuevo no sirven como apoyo para los ensayos clínicos con esta sustancia.

En relación con la Cimetidina, concluimos que, al menos en un esquema determinado, que por otra parte es consistente con datos farmacocinéticos y clínicos previos (44,134), es capaz de modular favorablemente la nefropatía aguda por CDDP en la rata Wistar; aunque el efecto es menos acusado a dosis muy altas de CDDP, a la dosis de 7 mg/Kg la adición de CMT al suero salino isotónico aporta una mayor protección funcional y en nuestro criterio también histológica. Es preciso señalar que esta dosis es realmente muy nefrotóxica (140,188,195) y que desde luego está muy por encima de las dosis aplicables en clínica. En este contexto, nos parece suficientemente contrastado el papel nefroprotector de la Cimetidina.

El mecanismo de esta acción protectora sería la inhibición de la secreción tubular de CDDP, por inhibición competitiva con él a nivel de los sistemas enzimáticos de transporte para cationes orgánicos (42,44,45,166,178), de tal manera que en última instancia la concentración de CDDP en el interior de la célula renal quedaría reducida (108). Cabría entonces pensar que los niveles plasmáticos de platino podrían ser mayores con el uso concomitante de CMT, pero de hecho nuestros datos no lo confirman; hemos obtenido, con muy ligeras oscilaciones, medias de 0,25 microgramos/ml en el grupo tratado sólo con CDDP, y de 0,30 microgramos/ml en los animales tratados con CDDP y CMT. Existe controversia sobre cuál es el método ideal para determinar los niveles de platino. La espectrofotometría, que hemos empleado aquí, determina platino total, pero no permite discriminar si este platino circula en forma activa o corresponde a moléculas detoxificadas. Se han propuesto métodos bioquímicos basados en la cromatografía líquida de alto rendimiento (47,241), e incluso algunos han propuesto ensayos microbiológicos para tener en cuenta solamente las especies químicas con poder citotóxico (11). Si asumimos que el uso de Cimetidina no implica una modificación sustancial de las moléculas de platino, para nosotros es menos relevante esa polémica, y basta que los niveles en los grupos de CDDP y en el grupo de CDDP más CMT no diverjan en una magnitud significativa en términos estadísticos (como de hecho sucedió en nuestra experiencia), sea cual fuere la precisión del método analítico empleado.

Los niveles plasmáticos que hemos obtenido al 5º día son comparables a los reportados en la bibliografía (17), y son consistentes con una rápida desaparición del platino del torrente circulatorio, lo que para la rata ha sido descrito y cuantificado en varios estudios (20,37,108). Nuestro estudio no pretendió analizar detalles de la farmacocinética del CDDP ni hemos tenido en cuenta los niveles de acumulación de platino en el tejido renal (47), por lo que desde este punto de vista podría parecer incompleto. No obstante, hay que señalar que únicamente nos interesó saber si del uso concurrente de CDDP y CMT cabría esperar una toxicidad extrarrenal incrementada, y de hecho, si ya la observación de los animales no sugería algo similar en la mayoría de los estudios, los niveles de platino circulante no se elevaron como para hacer pensar en ese riesgo.

### 3. DISCUSION DE RESULTADOS EN RATONES DBA/2

Conocíamos el potencial evolutivo del linfoma L5178Y tras inóculo s.c. de  $4 \times 10^6$  células (192,193), pero no existían datos sobre la actividad del Cisplatino frente a este modelo. Sí era conocido que el ratón es intrínsecamente menos susceptible a la nefrotoxicidad por CDDP que la rata de laboratorio (11,18,136,189). Por ello, iniciamos las experiencias con ratones DBA/2 con inóculos de cuatro millones de células linfomatosas y con dosis de CDDP de 10 mg/Kg, utilizando cohortes con números de individuos equiparables a las empleadas en otros trabajos similares, y esperando una baja tasa de muertes tóxicas.

Se ha reportado la actividad del CDDP frente a diversos tumores experimentales (208), pero muchos de ellos son leucemias o neoplasias ascíticas que sólo permiten estimar la supervivencia de los animales y no las dimensiones del tumor a lo largo de su evolución. Aquí hemos empleado un modelo que en todos los experimentos adopta un comportamiento homogéneo, con un crecimiento paulatino, aunque se requieran inóculos de diez millones de células para que la agresividad del tumor se ponga claramente de manifiesto, y por tanto para poder testar adecuadamente la actividad antilinfomatosa del CDDP. Así, aunque en el primer ensayo con linfoma L5178Y en inóculo de 4 millones de células malignas, el CDDP por vía i.p. proporcionó un índice de curaciones superior al 75% y el análisis de las masas tumorales indicaba sin duda que el fármaco era capaz de inhibir fuertemente el desarrollo del tumor en el tejido subcutáneo. Es relevante señalar que este efecto citocida se consigue con dosis muy superiores a las empleadas en Clínica, si bien a costa de una toxicidad casi nula.

En el segundo ensayo, se confrontó un inóculo de 10 millones de células linfomatosas frente a la misma dosis de CDDP. Todos los métodos de evaluación estadística fueron claramente favorables al uso de CDDP. Se ha descrito el uso del parámetro % T/C para determinar la actividad de un citostático (208,210), y en este caso se observó un valor de 147, lo que indica que el CDDP es con toda probabilidad activo frente al linfoma L5178Y. En la bibliografía se reportan muy diversos índices para distintos tumores, pero hay que señalar la gran variabilidad esperable, al estudiarse modelos en los que la agresividad del tumor, su vía de crecimiento, y la vía de administración del CDDP, difieren notablemente. El índice que hemos obtenido en este trabajo está en el rango medio de los que se han descrito para el CDDP en otros tumores experimentales, pero no creemos necesario establecer comparaciones con otros modelos, puesto que nuestro objetivo era comprobar si la combinación del CDDP con otros fármacos interfiere con la actividad antitumoral de aquél, precisamente en este linfoma L5178Y, y pensamos que nuestro modelo es suficientemente expresivo para este propósito. Más aún, aparte de aportar el parámetro % T/C, con el que otros autores consideran probada la eficacia del citostático (210), el Ensayo 2º hemos aportado pruebas de que el CDDP verdaderamente induce regresiones del tamaño tumoral, lo que tiene si cabe más valor en la perspectiva de la Oncología Médica.

En tres ensayos sucesivos testamos el posible efecto de la Cimetidina (CMT) sobre la actividad antitumoral del CDDP, en el sentido de comprobar si la combinación de ambos influía negativamente sobre aquélla. En esta fase no utilizamos Fosfomicina ni Metilprednisolona porque, en nuestro criterio, ha quedado demostrada su ineficacia en el modelo de nefropatía tóxica en rata Wistar. Y sólo seleccionamos el esquema de CMT que ofreció en dicho modelo las máximas ventajas. Los ensayos 3º y 4º confirmaron sucesivamente tanto la validez del linfoma L5178Y como "banco de pruebas" del poder antineoplásico del CDDP, como la no influencia deletérea de la Cimetidina. En efecto, la combinación de ésta con el CDDP no alteraba negativamente ni el parámetro % T/C (ensayo 3º), ni las tasas de curación ofrecidas por la quimioterapia, ni la evolución de las masas tumorales. Curiosamente, el parámetro % T/C en el Ensayo nº 4, a pesar de la indudable actividad del CDDP y de la combinación CDDP-CMT en términos de curabilidad y de evolución de las masas linfomatosas, era paradójicamente superior en el grupo control. Este hecho se explica porque el mencionado parámetro se calcula arbitrariamente considerando las medianas de supervivencia de los ratones **fallecidos**, no del conjunto de animales expuestos a la experiencia (210), resultando que la mediana de supervivencia **global** de la serie expuesta a CDDP y Cimetidina no llegó a alcanzarse al cabo de 60 días de observación. Sirva tal ejemplo como crítica adicional de la valoración de la actividad antitumoral del CDDP en términos del parámetro % T/C.

La dosis de 10 mg/Kg había provocado una tasa de fallecimientos precoces del 7.1% (2 de 28 ratones expuestos a CDDP) en los Ensayos 1º, 2º y 3º. Estos animales no exhibían masas linfomatosas voluminosas y, aunque no se efectuaron estudios bioquímicos ni histopatológicos específicos), consideramos muy lógico considerar a estos animales como casos de muerte tóxica por nefropatía aguda. Tal suposición es refrendada por las recomendaciones al uso para el cálculo del parámetro % T/C, donde se descartan los animales fallecidos en el curso de la primera semana después del tratamiento con análogos de platino (210). Por ello, en el 4º Ensayo redujimos la dosis de CDDP a 9 mg/Kg, y pudimos comprobar que la tasa de muertes tóxicas se reducía a 0, y que el CDDP retenía su actividad frente al linfoma L5178Y. Más importante aún fue que la Cimetidina, lejos de comprometer la respuesta del tumor al CDDP, incluso parecía estimular la capacidad citorreductora de aquél.

Tal resultado no era esperado y no podíamos deducirlo ni del mecanismo de acción de la Cimetidina en la nefropatía por CDDP (supuestamente la inhibición de la secreción tubular del citostático), ni de una hipotética elevación de los niveles plasmáticos de platino. Al menos nuestra experiencia en rata Wistar sugería que la asociación de CMT con el CDDP no elevaba sustancialmente los niveles plasmáticos de platino en el 5º día de observación. Con el ánimo de disipar las dudas sobre el real efecto de la Cimetidina sobre el modelo de linfoma L5178Y, llevamos a cabo el Experimento nº 5. La **Figura 31** es testimonio de que las curvas de supervivencia con CDDP solo o con la combinación CMT-CDDP difieren realmente poco. Curiosamente, hay una fase precoz en la que ambas curvas se separan, de modo que hay menos muertes tóxicas en el grupo tratado con Cimetidina (lo que iría de nuevo a favor del papel nefroprotector de la misma); pero a partir de ahí, en todas las formas de análisis se demuestra que la Cimetidina simplemente no interfiere con la actividad antitumoral del CDDP frente al linfoma L5178Y. Por consiguiente, nuestros datos confirman que la Cimetidina no añade toxicidad al tratamiento con CDDP -lo que sí se ha reportado con otros agentes como el verapamil (164,190)-, y además que no entraña riesgo de disminuir el poder citocida de la quimioterapia basada en el CDDP, como sí se ha sugerido para otros agentes nefroprotectores como la fosfomicina (120) o el tiosulfato (189).

A lo largo de los ensayos con ratones DBA/2 han variado tanto la magnitud del inóculo (si bien siempre fue de 10 millones de células en los estudios 2º al 5º), y también se modificó la dosis de CDDP. Sin embargo, todos los experimentos se llevaron a cabo en condiciones experimentales muy equiparables (técnica experimental, personas implicadas en los tratamientos, condiciones ambientales, origen de los ratones, etc). Por ello, la **Figura 33** puede ser tomada como una confirmación del poder antitumoral del CDDP frente al linfoma L5178Y; no obstante, sirve también

para ilustrar la variabilidad existente de unos a otros estudios, lo que siempre es posible en la experimentación animal, y lo que en nuestro caso no invalida los resultados porque siempre contamos con el oportuno grupo control. Análogamente, hemos querido mostrar en las **Figuras 32, 34 y 35** que la Cimetidina, además de comportarse como un agente nefroprotector en la rata Wistar (y quizás también en el propio ratón DBA/2), en absoluto compromete la capacidad curativa del CDDP. Aunque no se han aplicado las técnicas rigurosas propias del metaanálisis formal, los experimentos 3° al 5° se realizaron en condiciones de notable homogeneidad, y dimos así el segundo apoyo experimental para el empleo clínico de Cimetidina que ya se había propuesto sin la misma solidez (134).

#### 4. COMENTARIOS AL ENSAYO CLINICO CON CIMETIDINA

Entre las manifestaciones de la tubulopatía tóxica por CDDP en el hombre se incluyen básicamente: hipomagnesemia, hipocalcemia e hipokalemia (112, 167, 187, 217). De ellas, destaca por su frecuencia y potenciales repercusiones clínicas la hipomagnesemia. Se ha reportado que aparece hipomagnesemia en más del 70% de los pacientes sometidos a tratamiento con dosis convencionales de CDDP (58, 122, 211) y se ha descrito un cuadro de hipomagnesemia crónicamente persistente hasta en el 50% de los pacientes que devinieron hipomagnesémicos durante la quimioterapia con CDDP, incluso años después de finalizarla (242). Los factores que pronostican la aparición de esta complicación han sido estudiados en diversas series prospectivas (58, 97), pero el que más claramente se ha mostrado como determinante es la dosis total de CDDP administrada al paciente (97, 211). La patogenia de la hipomagnesemia obedece sin duda a la lesión tubular por CDDP (97, 243), de tal manera que estos pacientes sufren pérdidas inapropiadamente elevadas de magnesio en la orina, que no pueden ser compensadas adecuadamente por la dieta normal. Aunque existe controversia sobre el mecanismo exacto por el que el CDDP induce hipomagnesemia (111), es de notar el hecho de que el CDDP se asocia, en general, a depleción de iones con carga positiva. En el asa de Henle se reabsorbe la mayor parte del cloro y acopladamente a él se reabsorben dichos cationes, y en el humano posiblemente son los túbulos distales las zonas de la nefrona más lesionadas por el CDDP, por lo que parece lógico aceptar que es a través de inhibir la reabsorción de cloro como el CDDP provoca secundariamente la pérdida de magnesio (121).

El magnesio está implicado en múltiples procesos fisiológicos, destacando su actuación en la unión neuromuscular inhibiendo la liberación de acetilcolina. Clínicamente, la hipomagnesemia se ha relacionado con estados de

irritabilidad neuromuscular (llegando a provocar tetania y convulsiones) y de obnubilación y desorientación. No obstante, en la mayoría de las series de tubulopatía tóxica por CDDP sólo una minoría de los pacientes hipomagnesémicos sufren exhiben síntomas neuromusculares, cifrándose en torno al 10% (97). Otros han reportado una mayor incidencia de neuropatías tóxicas entre los enfermos hipomagnesémicos (58), y por otra parte la hipomagnesemia puede condicionar síntomas muy vagos, tales como astenia, cambios de personalidad, adinamia muscular, que pueden ser difíciles de identificar en los enfermos oncológicos pero muy trascendentes desde el punto de vista del bienestar del paciente. Quizás por esta parquedad de cuadros clínicos bien definidos, son muy pocos los estudios que se hayan dirigido a encontrar posibles medidas profilácticas útiles para eludir esta complicación (189). Prácticamente todos ellos han consistido en analizar el papel de los suplementos dietéticos o intravenosos de magnesio (186-188), y sólo esporádicamente se han reportado intentos de profilaxis farmacológica de la hipomagnesemia (138,190). Nuestro ensayo clínico pretendió inscribirse en esta última línea de investigación.

Para el estudio de la tubulopatía tóxica por CDDP, la creatinina es un parámetro poco fiable (102,103,244), lo que se explicaría porque obedece a un mecanismo de lesión renal parcialmente distinto. Asimismo, la excreción urinaria de ciertas enzimas muy abundantes en las células renales, ofrece problemas de interpretación por la gran variabilidad de sus resultados (101,218-220). Por consiguiente, el único ensayo clínico que se ha publicado sobre el papel nefroprotector de la nefropatía por CDDP, que estaba basado en dichos parámetros, estaba quizás erróneamente orientado desde el punto de vista fisiopatológico. Por otro lado, en la aparición de hipocalcemia, que podría ser otro marcador de tubulopatía por CDDP alteraciones renales debidas al empleo de CDDP, pueden subyacer mecanismos patogénicos relacionados con la hormona paratiroidea más que con el daño renal *per se* (187). Estos motivos justifican que nuestro ensayo se dirigiera principalmente a determinar el efecto de la Cimetidina sobre la hipomagnesemia inducida por CDDP, como marcador de la tubulopatía a él asociada.

Se distribuyeron aleatoriamente 48 pacientes entre dos grupos terapéuticos; 45 fueron evaluables, si bien los tres restantes no se excluyeron por motivos relacionados con el ensayo y no introducen sesgos en su interpretación. La aleatorización nos pareció necesaria, dada la variabilidad que puede esperarse de cualquier estudio basado fundamentalmente en datos analíticos. Este número de pacientes es perfectamente comparable con el incluido en otros estudios de tipo similar (187,189). Existió un adecuado balance entre los principales factores que pudieran

estar implicados con la tubulopatía por CDDP; en concreto, ambos sexos estuvieron representados por igual y existió también una apropiada distribución del número de ciclos y de las dosis de quimioterapia que recibieron los enfermos en ambos brazos terapéuticos (97). Las cifras de magnesio sérico previas al tratamiento quimioterápico no difirieron significativamente entre los dos grupos; las medianas se situaron alrededor de 1.80 mg/dl, lo que coincide con los niveles reportados en otros estudios (58), y está por debajo de los valores considerados normales en otros trabajos de nuestro grupo de trabajo (189). Para este último estudio, se eligieron de entrada sólo aquellos pacientes con cifras de magnesio rigurosamente normales; en cambio, en el ensayo clínico objeto de esta Memoria no se descartó a ningún paciente, fuese cual fuese su magnesemia inicial, siempre que no tuviese otros indicios de enfermedad renal, puesto que nuestro objetivo era comprobar la utilidad práctica de la Cimetidina en las circunstancias clínicas más usuales.

Una gran mayoría de los pacientes en ambos grupos terapéuticos desarrolló hipomagnesemia desde el punto de vista analítico, lo que coincide en frecuencia e intensidad con lo reportado en otros estudios (122,211). Se observó hipomagnesemia más acusada en los pacientes no tratados con Cimetidina, aunque los que recibieron Cimetidina no quedaron completamente protegidos de este fenómeno tóxico. Por consiguiente, nos encontramos ante un resultado similar al de trabajos previos, en los que el agente profiláctico atenúa los efectos de la toxicidad tubular por CDDP, pero no llega a inhibirla del todo (186,189). Aunque las cifras a las que llegaron nuestros pacientes fueron menores que las mínimas reportadas por otros, realmente el perfil evolutivo del cuadro fue del todo similar (189). Más aún, el beneficio de los enfermos tratados con Cimetidina al cabo de 2 y de 4 ciclos resultó de una magnitud comparable a la reportada con suplementos exógenos de magnesio (187,189). Podemos concluir que la Cimetidina, en continuidad con los datos de nefroprotección de la rata Wistar, tiene un pequeño pero bien definido efecto moderador de la tubulopatía tóxica por CDDP en el humano. Ello podría ser utilizado para inhibir, quizás de forma completa, la hipomagnesemia inducida por CDDP, por ejemplo mediante una combinación de Cimetidina y aportes exógenos de magnesio.

Como en trabajos previos, aquí la evolución de la creatinina no se correlacionó con el desarrollo de hipomagnesemia. El grado de azoemia fue muy ligero y no dependió de si los enfermos recibían o no Cimetidina. Ello nos sugiere que la retención de productos nitrogenados obedece a mecanismos distintos de la tubulopatía tóxica, quizás susceptibles de inhibición con otros agentes como el verapamil (134,177), pero improbablemente moderados por el empleo de Cimetidina. Nuestros pacientes, en un plazo variable de pocos meses, recuperaron espontánea-

mente casi siempre las cifras normales de magnesio y de creatinina; no hemos visto hipomagnesemias persistentes más allá de unos pocos meses, en contraste con otros grupos (211,242), ni cuadros de azoemia a largo plazo, en lo que coincidimos con otras experiencias (103,104,244). En los aislados casos de alteraciones bioquímicas duraderas, concurrirían factores que dificultan la interpretación de los hechos, como la aplicación de más de cuatro ciclos de CDDP o la administración de compuestos de platino por vía intraperitoneal.

Las manifestaciones clínicas de la hipomagnesemia en esta serie fueron también pocas. Aunque ambos grupos difirieron significativamente en cuanto a cifras de magnesio sérico, hubo pocos síntomas inequívocamente atribuibles a la hipomagnesemia, y además se distribuyeron casi por igual entre ambos grupos terapéuticos. En este sentido, confirmamos que la hipomagnesemia tiene una repercusión clínica quizás difícil de cuantificar (97), pero a lo sumo moderada. El número de pacientes que desarrollan sintomatología es relativamente bajo, y en todo caso comparable con el referido en otras series (122,169,211), lo que puede ser una expresión de que el organismo tolera pérdidas de magnesio importantes sin aparente quebranto físico (97,245). Sólo hubo dos casos de tetania neuromuscular que requirieron aportes vigorosos de magnesio iv; ambos casos eran mujeres, lo que quizás reafirma la mayor susceptibilidad del sexo femenino a los efectos de la hipomagnesemia (58,97), y además correspondieron a las dos ramas terapéuticas del ensayo. En este sentido, el efecto protector de la Cimetidina tendría más interés desde el punto de vista fisiopatológico que desde el punto de vista clínico. No obstante, no observamos ninguna toxicidad atribuible a este fármaco, y su uso no podría ser desestimado por esa sola razón, pues como hemos comentado puede ser difícil determinar cuáles sean los efectos clínicos profundos de un estado de hipomagnesemia de varios meses de duración. Aunque nuestro ensayo no se diseñó para determinar la tasa de respuestas antitumorales en función del tratamiento con Cimetidina, de hecho no apreciamos anomalías en este sentido; de forma indirecta ello corrobora nuestros datos de la no interferencia de la Cimetidina con la actividad antitumoral del CDDP en el modelo de linfoma L5178Y implantado en el ratón DBA/2.

Como resumen, podemos afirmar que la azoemia asociada con el uso habitual de CDDP, probablemente a condición de que la hidratación y la diuresis del enfermo durante la perfusión de quimioterapia sean adecuadas, no representa en la actualidad un efecto tóxico excesivamente relevante. Es más precoz y frecuente una hipomagnesemia que atribuimos a una tubulopatía directamente causada por el CDDP. Esta hipomagnesemia puede ser contrarrestada parcialmente con el uso concomitante

de Cimetidina. No obstante, no hemos podido definir un beneficio clínico concreto, añadido a la mejoría de los parámetros bioquímicos, en los pacientes que reciben Cimetidina frente a los que sólo son tratados con CDDP en la forma convencional. Aunque es posible que la combinación de un tratamiento con Cimetidina junto con el aporte de suplementos orales o intravenosos de magnesio sean útiles para eludir por completo los efectos de la tubulopatía por CDDP, parece que ninguno de estos métodos es capaz de anular completamente el efecto tóxico del CDDP sobre la célula renal. En este contexto, hemos demostrado un beneficio con Cimetidina que nos parece interesante desde el punto de vista fisiopatológico, pero que representa una ventaja quizás marginal desde el punto de vista clínico.

## **VII. CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

**PRIMERA.** El Cisplatino, cuando es administrado por vía intraperitoneal a ratas hembra de raza Wistar, les provoca una insuficiencia renal aguda potencialmente letal, lo que constituye un modelo experimental reproducible de tubulopatía tóxica por dicho citostático.

**SEGUNDA.** Las repercusiones bioquímicas, histológicas y pronósticas del mencionado modelo experimental dependen de la dosis de Cisplatino y de la combinación con diversos procedimientos terapéuticos experimentales.

**TERCERA.** En este modelo, la mortalidad aguda que conlleva el empleo de Cisplatino por vía intraperitoneal, a la dosis de 20 mg/Kg, alcanza el 100% si el fármaco se vehicula en agua destilada, y disminuye significativamente cuando la misma dosis se inyecta disuelta en suero salino isotónico (CINa 0,9%).

**CUARTA.** Las combinaciones de Cisplatino con diversos esquemas posológicos de Fosfomicina, Cimetidina y Metilprednisolona, virtualmente no modifican la supervivencia asociada al empleo de Cisplatino, a la dosis de 20 mg/Kg vehiculados en suero salino fisiológico.

**QUINTA.** La severidad de las alteraciones bioquímicas e histológicas que suscita una dosis de Cisplatino de 7 mg/Kg, administrada a la rata Wistar por vía intraperitoneal, se aminoran significativamente cuando el Cisplatino se combina con una pauta de Cimetidina. En cambio, ni la Fosfomicina ni la Metilprednisolona exhiben ningún efecto nefroprotector.

**SEXTA.** El tratamiento simultáneo con Cisplatino y Cimetidina no hace variar sustancialmente los niveles plasmáticos de platino al 5º día del tratamiento en la rata de raza Wistar.

**SEPTIMA.** El linfoma L5178Y implantado en el tejido celular subcutáneo del ratón DBA/2, muestra un crecimiento progresivo y una conducta biológica predecible, requiriéndose inóculos de diez millones de células tumorales para poder testar adecuadamente la acción antilinfomatosa del Cisplatino.

**OCTAVA.** El Cisplatino, administrado por vía intraperitoneal a dosis de 9 ó 10 mg/Kg al ratón DBA/2, posee actividad antitumoral frente al linfoma L5178Y implantado por vía subcutánea. Su actividad se expresa en términos de una más supervivencia global de los animales tratados con él, en una mayor tasa de curabilidad, y en una reducción significativa de las dimensiones que alcanzan las masas tumorales a lo largo de su evolución.

**NOVENA.** La administración concurrente de Cimetidina en el modelo de ratón DBA/2 inoculado con linfoma L5178Y, no interfiere con la actividad antineoplásica del Cisplatino.

**DECIMA.** En un ensayo clínico prospectivo, la Cimetidina se mostró capaz de paliar la intensidad de la hipomagnesemia inducida por Cisplatino, sin modificar otros aspectos de la toxicidad atribuible a dicho citostático.

**UNDECIMA.** El beneficio clínico aportado por la Cimetidina es menor que el interés fisiopatológico de su actividad moduladora de la tubulopatía tóxica por Cisplatino.

## **VIII. BIBLIOGRAFIA**

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. THURAU K, MASON J, GSTRAUNTHALER G. *Experimental acute renal failure*. En: Seldin DW, Giebisch G (eds): *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. Raven Press, Nueva York, 1985, pp 1885-1899.
2. CAMERON JS, BROWN CB. *Insuficiencia renal aguda*. En: Hamburger J, Crosnier J, Grünfeld JP (eds): *Nefrología*. Toray, Barcelona, 1982, pp 249-279.
3. ANDERSON RJ, SCHRIER RW. *Acute renal failure*. En: Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS (eds): *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 11<sup>a</sup> Ed. McGraw-Hill, Nueva York, 1987, pp 1149-1155.
4. SCHILSKY RL. *Renal and metabolic toxicities of cancer treatment*. En: Perry MC, Yarbrow JW (eds): *Toxicity of Chemotherapy*. Grune & Stratton, Filadelfia, 1984, pp 317-342.
5. WEISS RB, POSTER DS. *The renal toxicity of cancer chemotherapeutic agents*. *Cancer Treat Rev* 1982; 9: 37-56.
6. GONZALEZ BARON M, FELIU BATLLE J, GARCIA GIRON C. *Toxicidad renal, vesical y metabólica*. En: Díaz-Rubio E (ed): *Efectos secundarios de la quimioterapia antineoplásica*. Doyma, Barcelona, 1988, pp 43-51.
7. VOGELZANG NJ. *Nephrotoxicity from chemotherapy: prevention and management*. *Oncology* 1991; 5: 97-102.
8. KRAKOFF IH. *Nephrotoxicity of cis-Dichlorodiammine-platinum (II)*. *Cancer Treat Rev* 1982; 9: 37-56.
9. MARTIN JIMENEZ M. *Efectos tóxicos del Cisplatino*. *An Med Int (Madrid)* 1986; 3: 567-569.
10. MADIAS NE, HARRINGTON JT. *Platinum nephrotoxicity*. *Am J Med* 1978; 65: 307-314.
11. IWAMOTO Y, KAWANO T, ISHIZAWA M, AOKI K, KUROIWA T, BABA T. *Inactivation of cis-diamminedichloroplatinum (II) in blood and protection of its toxicity by sodium thiosulfate in rabbits*. *Cancer Chemother Pharmacol* 1985; 15: 228-232.

12. ROSENBERG B. *Cisplatin, Its history and possible mechanism of action*. En: Prestayko AW, Crooke SL, Carter SK (eds): *Cisplatin, Current Status and New Developments*. Academic Press, Nueva York, 1980, pp 9-20.
13. REED E, KOHN KW. *Platinum analogues*. En: Chabner BA, Collins JM (eds): *Cancer Chemotherapy: Principles and Practice*. JB Lippincott, Filadelfia, 1990, pp 465-490.
14. CLEARE MJ. *Some aspects of platinum complex chemistry and their relation to anti-tumor activity*. *J Clin Hematol Oncol* 1977; 7: 1-25.
15. ROSENBERG B. *Anticancer activity of cis-dichloro-diammineplatinum (II) and some relevant chemistry*. *Cancer Treat Rep* 1979; 63: 1433-1438.
16. TOGNELLA S. *Pharmacological interventions to reduce platinum-induced toxicity*. *Cancer Treat Rev* 1990; 17: 139-142.
17. MONTERO E. *Prevención de la nefrotoxicidad del cisplatino con heparina*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid, 1989.
18. LITTERST CL. *Alterations in the toxicity of cis-dichlorodiammineplatinum-II and in tissue localization of platinum as a function of NaCl concentration in the vehicle of administration*. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981; 61: 99-108.
19. EARHART RH, MARTIN P, TUTSCH KD, ERTÜRK E, WHEELER RH, BULL FE. *Improvement in the therapeutic index of Cisplatin (NSC 119875) by pharmacologically induced chloruresis in the rat*. *Cancer Res* 1983; 43: 1187-1194.
20. ROSENBERG B. *Fundamental studies with cisplatin*. *Cancer* 1985; 55: 2303-2316.
21. LOEHRER PJ, EINHORN LH. *Drugs, five years later: Cisplatin*. *Ann Intern Med* 1984; 100: 704-713.
22. SLEIJFER DT, MEIJER S, MULDER NH. *Cisplatin: a review of clinical applications and renal toxicity*. *Pharm Weekbl (Sci)* 1985; 7: 237-244.
23. LAURENT G, ERICKSON LC, SHARKEY NA, KOHN KW. *DNA cross-linking and cytotoxicity induced by cis-diammine-dichloroplatinum (II) in human normal and tumor cell lines*. *Cancer Res* 1981; 41: 3347-3351.
24. ROBERTS JJ, PASCOE JM. *Cross-linking of complementary strands of DNA in mammalian cells by antitumor platinum compounds*. *Nature* 1972; 235: 282-284.

25. ZWELLING LA, MICHAELS S, SZHWARTZ H, DOBSON PP, KOHN KW. *DNA cross-linking as an indicator of sensitivity and resistance of mouse L1210 leukemia to cis-diammine-dichloro-platinum (II) and l-phenylalanine mustard. Cancer Res* 1981; 41: 640-649.
26. ROBERTS JJ, KNOX RJ, PERA MF. *The role of platinum-DNA interactions in the cellular toxicity and anti-tumor effects of platinum coordination compounds.* En: Nicolini M (ed): *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy.* Martinus Nijhoff, Boston, 1988, pp 16-31.
27. ZWELLING LA. *Cisplatin and new platinum analogs.* En: Pinedo HM, Longo DL, Chabner BA (eds): *Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers, Annual 9.* Elsevier Science Publ, Amsterdam, 1987, pp 71-80.
28. FRAVAL HNA, ROBERTS JJ. *G<sub>1</sub> phase chinese hamster V 79-379 A cells are inherently more sensitive to platinum bounds to their DNA than mid S phase of a synchronously treated cells.* *Biochem Pharmacol* 1979; 28: 1575-1580.
29. LIPPARD SJ. *New chemistry of an old molecule: cis-(Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).* *Science* 1982; 218: 1075-1082.
30. BASU A, LAZO JS. *Suppression of dexamethasone-induced metallothionein expression and cis-diamminedichloro-platinum (II) resistance by v-mos.* *Cancer Res* 1991; 51: 893-896.
31. SKLAR MD, PROCHOWNIK EV. *Modulation of cis-platinum resistance in friend erythroleukemia cells by c-myc.* *Cancer Res* 1991; 51: 2118-2123.
32. REECE PA, STAFFORD I, ABBOTT RL. *Two- versus 24-hour infusion of cisplatin: pharmacokinetic considerations.* *J Clin Oncol* 1989; 7: 270-275.
33. MYERS CE, COLLINS JM. *Pharmacology of intraperitoneal chemotherapy.* *Cancer Invest* 1983; 1: 395-407.
34. ROBERTS JJ. *Cisplatin.* En: Pinedo HM (ed): *Cancer Chemotherapy.* Excerpta Medica, Amsterdam, 1982, pp 95-117.
35. BELT RJ, HIMMELSTEIN KJ, PATTON TF, BANNISTER SJ, STERNSON LA, REPTA AJ. *Pharmacokinetics of non-protein bound platinum species following administration of cis-dichlorodiammine platinum (II).* *Cancer Treat Rep* 1979; 63: 1515-1521.

36. HRUSHESKY WJM. *Selected aspects of cisplatin nephrotoxicity in the rat and man*. En: Hacker M, Douple EB, Krakoff IH (eds): *Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy*. Martinus Nijhoff, Boston, 1984, pp 165-186.
37. MANAKA RC, WOLF W. *Radiopharmacokinetics of cisplatin*. En: Prestayko AW, Crooke ST, Carter SK (eds): *Cisplatin, Current Status and New Developments*. Academic Press, Nueva York, 1980, pp 271-283.
38. DE CONTI RC, TOFTNESS BR, LANGE RC, CREASY WA. *Clinical and pharmacological studies with cis-dichlorodiammineplatinum (II)*. **Cancer Res** 1973; 33: 1310-1315.
39. LAGASSE LD, PRETORIUS RG, PETRILLI ES, FORD LC, HOESCHELE J, KEAN C. *The metabolism of cis-dichloro-diammineplatinum (II): Distribution, clearance, and toxicity*. **Am J Obstet Gynecol** 1981; 139: 791-798.
40. VERMORKEN VJB, VAN DER VIJGH WJF, KLEIN I, HART AAM, GALL HE, PINEDO HM. *Pharmacokinetics of free and total platinum species after short-term infusion of cisplatin*. **Cancer Treat Rep** 1984; 68: 505-513.
41. HANDELSMAN H, GOLDSMITH MA, BRODER LE, CARTER SK, SLAVIK M. *Cisplatinum II diammine-dichloride NSC-119875, National Cancer Institute Brochure*. NCI, Bethesda, Maryland, 1974.
42. DALEY-YATES PT, McBRIEN DCH. *The mechanism of renal clearance of cisplatin (cis-dichlorodiammine platinum II) and its modification by furosemide and probenecid*. **Biochem Pharmacol** 1982; 31: 2243-2246.
43. REECE PA, STAFFORD I, RUSSELL J, GRANTLEY GILL P. *Non-linear clearance of ultrafiltrable platinum in patients treated with cis-dichlorodiammine-platinum (II)*. **Cancer Chemother Pharmacol** 1985; 15: 295-299.
44. NELSON JA, SANTOS G, HERBERT BH. *Mechanisms for the renal secretion of cisplatin*. **Cancer Treat Rep** 1984; 68: 849-853.
45. WILLIAMS PD, HOTTENDORF GH. *Effect of cisplatin on organic ion transport in membrane vesicles from rat kidney cortex*. **Cancer Treat Rep** 1985; 69: 875-880.
46. BIRD JE, WALSER MM, QUEBBEMANN AJ. *Protective effect of organic cation transport inhibitors on cis-diamminedichloroplatinum-induced nephrotoxicity*. **J Pharm Exper Ther** 1984; 231: 752-758.

47. MISTRY P, LEE C, McBRIEN DCH. *Intracellular metabolites of cisplatin in the rat kidney*. **Cancer Chemother Pharmacol** 1989; 24: 73-79.
48. LANGE RC, SPENCER RP, HARDER HC. *Synthesis and distribution of radio-labeled antitumor agent: cis-diammine-dichloroplatinum (II)*. **J Nucl Med** 1972; 13: 328-330.
49. HILL JM, LOEB E, MacLELLAN AS, HILL ND, KHAN A. *Clinical studies of platinum coordination compounds in the treatment of various malignant diseases*. **Cancer Chemother Rep** 1975; 59: 647-652.
50. LITTERST CL, GRAM TE, DEDRICK RL, LE ROY AF, GUARINO AM. *Distribution and disposition of platinum following intravenous administration of cis-diamminedichloroplatinum (II) (NSC 119.875) to dogs*. **Cancer Res** 1976; 36: 2340-2344.
51. HIMMELSTEIN KJ, PATTON TF, BELT RJ, TAYLOR S, REPTA AJ. *Clinical kinetics of intact cisplatin and some related species*. **Clin Pharmacol Ther** 1981; 29: 658-664.
52. CASPER ES, KELSEN DP, ALCOCK NW, et al. *Platinum concentrations in bile and plasma following rapid and 6-hour infusions of cis-dichlorodiammineplatinum (II)*. **Cancer Treat Rep** 1979; 63: 2023-2025.
53. VON HOFF DD, SCHILSKY R, REICHERT CM, REDDICK RL, ROZENCWEIG M, YOUNG RC, MUGGIA FM. *Toxic effects of cis-dichlorodiammineplatinum (II) in man*. **Cancer Treat Rep** 1979; 63: 1527-1531.
54. ROSSOF AH, SLAYTON RE, PERLIA CP. *Preliminary clinical experience with cis-diamminedichloroplatinum (II) (NSC 119875, CACP)*. **Cancer** 1972; 30: 1451-1456.
55. LIPPMAN AJ, HELSON C, HELSON L, KRAKOFF IH. *Clinical trials of cis-diamminedichloroplatinum (NSC 119875)*. **Cancer Chemother Rep** 1973; 57: 191-200.
56. MARTIN JIMENEZ M, DIAZ-RUBIO E. *Antiemetic combination for cisplatin-induced emesis*. **Bull Cancer** 1986; 73: 294-298.
57. GRALLA RJ. *Adverse effects of treatment, Section 2: Nausea and vomiting*. En: De Vita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds): *Cancer. Principles and Practice of Oncology*, 3<sup>a</sup> Ed. **JB Lippincott**, Filadelfia, 1989, pp 2137-2144.

58. ASHRAF M, SCOTCHEL PL, KRALL JM, FLINK B. *Cis-platinum induced hypomagnesemia and peripheral neuropathy*. **Gynecol Oncol** 1983; 16: 309-318.
59. LEGHA SS, DIMERY IW. *High-dose cisplatin administration without hypertonic saline: observation of disabling neurotoxicity*. **J Clin Oncol** 1985; 3: 1373-1378.
60. LOPEZ-VEGA JM, DIAZ-RUBIO E. *Alteraciones neurológicas secundarias a la administración de fármacos antineoplásicos*. En: Díaz-Rubio E (ed): *Efectos secundarios de la quimioterapia antineoplásica*. Doyma, Barcelona, 1988, pp 53-67.
61. TRUGMAN J, HOGENKAMP HP, ROELOFS R, HRUSHESKY WJM. *Cisplatin neurotoxicity: failure to demonstrate vitamin B<sub>12</sub> inactivation*. **Cancer Treat Rep** 1985; 69: 453-455.
62. SCHAEFER SD, POST JD, CLOSE LG. *Ototoxicity of low- and moderate-dose cisplatin*. **Cancer** 1985; 56: 1934-1939.
63. SCHWEITZER VG, DOLAN DF, ABRAMS GE, DAVIDSON T, SNYDER R. *Amelioration of cisplatin-induced ototoxicity by fosfomicin*. **Laryngoscope** 1986; 96: 948-958.
64. GANDARA DR. *Dose-limiting myelosuppression associated with high-dose cisplatin (200 mg/m<sup>2</sup>) in hypertonic saline*. **Cancer Treat Rep** 1986; 70: 820-821.
65. ASHFORD RFU, McLACHLAN A, NELSON I, MUGHAL T, PICKERING D. *Pyrexia after cisplatin*. **Lancet** 1980; 2: 691-692.
66. LEVIN L, SEALY R, BARRON MB. *Syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion following cis-dichloro-diammineplatinum II in a patient with malignant thymoma*. **Cancer** 1982; 50: 2279-2282.
67. DRASGA RE, EINHORN LH, WILLIAMS SD, PATEL DN. *Fertility after chemotherapy for testicular cancer*. **J Clin Oncol** 1983; 1: 179-183.
68. ARAMBURO P, ROMAN FJ, GONZALEZ A, BARBADILLO R. *Un caso de porfiria después de tratamiento con cisplatino*. **Med Clin (Barcelona)** 1986; 87: 738-739.
69. BURSIN N, MEYER WH, CHRISTENSEN M, PRATT CB. *Pancreatitis following cisplatin: a case report*. **Cancer Treat Rep** 1985; 69: 236-237.
70. HARRELL RM, SIBLEY R, VOGELZANG NJ. *Renal vascular lesions after chemotherapy with vinblastine, bleomycin, and cisplatin*. **Am J Med** 1982; 73: 429-433.

71. VOGELZANG NJ, FRENNING DH, KENNEDY BJ. *Coronary artery disease after treatment with bleomycin and vinblastin*. **Cancer Treat Rep** 1980; 64: 1159-1160.
72. PRESTAYKO AW. *Cisplatin: a preclinical overview*. En: Prestayko AW, Crooke ST, Carter SK (eds): *Cisplatin: Current Status and New Developments*. Academic Press, Nueva York, 1980, pp 1-7.
73. OMURA GA, BRADY MF, HOMESLEY HD, YORDAN E, MAJOR FJ, BUCHSBAUM HJ, PARK RC. *Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma: The Gynecologic Oncology Group experience*. **J Clin Oncol** 1991; 9: 1138-1150.
74. VOKES EE, MICK R, LESTER EP, PANJE WR, WEICHSELBAUM RR. *Cisplatin and fluorouracil chemotherapy does not yield long-term benefit in locally advanced head and neck cancer: results from a single institution*. **J Clin Oncol** 1991; 9: 1376-1384.
75. NICHOLS CR, WILLIAMS SD, LOEHRER PJ, GRECO FA, CRAWFORD ED, WEETLAUFER J, et al. *Randomized study of cisplatin dose intensity in poor-risk germ cell tumors: A Southeastern Cancer Study Group and Southwest Oncology Group protocol*. **J Clin Oncol** 1991; 9: 1163-1172.
76. KRAKOFF IH. *Nephrotoxicity of cis-Dichlorodiammineplatinum (II)*. **Cancer Treat Rep** 1979; 63: 1523-1525.
77. BRUCKNER HW, WALLACH R, COHEN CJ, DEPPE G, KABAKOW B, RATNER L, HOLLAND JF. *High-dose platinum for the treatment of refractory ovarian cancer*. **Gynecol Oncol** 1981; 12: 61-67.
78. SAMSON MK, RIVKIN SE, JONES SE, CONSTANZI JJ, LoBUGLIO AF, STEPHENS RL, et al. *Dose-response and dose-survival advantage for high versus low-dose cisplatin in disseminated testicular cancer. A Southwest Oncology Group study*. **Cancer** 1984; 53: 1029-1035.
79. OZOLS RF, DEISSEROTH AB, JAVADPOUR N, BARLOCK A, MESSERSCHMIDT GL, YOUNG RC. *Treatment of poor prognosis nonseminomatous testicular cancer with a "high-dose" platinum combination chemotherapy regimen*. **Cancer** 1983; 51: 1803-1807.
80. OZOLS RF, CORDEN BJ, JACOB J, WESLEY MN, OSTCHEGA Y, YOUNG RC. *High-dose cisplatin in hypertonic saline*. **Ann Intern Med** 1984; 100:19-24.

81. GONZALEZ-VITALE JC, HAYES DM, CVITKOVIC E, STEMBERG SS. *The renal pathology in clinical trials of cis-platinum (II)-diamminedichloride*. **Cancer** 1977; 39: 1362-1371.
82. PERA M, ZOOK BC, HARDER HC. *Effects of mannitol or furosemide diuresis on the nephrotoxicity and physiological disposition of cis-dichlorodiammineplatinum (II) in rats*. **Cancer Res** 1979; 1269-1278.
83. LEHANE D, WINSTON A, GRAY R, DASKAL Y. *The effect of diuretic pre-treatment on clinical, morphological, and ultrastructural cis-platinum-induced nephrotoxicity*. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1979; 5: 1393-1399.
84. JONES TW, CHOPRA S, KAUFMAN JS, FLAMENBAUM W, TRUMP BF. *Cis-diammine dichloroplatinum-induced acute renal failure in the rat. Correlation of structural and functional alterations*. **Lab Invest** 1985; 52: 363-374.
85. DOBYAN DC. *Long-term consequences of cis-platinum-induced renal injury: a structural and functional study*. **Anat Rec** 1985; 212: 239-245.
86. CHOIE DD, LONGNECKER DS, DEL CAMPO AA. *Acute and chronic cisplatin nephrotoxicity in rats*. **Lab Invest** 1981; 44: 397-402.
87. BLACHLEY JD, HILL JB. *Renal and electrolyte disturbances associated with cisplatin*. **Ann Intern Med** 1981; 95: 628-632.
88. DENTINO JM, CUFT RC, YUM NM, WILLIAMS DS, EINHORN L. *Toxic effects of cis-diamminedichloroplatinum (II) in man*. **Cancer** 1978; 41: 1274-1281.
89. AGGARWAL SK, WHITEHOUSE MW, RAMACHANDRAN C. *Ultrastructural effects of cisplatin*. En: Prestayko AW, Crooke ST, Carter SK (eds): *Cisplatin: Current Status and New Developments*. **Academic Press**, Nueva York, 1980, pp 79-111.
90. DAUGAARD G, ABILDGAARD U, HOLSTEIN-RATHLOU NH, LEYSSAC PP, AMTORP O, DIKHOFF TG. *Acute effect of cisplatin on renal hemodynamics and tubular function in dog kidneys*. **Renal Physiol** 1986; 9: 308-312.
91. GROTH S, NIELSEN H, SORENSEN JB, CHRISTENSEN AB, PEDERSEN AG, RORTH M. *Acute and long-term nephrotoxicity of cis-platinum in man*. **Cancer Chemother Pharmacol** 1986; 17: 191-196.

92. OFFERMAN JGG, MEIJER S, SLEIJFER DTh, MULDER NH, DONKER AJM, SCHRAFFORDT KOOPS H, VAN DER HEM GK. *Acute effects of cis-diammine dichloroplatinum (CDDP) on renal function.* **Cancer Chemother Pharmacol** 1984; 12:36-38.
93. JONGEJAN HT, PROVOOST AP, WOLFF ED, MOLENAAR JC. *Nephrotoxicity of cisplatin comparing young and adult rats.* **Pediatr Res** 1986; 20: 9-14.
94. HRUSHESKY WJM, SHIMP W, KENNEDY BJ. *Lack of age-dependent cisplatin nephrotoxicity.* **Am J Med** 1984; 76: 579-584.
95. HABER MS, JENNINGS RB. *Sex differences in renal toxicity of mercury in rat.* **Nature** 1964; 202: 1235-1236.
96. BITRAN JD, DESSER RK, BILLINGS AA, KOZLOFF MF, SHAPIRO CM. *Acute nephrotoxicity following cis-dichloro diammine-platinum.* **Cancer** 1982; 49: 1784-1788.
97. MARTIN JIMENEZ M, DIAZ-RUBIO E, BLAZQUEZ ENCINAR JC, GONZALEZ LARRIBA JL, ARROYO M. *Hipomagnesemia inducida por cisplatino. Resultados de un estudio prospectivo.* **An Med Intern (Madrid)** 1986; 3: 570- 574.
98. STARK JJ, HOWELL SB. *Nephrotoxicity of cis-platinum (II) dichlorodiammine.* **Clin Pharmacol Ther** 1978; 23: 461-466.
99. MEIJER S, SLEIJFER DTh, MULDER NH, SHITER WJ, MARRINK J, SCHRAFFORDT KOOPS H, et al. *Some effects of combination chemotherapy with cis-platinum on renal function in patients with non seminomatous testicular carcinoma.* **Cancer** 1983; 51: 2035-2040.
100. JAFFE N, KEIFER R, ROBERTSON R, CANGIR A, WANG A. *Renal toxicity with cumulative doses of cis-diammine dichloroplatinum-II in pediatric patients with osteosarcoma.* **Cancer** 1987; 59: 1577-1581.
101. REECE PA, STAFFORD I, RUSSELL J, GRANTLEY GILL P. *Reduced ability to clear ultrafilterable platinum with repeated courses of cisplatin.* **J Clin Oncol** 1986; 4: 1392-1398.
102. MEIJER S, MULDER NH, SLEIJFER DT, DONKER AJM, SLUITER WJ, DeJONG PE, et al. *Influence of combination chemotherapy with cis-diammine dichloro-platinum on renal function: Long-term effects.* **Oncology** 1983; 40: 170-173.

103. FJELDBORG P, SORENSEN J, HELKJAER PE. *The long-term effect of cisplatin on renal function.* **Cancer** 1986; 58: 2214-2217.
104. CHIUTEN D, VOGL S, KAPLAN B, CAMACHO F. *Is there cumulative or delayed toxicity from cis-platinum?* **Cancer** 1983; 52: 211-214.
105. OFFERMAN JJG, MULDER NH, SLEIJFER DT, MEIJER S, SCHRAFFORDT KOOPS H, VAN DER HEM GK. *Influence of captopril on CDDP-induced renal toxicity.* **Am J Nephrol** 1985; 5: 433-436.
106. ICHIKAWA I, MIELE JD, BRENNER BM. *Reversal of renal cortical actions of angiotensin II by verapamil and manganese.* **Kidney Int** 1979; 16: 137-147.
107. CLIFTON GG, PEARCE C, O'NEILL Jr WM, WALLIN JD. *Early polyuria in the rat following single dose cis-dichlorodiammine platinum (II). Effects on plasma vasopressin concentration and posterior pituitary function.* **J Lab Clin Med** 1982; 100: 659-670.
108. SAFIRSTEIN R, WINSTON J, GOLDSTEIN S, MOEL D, DIKMAN S, GUTTENPLAN J. *Cisplatin nephrotoxicity.* **Am J Kidney Dis** 1986; 13: 356-367.
109. DOS SANTOS OF, BOIM MA, BARROS EJ, PIROTZKY E, BRAQUET P, SCHOR N. *Effect of platelet-activating factor antagonist BN 52063 on the nephrotoxicity of cisplatin.* **Lipids** 1991; 26: 1324-1328.
110. LEONARD BJ, ECCLESTON E, JONES D, TODD P, WALPOLE A. *Anti-leukaemic and nephrotoxic properties of platinum compounds.* **Nature** 1971; 234: 43-45.
111. MAVICHAK V, WONG NLM, QUAMME GA, MAGIL AB, SUTTON RAL, DIRKS JH. *Studies on the pathogenesis of cisplatin-induced hypomagnesemia in rats.* **Kidney Int** 1985; 28: 914-921.
112. SCHILSKY RL, ANDERSON T. *Hypomagnesemia and renal magnesium wasting in patients receiving cisplatin.* **Ann Intern Med** 1979; 90: 929-931.
113. MARTIN M, DIAZ-RUBIO E, CASADO A, LOPEZ-VEGA JM, SASTRE J, ALMENAREZ J. *Intravenous and oral magnesium supplementations in the prophylaxis of cisplatin-induced hypomagnesemia.* **Am J Clin Oncol** 1992; 15: 348-351.
114. GORMLEY PE, BULL JM, LeROY AF, CYSYK R. *Kinetics of cis-dichlorodiammineplatinum.* **Clin Pharmacol Ther** 1979;; 25:351-357.

115. JACOBS C, KALMAN SM, TRETTON M, WEINER MW. *Renal handling of cis-diamminedichloroplatinum (II)*. **Cancer Treat Rep** 1980; 64: 1223-1226.
116. UMEKI S, WATANABE M, YAGI S, SOEJIMA R. *Supplemental fosfomycin and/or steroids that reduce cisplatin-induced nephrotoxicity*. **Am J Med Sci** 1988; 295: 6-10.
117. ROSEN M, FIGLIOMENI M, SIMPKINS H. *The interaction of platinum anti-tumour drugs with mouse liver mitochondria*. **J Exp Pathol** 1992; 73: 61-74.
118. HALABE A, WONG NL, SUTTON RA. *Effect of chronic cisplatin administration on phosphate and glucose transport by the renal brush border membrane*. **Nephron** 1991; 57: 197-200.
119. BROOMHEAD JA, FAIRLIE DP, WHITEHOUSE MW. *Cisplatinum (II) ammine complexes: some structure activity relationships for immunosuppressive, nephrotoxic and gastrointestinal (side) effects in rats*. **Chem Biol Interact** 1980; 38: 113-132.
120. WAGNER T, KREFT B, BOHLMANN G, SCHWIEDER G. *Effects of fosfomycin, mesna, and sodium thiosulfate on the toxicity and antitumor activity of cisplatin*. **Cancer Res Clin Oncol** 1988; 114: 497-501.
121. LOPEZ NOVOA JM. *Embriología, anatomía y fisiología renal*. **Medicine (Madrid)** 1986, 4ª ed, pp 2251-2275.
122. BELL DR, WOODS RL, LEVI JA. *Cis-diamminedichloroplatinum-induced hypomagnesemia and renal magnesium wasting*. **Eur J Cancer Clin Oncol** 1985; 21: 287-290.
123. WALKER EM, GALE GR. *Methods of reduction of cisplatin nephrotoxicity*. **Am Clin Lab Sci** 1981; 11: 397-410.
124. BLUMENREICH MS, WOODCOCK TM, JONES M, RICHMAN SP, GENTILE PS, KUBOTA TT, ALLEGRA JC. *High-dose cisplatin in patients with advanced malignancies*. **Cancer** 1985; 55: 1118-1122.
125. CVITKOVIC E, SPAULDING J, BETHUNE C, MARIN J, WITHMORE F. *Improvement of cis-dichlorodiammineplatinum (NSC-119875) therapeutic index in a animal model*. **Cancer** 1977; 39:1357-1361.
126. WARD JM, GRABIN ME, BERLIN E, YOUNG DM. *Prevention of renal failure in rats receiving cis-diamminedichloro-platinum (II) by administration of furosemide*. **Cancer Res** 1977; 61: 359-366.

127. HAYES DM, CVITKOVIC E, GOLBEY RB, SCHEINER E, HELSON L, KRAKOFF IH. *High-dose cisplatin diamminedichloride: amelioration of renal toxicity by mannitol diuresis.* **Cancer** 1977; 39: 1372-1381.
128. GEHR MK, CHOPRA S, KAUFMAN J, CHASE D, FLAMENBAUM W. *The effect of furosemide on cis-diamminedichloroplatinum-induced acute renal failure.* **Kidney Int** 1981; 19: 201-204.
129. LeROY AF. *Some quantitative data on cis-diammine-dichloride-platinum (II) species in solution.* **Cancer Treat Rep** 1979; 63: 231-233.
130. CORDEN BJ, FINE RL, OZOLS RF, COLLINS JM. *Clinical pharmacology of high-dose cisplatin.* **Cancer Chemother Pharmacol** 1985; 14: 38-41.
131. DIMERY IW, LEGHA SS. *Sequential methotrexate, fluorouracil, and cisplatin in the treatment of recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck: failure of hypertonic saline to reduce the nephrotoxicity of cisplatin.* **J Clin Oncol** 1986; 4: 1670-1676.
132. TRUMP DL, HORTVET L. *Etoposide and very high dose cisplatin: salvage therapy for patients with advanced germ cell neoplasms.* **Cancer Treat Rep** 1985; 69: 259-261.
133. GANDARA DR, DeGREGORIO MW, WOLD H, WILBUR BJ, KOHLER M, LAWRENCE HJ, et al. *High-dose cisplatin in hypertonic saline: reduced toxicity of a modified dose schedule and correlation with plasma pharmacokinetics. A Northern California Oncology Group pilot study in non-small-cell lung cancer.* **J Clin Oncol** 1986; 4: 1787-1793.
134. SLEIJFER DTh, OFFERMAN JJG, MULDER NH, VERWEIJ M, VAN DER HEM GK, SCHRAFFORDT KOOPS H, MEIJER S. *The protective potential of the combination of verapamil and cimetidine on cisplatin-induced nephrotoxicity in man.* **Cancer** 1987; 60: 2823-2828.
135. GANDARA DR, PEREZ EA, WEIBE V, DeGREGORIO MW. *Cisplatin chemo-protection and rescue: pharmacologic modulation of toxicity.* **J Clin Oncol** 1991; 9: 49-55.
136. HOWELL SB, TAETLE R. *Effect of sodium thiosulfate on cis-dichlorodiammine-platinum (II) toxicity and antitumor activity in L1210 leukemia.* **Cancer Treat Rep** 1980; 64: 611-616.
137. PFEIFLE CE, HOWELL SB, FELTHOUSE RD, WOLIVER TBS, ANDREWS PA, MARKMAN M, MURPHY MP. *High-dose cisplatin with sodium thiosulfate protection.* **J Clin Oncol** 1985; 3: 237-244.

138. WONG NLM, MAVICHAK V, MAGIL AB, SUTTON RAL, DIRKS JH. *Sodium thiosulfate prevents cisplatin-induced hypomagnesemia*. **Nephron** 1988; 50: 308-314.
139. KEMPF SR, IVANKOVIC S. *Nephrotoxicity and carcinogenic risk of cisplatin (CDDP) prevented by sodium 2-mercapto-ethanesulfonate (Mesna): experimental results*. **Cancer Treat Rev** 1987; 14: 365-372.
140. MILLAR BC, SIDDIK ZH, MILLAR JL, JIKS S. *Mesna does not reduce cisplatin-induced nephrotoxicity in the rat*. **Cancer Chemother Pharmacol** 1985; 15: 307-309.
141. ZUNINO F, TOFANETTI O, BESATI A. *Protective effect of reduced glutathione against cis-dichlorodiammine platinum (II)-induced nephrotoxicity and lethal toxicity*. **Tumori** 1983; 69: 105-111.
142. ZUNINO F, PRATESI G, MICHELONI A. *Protective effect of reduced glutathione against cisplatin-induced renal and systemic toxicity and its influence on the therapeutic activity of the antitumor drug*. **Chem Biol Interact** 1989; 70: 89-101.
143. BODENNER DL, DEDON PC, KENG PC, KATZ JC, BORCH RF. *Selective protection against cis-diamminedichloro-platinum (II)-induced toxicity in kidney, gut, and bone marrow by diethyldithiocarbamate*. **Cancer Res** 1986; 46: 2751-2755.
144. TRESKES M, NIJTMANS LG, FICHTINGER-SCHEPMAN AM, VAN DER VIJGH WJ. *Effects of the modulating agent WR2721 and its main metabolites on the formation and stability of cisplatin-DNA adducts in vitro in comparison to the effects of thiosulphate and diethyldithiocarbamate*. **Biochem Pharmacol** 1992; 43: 1013-1019.
145. SLATER TF, AHMED M, IBRAHIM SA. *Studies on nephrotoxicity of cis-diamminedichloroplatinum (II) and related substances*. **J Clin Hematol Oncol** 1977; 7: 534-546.
146. BURCHENAL JH, KALAHAR K, DEW K, LOKYS L. *Rationale for development of platinum analogs*. **Cancer Treat Rep** 1979; 63: 1493-1498.
147. NEWMAN AD, KIDGWAY H, SPOOR RJ, HILL JM. *Inhibition of biological activity of cisplatin by thiourea and L-methionine*. **J Clin Hematol Oncol** 1979; 9: 208-209.

148. MAYER RD, LEE K, COCKETT AT. *Inhibition of cisplatin-induced nephrotoxicity in rats by buthionine sulfoximine, a glutathione synthesis inhibitor.* **Cancer Chemother Pharmacol** 1987; 20: 207-210.
149. JONES MM, BASINGER MA, HOLSCHER MA. *Relative effectiveness of some compounds for the control of cisplatin-induced nephrotoxicity.* **Toxicology** 1991; 68: 227-247.
150. JONES MM, BASINGER MA, HOLSCHER MA. *Thioether suppression of cisplatin nephrotoxicity in the rat.* **Anticancer Res** 1991; 11: 449-453.
151. JONES MM, BASINGER MA, HOLSCHER MA. *Control of the nephrotoxicity of cisplatin by clinically used sulfur-containing compounds.* **Fundam Appl Toxicol** 1992; 18: 181-188.
152. TRESKES M, BOVEN E, HOLWERDA U, PINEDO HM, VAN DER VIJGH WJ. *Time dependence of the selective modulation of cisplatin-induced nephrotoxicity by WR2721 in the mouse.* **Cancer Res** 1992; 52: 2257-2260.
153. DI RE F, BOHM S, ORIANA S, SPATTI GB, PIROVANO C, TEDESCHI M, et al. *High-dose cisplatin and cyclophosphamide with glutathione in the treatment of advanced ovarian cancer.* **Ann Oncol** 1993; 4: 55-61.
154. CVITKOVIC E, HAYES DM, GOLBEY RB, KRAKOFF IH. *Cisplatin nephrotoxicity: diethyldithiocarbamate, WR2721, or just water?* **J Clin Oncol** 1991; 9: 707-709.
155. KAGI JHR, SCHÄFFER A. *Biochemistry of metallothionein.* **Biochemistry** 1988; 27: 8509-8515.
156. CACINI W, SINGH Y. *Renal metallothionein and platinum levels in diabetic and nondiabetic rats injected with cisplatin.* **Proc Soc Exp Biol Med** 1991; 197: 285-289.
157. NAGANUMA A, SATOH M, IMURA N. *Prevention of lethal and renal toxicity of cis-diamminedichloroplatinum (II) by induction of metallothionein synthesis without compromising its antitumor activity in mice.* **Cancer Res** 1987; 47: 983-987.
158. BOOGAARD PJ, SLIKKERVEER A, NAGELKERKE JF, MULDER GJ. *The role of metallothionein in the reduction of cisplatin-induced nephrotoxicity by Bi3(+)-pretreatment in the rat in vivo and in vitro. Are antioxidant properties of metallothionein more relevant than platinum binding?* **Biochem Pharmacol** 1991; 41: 369-375.

159. SATOH M, KLOTH DM, KADHIM SA, CHIN JL, NAGANUMA A, IMURA N, et al. *Modulation of both cisplatin nephrotoxicity and drug resistance in murine bladder tumor by controlling metallothionein synthesis.* **Cancer Res** 1993; 53: 1829-1832.
160. BALDEW GS, VAN DER HAMER CJA, LÖS G. *Selenium-induced protection against cis-diamminedichloroplatinum (II) nephrotoxicity in mice and rats.* **Cancer Res** 1989; 49: 3020-2023.
161. OHKAWA K, TSUKADA Y, DOHZONO H, KOIKE K, TERASHIMA Y. *The effects of co-administration of selenium and cis-platin (CDDP) on CDDP-induced toxicity and antitumour activity.* **Br J Cancer** 1988; 58: 38-41.
162. VERMEULEN NP, BALDEW GS, LOS G, McVIE JG, DE GOEIJ JJ. *Reduction of cisplatin nephrotoxicity by sodium selenite. Lack of interaction at the pharmacokinetic level of both compounds.* **Drug Metab Dispos Biol Fate Chem** 1993; 21: 30-36.
163. OFFERMAN JIG, MEIJER S, SLEIJFER DTh, MULDER NH, DONKER AJM, SCHRAFFORDT KOOPS H, VAN DER HEM GK. *The influence of verapamil on renal function in patients treated with cisplatin.* **Clin Nephrol** 1985; 24: 249-255.
164. UOZUMI J, UEDA T, YASUMASU T, KOIKAWA Y, KUMAZAWA J. *Calcium blockers enhance cisplatin-induced nephrotoxicity in rats.* **Int Urol Nephrol** 1992; 24: 549-553.
165. JACOBS C, KAUBISCH S, HALSEY J, LUM BL, GOSLAND M, COLEMAN CN, et al. *The use of probenecid as a chemoprotector against cisplatin nephrotoxicity.* **Cancer** 1991; 67: 1518-1524.
166. KLEIN J, BENTUR Y, CHEUNG D, MOSHELY G, KOREN G. *Renal handling of cisplatin: interactions with organic anions and cations in the dog.* **Clin Invest Med** 1991; 14: 388-394.
167. RODRIGUEZ M, SOLANSKI DL, WHANG R. *Refractory potassium repletion due to cisplatin-induced magnesium depletion.* **Arch Intern Med** 1989; 149: 2592-2594.
168. MARTIN M, DIAZ-RUBIO E, GONZALEZ LARRIBA JL, ALMENAREZ J, BLAZQUEZ JC, GARCIA DEL MURO J, et al. *Tratamiento antibiótico empírico sin aminoglucósidos en enfermos afectados de tumores sólidos con fiebre neutropénica: resultados de un estudio piloto.* **Neoplasia** 1989; 6: 152-155.

169. VOGELZANG NJ, TORKELSON JL, KENNEDY BJ. *Hypomagnesemia, renal dysfunction, and Raynaud's phenomenon in patients treated with cisplatin, vinblastine, and bleomycin.* **Cancer** 1985; 56: 2765-2770.
170. MUGGIA F. *Overview of carboplatin: Replacing, complementing, and extending the therapeutic horizons of cisplatin.* **Semin Oncol** 1989 (supl 5); 16: 7-13.
171. FRAM RJ, WODA BA, WILSON JM, ROBICHAUD N. *Characterization of acquired resistance to cis-diamminedichloro-platinum (II) in BE human colon carcinoma cells.* **Cancer Res** 1990; 50: 72-77.
172. DeGRAEFF A, SLEBOS RJ, RODENHUIS S. *Resistance to cisplatin and analogues: mechanisms and potential clinical implications.* **Cancer Chemother Pharmacol** 1988; 22: 325-332.
173. LEYLAND-JONES B. *Whither the modulation of platinum?* **J Natl Cancer Inst** 1988; 80: 1432-1433.
174. BORCH RF, MARKMAN M. *Biochemical modulation of cisplatin toxicity.* **Pharmacol Ther** 1989; 41: 371-380.
175. ORMOND PM, BASINGER MA, JONES MM, HANDE KR. *Association between increased atrial natriuretic peptide and reduced cisplatin nephrotoxicity in rats.* **J Pharmacol Exp Ther** 1992; 262: 246-251.
176. GONZALEZ LARRIBA JL. *Estudio experimental sobre la protección de la lesión renal inducida por el Cisplatino mediante la producción de compuestos atóxicos.* **Tesis Doctoral.** Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid, 1993.
177. HARAGSIM L, ZIMA T. *Protective effects of verapamil on cis-platinum and carboplatinum nephrotoxicity in dehydrated and normohydrated rats.* **Biochem Int** 1992; 28: 273-276.
178. WEINER IM, ROTH L. *Renal excretion of cimetidine.* **J Pharmacol Exp Ther** 1981; 216: 516-520.
179. RENNICK B, ZIEMNIAK J, SMITH I, TAYLOR M, ACARA M. *Tubular transport and metabolism of cimetidine in chicken kidneys.* **J Pharmacol Exp Ther** 1984; 228: 387-392.
180. McKINNEY TD, KUNNEMAN ME. *Cimetidine uptake by rabbit renal cortical brush border membrane vesicles (Abstract).* **Kidney Int** 1986; 29: 420.

181. UOZUMI J, KOIKAWA Y, UEDA T. *Methylprednisolone reduces the nephrotoxicity caused by cisplatin*. **J Pharmacobiodyn** 1992; 15: 693-697.
182. KOIKAWA Y, UOZUMI J, UEDA T, YASUMASU T, KUMAZAKA J. *Prophylactic effect of methylprednisolone against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats*. **Toxicol Lett** 1993; 66: 281-285.
183. KUREBE M, NIIZATO T, SANDA M, SASAKI H, HAYASAKA H. *Preventive effect of fosfomycin on the renal toxicity of cisplatin*. **Jpn J Antibiot** 1985; 38: 62-68.
184. OHTANI I, OHTSUKI K, AIKAWA T, SATO Y, ANZAI T, OUCHI J, SAITO T. *Reduction of cisplatin toxicity by fosfomycin in animal models*. **Jpn J Cancer Chemother** 1984; 11: 2400-2407.
185. SACK K, SCHULZ E, MARRE R, KREFT B. *Fosfomycin protects against tubulotoxicity induced by cis-diamminedichloroplatin and cyclosporin-A in the rat*. **Klin Wochenschr** 1987; 65: 525-527.
186. KUMANO N, KOINUMARU S, OIZUMI K, KONNO K. *Cis-diamminedichloroplatinum (CDDP)-fosfomycin combination in lung cancer patients with respect to the peripheral T-lymphocyte subsets*. **Tohoku J Exp Med** 1986; 148: 333-334.
187. BUHRER C, ATZPODIEN J, OZ S, HENZE G. *Fosfomycin does not reduce cytostatic activity of cis-platinum against human osteosarcoma cell lines in vitro*. **Pediatr Hematol Oncol** 1991; 8: 243-249.
188. AAMDAL S, FODSTAD O, PIHL A. *Some procedures to reduce cis-platinum toxicity reduce antitumour activity*. **Cancer Treat Rev** 1987; 14: 389-395.
189. AAMDAL S, FODSTAD O, PIHL A. *Sodium thiosulfate fails to increase the therapeutic index of intravenously administered cis-diamminedichloroplatinum (II) in mice bearing murine and human tumors*. **Cancer Chemother Pharmacol** 1988; 21: 129-133.
190. IKEDA H, NAKANO G, NAGASHIMA K, SAKAMOTO K, HARASAWA N, KITAMURA T, et al. *Verapamil enhancement of antitumor effect of cis-diammine dichloroplatinum (II) in nude mouse-grown human neuroblastoma*. **Cancer Res** 1987; 47: 231-234.
191. KOCIBA RJ, VON SLEIGHT SD. *Acute toxicologic and pathologic effects of cis-diamminedichloroplatinum (NSC-119875) in the male rat*. **Cancer Chemother Rep** 1971; 55: 1-8.

192. PARR I, WHEELER E, ALEXANDER P. *Similarities of the antitumour action of endotoxin, lipid A and double strand RNA*. **Brit J Cancer** 1973; 27: 370-373.
193. CIFUENTES DE CASTRO L, ALEXANDER P. *Induction of haemorrhagic necrosis in a murine tumour by products from the culture fluid of azetobacter*. **Biomedicine** 1979; 31: 217-218.
194. MONTINE TJ, BORCH RF. *Quiescent LLC-PK1 cells as a model for cis-diamminedichloroplatinum (II) nephrotoxicity and modulation by thiol rescue agents*. **Cancer Res** 1988; 48: 6017-6024.
195. WARD JM, FAUVIE KA. *The nephrotoxic effects of cis-diammine-dichloro platinum (II) (NSC-119875) in male F344 rats*. **Toxicol Appl Pharmacol** 1976; 38: 535-547.
196. LITTERST CL, TORRES IJ, ARNOLD S, MCGUNAGLE D, FURNER R, SIKIC BI, GUARINO AM. *Absorption of antineoplastic drugs following large volume intraperitoneal administration to rats*. **Cancer Treat Rep** 1982; 66: 147-155.
197. PRETORIUS RG, PETRILLI ES, KEAN C, FORD LC, HOESCHELE JD, LAGASSE LD. *Comparison of the IV and IP routes of administration of cisplatin in dogs*. **Cancer Treat Rep** 1981; 65: 1055-1062.
198. MANGIONI C, BOLIS G, PECORELLI S, BRAGMAN K, EPIS A, FAVALLI G, et al. *Randomized trial in advanced ovarian cancer comparing cisplatin and carboplatin*. **J Natl Cancer Inst** 1989; 81: 1464-1471.
199. ADAMS M, KERBY IJ, ROCKER I, EVANS A, JOHANSEN K, FRANKS R. *A comparison of the toxicity and efficacy of cisplatin and carboplatin in advanced ovarian cancer*. **Acta Oncologica** 1989; 28: 57-60.
200. AAPRO MS, PLEZIA PM. *Double-blind crossover study of the antiemetic efficacy of high-doses dexamethasone versus high-dose metoclopramide*. **J Clin Oncol** 1984; 2: 466-471.
201. SPEER RJ, RIDGWAY H, HALL LM. *Coordination complexes of platinum as antitumor agents*. **Cancer Chemother Rep** 1975; 59: 629-641.
202. GRAHNEN A, VON BAHR C, LINDSTRÖM B, ROSEN A. *Bioavailability and pharmacokinetics of cimetidine*. **Eur J Clin Pharmacol** 1979; 16: 335-340.
203. LARSSON R, BODEMAR G, NORLANDER B. *Oral absorption of cimetidine and its clearance in patients with renal failure*. **Eur J Clin Pharmacol** 1979; 15: 153-157.

204. DeWOSKIN RS, RIVIERE JE. *Cisplatin-induced loss of kidney copper and nephrotoxicity is ameliorated by single dose diethyldithiocarbamate, but not mesna.* **Toxicol Appl Pharmacol** 1992; 112: 182-189.
205. OSMAN NM, COPLEY MP, LITTERST CL. *Amelioration of cisplatin-induced nephrotoxicity by the diuretic acetazolamide in F344 rat.* **Cancer Treat Rep** 1984; 68: 999-1004.
206. IWAMOTO Y, KAWANO T, UOZUMI J, AOKI K, BABA T. *"Two-route chemotherapy" using high-dose ip cisplatin and iv sodium thiosulfate, its antidote, for peritoneally disseminated cancer in mice.* **Cancer Treat Rep** 1984; 68: 1367-1373.
207. KEMPF SR, IVANKOVIC S, WIESSLER M, SCHMÄHL D. *Effective prevention of the nephrotoxicity of cisplatin (CDDP) by administration of sodium 2-mercaptoethane-sulfonate (MESNA) in rats.* **Br J Cancer** 1985; 52: 937-939.
208. WOLPERT-DeFILIPPES MK. *Antitumor activity of cisplatin analogs.* En: Prestayko AW, Crooke ST, Carter SK (eds): *Cisplatin: Current status and new developments.* Academic Press, Nueva York, 1980, pp 183-191.
209. TOMAYKO MM, REYNOLDS CP. *Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice.* **Cancer Chemother Pharmacol** 1989; 24: 148-154.
210. BRADNER WT, ROSE WC, HUFTALEN JB. *Antitumor activity of platinum analogs.* En: Prestayko AW, Crooke ST, Carter SK (eds): *Cisplatin: Current status and New Developments.* Academic Press, Nueva York, 1980, pp 171-182.
211. BUCKLEY JE, CLARK VL, MEYER TJ, PEARLMAN NW. *Hypomagnesemia after cisplatin combination chemotherapy.* **Arch Intern Med** 1984; 2347-2348.
212. MACAULAY VM, BEGENT RHJ, PHILIPS ME, NEWLANDS ES. *Prophylaxis against hypomagnesemia induced by cis-platinum combination chemotherapy.* **Cancer Chemother Pharmacol** 1982; 9: 179-181.
213. NETTEN PM, de MULDER PHM, THEEUWES AG, WILLEMS JL, KHOLER BEM, WAGENER DT. *Intravenous magnesium supplementation during cis-diammine dichloroplatinum administration prevents hypomagnesemia.* **Ann Oncol** 1990; 1: 369-372.
214. WILLOX JC, McALLISTER EJ, SANGSTER G, KAYE SB. *Effects of magnesium supplementation in testicular cancer patients receiving cisplatin: a randomized trial.* **Br J Cancer** 1986; 54: 19-23.

215. POOLE ME, WATSON AJS, DONEHOWER RC, McGUIRE WP. *Effect of amiloride on cisplatin-induced hypomagnesemia (Abstract)*. **Proc ASCO 1988**; 7: 286.
216. Committee for Proprietary Medicinal Products. Working Party on Efficacy of Drugs. Good Clinical Practice for trials on medicinal products in the E.C. III/ 3976/88-EN Final. Bruselas, julio 1990.
217. HILL JB, BLACHLEY JD, TROTTER M. *Hypomagnesemia, hypocalcemia, and hypokalemia with cis-platinum treatment (Abstract)*. **Cancer Res 1978**; 26: 780A.
218. SORENSEN PG, NISSEN MH, GROTH S, RORTH M. *Beta-2-microglobulin excretion: An indicator of long term nephrotoxicity during cis-platinum treatment?* **Cancer Chemother Pharmacol 1985**; 14: 247-249.
219. TIRELLI AS, COLOMBO N, CAVANNA G, MANGIONI C, ASSAEL BM. *Follow-up study of enzymuria and beta<sub>2</sub>-microglobulinuria during cis-platinum treatment*. **Eur J Clin Pharmacol 1985**; 29: 313-318.
220. LITTERST C, SMITH JH, SMITH MA, UOZUMI J, COPLEY M. *Sensitivity of urinary enzymes as indicators of renal toxicity of the anticancer drug cis-platin*. **Uremia Invest 1986**; 9: 111-117.
221. CARRASCO JL. *El método estadístico en la investigación médica*. Ed Ciencia 3, Madrid, 4ª Ed, 1989.
222. LOPEZ GIMENEZ MR, GARCIA GOMEZ JJ. *A propósito del test de Fisher (Carta)*. **Med Clin (Barcelona) 1993**; 101: 156-157.
223. MATTHEWS DE. *Estadística médica*. Salvat, Barcelona, 1988.
224. GORE SM, JONES IG, RYTTER EC. *Misuse of statistical methods: critical assessments of articles in BMJ from January to March 1976*. **Br Med J 1977**; 1: 85-87.
225. SALEM PA, JABBOURY KW, KHALIK KMF. *Severe nephrotoxicity: a probable complication of cis-dichlorodiammineplatinum (II) and cephalotin-gentamycin therapy*. **Oncology 1982**; 39: 31-32.
226. ISONISHI S, HOM DK, THIEBAUT FB, MANN SC, ANDREWS PA, BASU A, et al. *Expression of the c-Ha-ras oncogene in mouse NIH 3T3 cells induces resistance to cisplatin*. **Cancer Res 1991**; 51: 5903-5909.

227. KACINSKI BM, CHAMBERS SK. *Molecular biology of ovarian cancer*. **Curr Opin Oncol** 1991; 3: 889-900.
228. BOHM S, ORIANA S, SPATTI GB. *A clinical study of reduced glutathione as a protective agent against cisplatin-induced toxicity*. **Dev Oncol** 1988; 54: 456-459.
229. UMEKI S, TSUKIYAMA K, OKIMOTO N, SOEJIMA R. *Urinastatin (Kunitz-type proteinase inhibitor) reducing cisplatin nephrotoxicity*. **Amer J Med Sci** 1989; 298: 221-226.
230. ESPOSITO M, FULCO RA, ZICCA A. *Protective effect of procaine against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice*. **Dev Oncol** 1988; 54: 307-309.
231. HAYASHI T, WATANABE Y, KUMANO K, KITAYAMA R, MURATANI T, YASUDA T, et al. *Protective effect of piperacillin against the nephrotoxicity of cisplatin in rats*. **Antimicrob Agents Chemother** 1989; 33: 513-518.
232. ISHIKAWA M, OZAKI M, TAKAYANAGI Y, SASAKI K. *Protection by chlorpromazine against lethality and renal toxicity of cisplatin in mice*. **Experientia** 1992; 48: 1142-1144.
233. HEYMAN SN, ROSEN S, SILVA P, SPOKES K, EGORIN MJ, EPSTEIN FH. *Protective action of glycine in cisplatin nephrotoxicity*. **Kidney Int** 1991; 40: 273-279.
234. HOLDING JD, STELL PM, LINDUP WE. *Failure of a 21-aminosteroid antioxidant to ameliorate cisplatin-induced nephrotoxicity*. **Hum Exp Toxicol** 1991; 10: 323-326.
235. HOWELL SB, PFEIFFLE CL, WUNG WE, LUCAS WE, YON JL. *Intraperitoneal cisplatin with systemic thiosulfate protection*. **Ann Intern Med** 1982; 97: 845-851.
236. MYERS CE, COLLINS JM. *Pharmacology of intraperitoneal chemotherapy*. **Cancer Invest** 1983; 1: 395-407.
237. APPENROTH D, WINNEFELD K. *Role of glutathione for cisplatin nephrotoxicity in young and adult rats*. **Ren Fail** 1993; 15: 135-139.
238. RUBIO PEREZ MJ. *Comparación de LAS 31126 frente a metoclopramida, como antiemético, en ratas Wistar*. **Tesis Doctoral**. Facultad de medicina. Universidad de Córdoba. Córdoba, 1991.

239. ABE R, AKIYOSHI T, BABA T. *Inactivation of cis-diamminedichloroplatinum (II) in blood by sodium thiosulfate.* **Oncology** 1990; 47: 65-68.
240. BOMPART G, ORFILA C, GIROLAMI JP. *Distal nephrotoxicity of cisplatin demonstrated by urinary kallikrein excretion and morphological study in rats.* **Toxicology** 1991; 69: 121-132.
241. GOEL R, CLEARY SM, HORTON C, KIRMANI S, ABRAMSON I, KELLY C, et al. *Effect of thiosulfate on the pharmacokinetics and toxicity of cisplatin.* **J Natl Cancer Inst** 1989; 81: 1552-1560.
242. SCHILSKY RL, BARLOCK A, OZOLS RF. *Persistent hypomagnesemia following cisplatin chemotherapy for testicular cancer.* **Cancer Treat Rep** 1982; 66: 1767-1769.
243. DAUGAARD G, ABILGAARD U, HOLSTEIN-RATHLOU NH. *Renal tubular function in patients treated with high-dose cisplatin.* **Clin Pharmacol Ther** 1988; 44: 164-172.
244. ANDERSON T, JAVADPOUR N, SCHILSKY R, BARLOCK A, YOUNG RC. *Chemotherapy for testicular cancer: Current status of the National Cancer Institute combined modality test.* **Cancer Treat Rep** 1979; 1687-1695.
245. WHANG R. *Magnesium deficiency: pathogenesis, prevalence and clinical implications.* **Am J Med** 1987; 82 (supl 3A): 24-29.