

Universidad de Ciencias Médicas de La Habana  
Facultad de Ciencias Médicas Victoria de Girón

## **AMIFOSTINA. UN TRATAMIENTO ALTERNATIVO CONTRA EL CÁNCER**

### **AMIFOSTINE: An alternative treatment against cancer**

**<sup>1</sup>MSc.Sonia R. Sánchez González, PhD. Claudina Zaldívar Muñoz<sup>2</sup>, Dra. Ela M. Céspedes Miranda<sup>3</sup>, PhD. René Suárez Martínez<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Master en Bioquímica. Auxiliar. Línea 602 entre B y C. El Vedado. Teléfono: 8362298. [sonia.sanchez@infomed.sld.cu](mailto:sonia.sanchez@infomed.sld.cu)

<sup>2</sup>Doctora en Ciencias Biológicas. Profesora titular. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.

<sup>3</sup>Doctora en Ciencias Médicas. Asistente. Investigadora Auxiliar. Calle 150 núm. 2134 entre 21 y 25. Municipio Playa. Teléfono 2083574. [elaces@infomed.sld.cu](mailto:elaces@infomed.sld.cu)

<sup>4</sup>Doctor en Ciencias Médicas. Profesor titular. Facultad de Ciencias Médicas Calixto García.

---

### **RESUMEN**

La Amifostina [ácido S-2-(3-aminopropilamino) etiofósforotioico)], prodroga que al desfosforilarse por la fosfatasa alcalina produce el WR1065 [2-(3\_aminopropilamino) etanotiol], actúa como atrapador de radicales libres (RL). Su empleo frente al cisplatino, agente que genera RL durante su acción, podría disminuir el daño a las células normales que captan selectivamente la prodroga. Se evaluó la capacidad de la amifostina a diferentes dosis sobre la peroxidación lipídica (TBARS) y la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en el tejido renal. Las dosis más efectivas fueron las más bajas, con las que se obtienen la menor concentración de TBARS y la menor actividad SOD y CAT. El modelo es una propuesta para evaluar el efecto citoprotector de la amifostina desde el nivel molecular al tisular.

**Palabras clave:** Amifostina, peroxidación lipídica; superóxido dismutasa; catalasa.

---

## ABSTRACT

Amifostine [acid S2-(3-aminpropylamino) ethylphosphorothioate)] a prodrug that on desfosforilization by the action of alkaline phosphatase, it produces cysteamine, which works as a free radical scavenger. Amifostine is used in presence of cisplatin, an agent that produces free radicals during its action. Amifostine could diminish the harm to normal cells that assimilate the prodrug selectively.

Based on different doses took place an evaluation of the ability of amifostine to reduce the effect on lipid peroxidation and the antioxidative system in the renal tissue. The smallest dose was the more effective one resulting with the lower levels of products of lipid peroxidation, and antioxidant system.

The suggested model allows evaluating the citoprotective effect of the amifostine ranging from the molecular to the tissue level.

**Key words:** amifostine, thiobarbituric acid reactive products; superoxide dismutase; catalase.

---

## INTRODUCCIÓN

Los estudios realizados con drogas citostáticas demuestran que muchas de ellas se comportan como mutágenos, carcinógenos químicos, o ambos, lo que aumenta el riesgo de desarrollar otro tumor debido al efecto mutagénico de la medicación o tratamiento recibido.<sup>1</sup> El uso de drogas citoprotectoras, conjuntamente con agentes antineoplásicos, protegen a los tejidos sanos de estos efectos adversos.

El cisplatino (cis diamino dicloro platino) es un antitumoral de gran efectividad en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades neoplásicas,<sup>2</sup> que destruye las células tumorales mediante la generación de radicales libres;<sup>3</sup> y no se excluye su efecto altamente tóxico al tejido sano, ya que su administración genera ototoxicidad, mielosupresión hepato y nefrotoxicidad, siendo esta última la manifestación tóxica más importante. La amifostina [ácido-S-2-(3-aminopropilamino) etilfosforotioico], conocida como WR 2721, está siendo usada como un agente modulador del efecto de diversos antineoplásicos, entre los que se encuentra el cisplatino.<sup>4,5,6,7,8</sup> Esta droga que penetra de manera selectiva en los tejidos sanos es desfosforilada por la fosfatasa alcalina a su metabolito activo, el WR 1065, y otros metabolitos que representan la droga activa y que por contener grupos sulfidrilos en su estructura poseen la capacidad de actuar como atrapadores de radicales libres.<sup>9,10,11</sup>

El propósito de este trabajo es evaluar el efecto de diferentes dosis de amifostina combinada con el cisplatino sobre la peroxidación lipídica, la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa extracelular (SOD) y catalasa (CAT), en el tejido renal.

## MATERIAL Y MÉTODO

### Animales de experimentación

Se utilizaron 60 ratones del sexo masculino, adultos, pertenecientes a la línea 0F1, peso comprendido entre 25 y 30 gramos, procedentes del Centro Nacional para la Cría de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Los animales fueron ubicados a razón de 5 por caja, y mantenidos con un suministro de agua y comida *ad libitum*, en una habitación a una temperatura promedio de 27°C, 50% de humedad relativa y ciclos de luz y oscuridad cada 12 horas. Se dejaron aclimatar una semana antes de comenzar el experimento.

### Diseño experimental

El cisplatino (1mg/ml, LEMERY MEXICO) se administró en una dosis de 10 mg/kg de peso, 15 minutos después de la amifostina en correspondencia con el esquema de tratamiento. Se utilizaron tres dosis de amifostina (Frasco de 500 mg anhidra, Acritos, Argentina): una máxima de 200 mg/kg, media 105 mg/kg y mínima de 56 mg/kg de peso. La dosis media de amifostina se obtuvo, según Farmacopea Brit.<sup>12</sup>

### Esquema de tratamiento

Los animales fueron divididos en 8 grupos: N: se le administró sólo cloruro de sodio, 0.9%; los grupos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> y A<sub>3</sub> recibieron las diferentes dosis de amifostina: 56, 105 y 200 mg/kg de peso corporal, respectivamente; a los grupos CA<sub>1</sub>, CA<sub>2</sub> y CA<sub>3</sub> se les combinó el cisplatino (10 mg/kg de peso) con cada una de las dosis de amifostina (56, 105 y 200 mg/kg, respectivamente), y finalmente el grupo C, al que se le administró sólo cisplatino.

Al término de las 24 horas, fueron sacrificados por dislocación cervical para la toma de la muestra de tejido renal, según las normas éticas para la experimentación animal. El tejido fue homogeneizado y después de centrifugar a 4000 rpm, 4°C, se obtuvo el sobrenadante para realizar las determinaciones bioquímicas.

Determinación de productos reactivos al ácido tiobarbitúrico (TBARs), mediante un método colorimétrico basado en la reacción del ácido tiobarbitúrico con los lipoperóxidos para producir un pigmento rojo que absorbe a 532 nm. La concentración se expresa en nmol/mL.<sup>13</sup>

Determinación de actividad superóxido dismutasa, mediante un método indirecto en el cual se mide la capacidad de esta enzima de inhibir la reacción de autoxidación del piragalol. La actividad se expresa en U/mL.<sup>14</sup>

Determinación de la actividad catalasa, mediante lectura continua del descenso de la absorción del peróxido de hidrógeno a 240 nm y se expresa en U/mL.<sup>15</sup>

### Procesamiento y análisis de los resultados

Se confeccionó una base de datos que fue exportada a un formato asequible al SPSS (10.1). El experimento, para evaluar la actividad enzimática en los órganos y animales de laboratorio seleccionados, siguió los principios declarados en el ANOVA de una vía. Todas las dócimas fueron efectuadas a un nivel alfa igual a 0.005.

## RESULTADOS

El ANOVA una vía modelo fijo, permitió evaluar las diferencias entre los grupos en relación con TBARS y actividad de las enzimas CAT y SOD en el riñón de los animales en estudio. Los valores específicos aparecen reflejados junto a sus valores medios y desviaciones estándares correspondientes en la Tabla 1.

Tabla 1. Medias, desviaciones estándares (S), estadígrafo F y probabilidad de error, según tratamientos y variables estudiadas en el riñón

Tratamiento	Valor promedio (X)±S		
	TBARS nmol/mL	SOD U/mL	CAT U/mL
Cisplatino 10 mg/kg	2.93 ± 0.71	32.39 ± 3.32	274.30 ± 80.90
Amifostina 56 mg/kg	1.56 ± 0.29	17.27 ± 2.48	70.60 ± 15.18
Amifostina 105 mg/kg	1.82 ± 0.64	19.50 ± 4.12	64.23 ± 16.24
Amifostina 200 mg/kg	1.79 ± 0.23	31.00 ± 3.77	246.92 ± 65.46
Amifostina 56 mg/kg + Cisplatino 10 mg/kg	1.58 ± 0.22	25.91 ± 4.02	127.82 ± 2.49
Amifostina 105 mg/kg + Cisplatino 10 mg/kg	1.13 ± 0.06	27.93 ± 5.64	130.23 ± 28.11
Amifostina 200 mg/kg + Cisplatino 10 mg/kg	1.95 ± 0.58	28.56 ± 4.74	267.15 ± 84.16
Control Negativo	0.96 ± 0.27	26.22 ± 7.45	81.85 ± 12.34
Razón F	10,426	6,379	16,904
P asociada	0,0000	0,0000	0,0000

Con el tratamiento con Amifostina a dosis de 56 mg/kg peso (A1), el efecto del tratamiento (C) es significativamente superior al (A<sub>1</sub>), (p=0.0063). El mismo procedimiento lo utilizamos para comparar el tratamiento de Cisplatino a dosis de 10mg/kg de peso (C) con el resto de los tratamientos y observamos que los valores medios de TBARS presentan diferencias significativas, excepto con el de amifostina a dosis de 200 mg/kg de peso combinado con el Cisplatino a dosis de 10 mg/kg de peso (CA3).

El resto de las comparaciones realizadas con A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, CA<sub>1</sub>, CA<sub>2</sub> y CA<sub>3</sub> no presentan diferencias significativas en el comportamiento que adoptan los valores medios de TBARS. En relación con la actividad SOD, según el examen proveniente de la prueba de comparaciones múltiples, se observa que existen diferencias muy significativas entre los valores medios de la SOD en los tratamientos Cisplatino a dosis de 10 mg/kg de peso (C) y el tratamiento con amifostina a dosis de 56 mg/kg de peso (A<sub>1</sub>), al igual que entre este último (A<sub>1</sub>) y la amifostina a dosis de 200 mg/kg de peso (A<sub>3</sub>).

La actividad catalasa del grupo C es diferente significativamente a los grupos con los tratamientos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, CA<sub>1</sub>, CA<sub>2</sub> y N. La actividad de esta enzima cuando se emplea amifostina a dosis de 56 mg/kg de peso (A<sub>1</sub>) o combinada con Cisplatino se diferencia significativamente de los tratamientos A<sub>3</sub> y CA<sub>3</sub>. La amifostina a dosis de 105 mg/kg de peso (A<sub>2</sub>) tiene diferencias significativas con los tratamientos A<sub>3</sub> y CA<sub>3</sub>. El tratamiento combinado de amifostina a dosis de 56 mg/kg de peso con Cisplatino a 10 mg/kg (CA<sub>1</sub>), también es significativamente diferente de CA<sub>3</sub>.

En el caso del combinado de amifostina a dosis de 105 mg/kg de peso con Cisplatino a 10 mg/kg (CA<sub>2</sub>), su diferencia es con CA<sub>3</sub> y; tanto en el grupo que recibió amifostina 200 mg/kg de peso como en el que recibió el tratamiento combinado de amifostina a dosis de 200 mg/kg de peso con Cisplatino a 10 mg/kg (CA<sub>3</sub>) la actividad catalasa resultó estadísticamente diferente del Control Negativo.

## DISCUSIÓN

El principal mecanismo de acción atribuido a la amifostina es atrapar radicales libres. Becker y colaboradores propusieron dos mecanismos, mediante los cuales los compuestos sulfidrílicos pueden proteger al ADN o reparar los daños ocasionados al mismo.<sup>15</sup> Uno de estos mecanismos plantea que el daño oxidativo al ADN pudiera repararse mediante la transferencia electrónica desde el grupo tiol al anión tiolato. Este anión era considerado inocuo; sin embargo, se ha demostrado que puede actuar como agente secuestrador de hidrógeno. El otro mecanismo propuesto comienza con la reacción del radical tiol con el tiol nativo para formar el anión disulfito, el electrón transferido desde el anión disulfito al sitio radicalar catiónico puede entonces reparar el daño catiónico al ADN. Alan, en 1999, plantea que el WR 1065 y el WR 33278 tienen semejanza con las poliaminas: las espermidinas y las esperminas. Similar a las poliaminas, la carga catiónica de los aminotioles facilita la unión al ADN y su empaquetamiento en una estructura relativamente condensada, además de la activación de genes involucrados en el mantenimiento de la integridad del genoma.<sup>16</sup> En el estudio del estado oxidativo del riñón, los resultados obtenidos con el Cisplatino coinciden con lo reportado por otros investigadores, quienes utilizaron diferentes dosis del fármaco.<sup>17</sup> El Cisplatino se acumula en el riñón y tiene preferencia por el ADN mitocondrial, lo que trae aparejado que se afecten las enzimas mitocondriales involucradas en el transporte de electrones, una explosión de las especies reactivas del oxígeno y, por tanto, un aumento significativo de la lipoperoxidación.<sup>18,19,20.</sup>

También se plantea que la amifostina, en dependencia de la dosis empleada, puede inhibir la fosforilación de proteínas intracelulares y, por tanto, los mecanismos de transducción de señales y la actividad de enzimas asociadas con la reparación del ADN, así como inducir hipoxia intracelular a través de un proceso de auto-oxidación. Las dosis de amifostina media y mínima disminuyen los valores de TBARS de manera significativa, lo que coincide con lo planteado por otros investigadores.<sup>21</sup> La actividad SOD se modificó en un intervalo muy estrecho de valores. La dosis mínima disminuyó de manera notable los valores de la actividad de esta enzima. En un estudio realizado *in vivo*, en el que se utiliza una dosis de 16 mg/kg de Cisplatino, se obtuvo un aumento de la actividad de la enzima SOD, hecho que se explica por un aumento en la formación de especies reactivas del oxígeno. La dosis de Cisplatino empleada en este experimento está por debajo de la empleada por Radhika y otros investigadores, lo que justificaría en parte que en el grupo tratado sólo con Cisplatino no se encuentren aumentos significativos de la SOD respecto al control negativo.<sup>22</sup> La actividad catalasa resultó mayor con

amifostina en dosis máxima, en respuesta a un incremento en la formación de especies reactivas.

Los resultados obtenidos en nuestro experimento evidencian que la amifostina, a la dosis máxima utilizada produce estrés oxidativo, que se evidencia con un aumento en la peroxidación lipídica y en la actividad de la catalasa, en relación con el control negativo.

Considerando el comportamiento de los tres indicadores del estado redox renal evaluados, podemos plantear que la dosis máxima de amifostina no protege el riñón frente al daño ocasionado por el Cisplatino, lo que trae como consecuencia un aumento de la peroxidación lipídica, producida por un incremento de especies reactivas y una respuesta de la defensa antioxidante del organismo que se manifiesta a través del incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes. Consideramos además que el modelo utilizado es válido para estudiar el efecto citoprotector de una sustancia desde el nivel celular al nivel tisular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kollmannsberger C, Kuzcyk M, Mayer F, Hartmann JT, Kanz L, Bokemeyer C. Latetoxicity following curative treatment of testicular cancer. *Semin Surg Oncol.* 17(4):275-81;1999.
2. De Lustig E. Radicales libres y cáncer. *Antioxidantes y calidad de vida.*(2):7;1995.
3. Bergstrom P, Johnsson A, Bergenheim T, Henriksson R. Effects of amifostine on cisplatin induced DNA adduct formation and toxicity in malignant glioma and normal tissues in rat. *J Neurooncol.* 2(1):13-21;1999.
4. Capizzi RL. Amifostine reduces the incidence of cumulative nephrotoxicity from cisplatin: laboratory and clinical aspects. *Semin Oncol.* 26(2 Suppl 7):72-81;1999.
5. Wasserman T. Radioprotective effects of amifostine. *Semin Oncol.*26(2Suppl 7): 89-94;1999.
6. Brizel DM. Pharmacologic approaches to radiation protection. *J Clin Oncol.*25(26):4084-9;2007.
7. Amifostina por inyección. American Heart Association. Enero 2008. <http://www.Wikipedia>. Fecha consultada: Enero, 2008.
8. Mertsch K, Grune T, Kunstmann S, Wiesner B, Ladhoff AM, Siems WG. *et al.* Protective effects of the thiophosphate amifostine (WR 2721) and a lazaroid (U83836E) on lipid peroxidation in endothelial cell during hypoxia/reoxygenation. *Biochem Pharmacol.*56(8):945-54;1998.
9. Kouvaris JR, Kouloulas VE, Vlahos LJ. Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector. *Oncologist.*12(6):738-47;2007.
10. Moss RW. Do antioxidants interfere with radiation therapy for cancer? *Integr Cancer Ther.*6(3):281-92;2007.

11. Farmacopea Británica. Apéndice XIV C- A- 165;1998.
12. Kunio Y. Chemistry and physics of lipids.45:337-5;1987.
13. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in autoxidation of pirogallol as a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem. 47:469-74;1987.
14. Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J Biol Chem. 195:137-40;1952.
- 15 Becker D Summerfield S, Gillich S, Sevilla MD. Influence of oxygen on the repair of direct radiation damage to DNA by thiols in model systems. Int J Radiat Biol. 65(5):537-48;1994.
16. Alan F. Use of Amifostine in hematologic Malignancies, myelodysplastic Syndrome, and acute Leukemia. Seminars in Oncology. 26(2):61-5;1999.
17. Yokosawa T. The role of ginsenoide-Rd in cisplatin-induced acute renal failure. Ren Fail. 22(2):115-27;2000.
- 18 Kröning R, Lichtenstein AK, Nagami GT. Sulfur containing aminoacids decrease cisplatin cytotoxicity and uptake in renal tubule epithelial cell Lines.Cancer Chemother Pharmacol. 45(1):43-9;2000.
19. Hospers GA, Eisenhauer EA, de Vries EG. The sulfhydryl container compounds WR-2721 and glutathione as radio-and chemoprotective agents A. review, indications for use and prospects. Br J Cancer.80(5-6):629-38;1999.
20. Mc Donough, Mele PC, Franz CG. Comparison behavioral and radioprotective effects of WR2721 and WR3689. Pharmacol Biochem Behav. 42(2):233-43;1992.
21. Cui H, Zhang S, Li P, Guan Z, Sun X, Shen K, Wu M, Hu X, Liu S, Di L, Zhang S. Amifostin in protection of kidney from cisplatin injury. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. 24(1):48-50;2002.
22. Rybak LP. Mechanisms of cisplatin ototoxicity and progress in otoprotection. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 15(5):364-9;2007.