

Desarrollo Tecnológico con aplicación en Terapias Fotodinámicas para el tratamiento de lesiones de la piel

Bustos Fierro C¹, Gavelli ME¹, Juarez AV², Pizarro R³, Jurgens C³, Manzo RH⁴, Pittau R², Romero JL⁵, Boetto N², Consigli C³, Olivera ME⁴

¹ Farmacia Central. Hospital Nacional de Clínicas. Facultad de Ciencias Médicas. UNC.

² Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, INICSA-CONICET, UNC.

³ Cátedra de Dermatología - Hospital Nacional de Clínicas, Facultad de Ciencias Médicas UNC.

⁴ Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas-UNC. UNITEFA-CONICET, UNC.

⁵ Cátedra de Oftalmología- Hospital Nacional de Clínicas, Facultad de Ciencias Médicas UNC.

Resumen

La terapia fotodinámica es un tratamiento de primera línea para ciertas lesiones de la piel como la queratosis actínica (QA). Con tales fines se emplean emisores de luz con alto costo de adquisición y mantenimiento. El Departamento de Bioingeniería, del Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba (UNC), desarrolló una nueva versión de dispositivo emisor, de bajo costo de fabricación, que emite luz pulsada intensa y es capaz de irradiar luz roja (630 nm) y azul (405 nm). Este dispositivo es potencialmente útil en el tratamiento de QA y carcinoma basocelular. Por otra parte el Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC, ha formulado el compuesto basado en el ácido α -aminolevulínico (ALA) que es el precursor del agente fotosensibilizador protoporfirina IX, habilitado por la ANMAT en presentaciones similares, y la Farmacia Central del Hospital Nacional de Clínicas (HNC) de la UNC, efectuó la preparación del medicamento como formulación magistral y extemporánea al 20%. Todas estas dependencias internas de la UNC articularon en la ejecución de un proyecto de Innovación Tecnológica, financiado por la SECYT-UNC, a los fines de completar las etapas de desarrollo y los estudios necesarios, para poder utilizar el equipamiento y el medicamento para terapias en el mencionado hospital. El presente trabajo aborda de manera particular, los resultados preliminares obtenidos en el estudio clínico, realizado en el área de Dermatología del HNC. Cabe destacar que como parte del proyecto, se pretende la construcción en serie del dispositivo emisor a través de la Institución

Contraparte participante del proyecto, que es una reconocida empresa local fabricante de equipamiento médico.

Palabras Claves: Terapia fotodinámica, ácido α -aminolevulínico, Queratosis Actínica.

1. Introducción

La terapia fotodinámica (TFD) se basa en la fotooxidación de materiales biológicos, inducida por la activación lumínica de un fotosensibilizador (Fs) localizado selectivamente en células alteradas biológicamente (hiperplásicas o tumorales). Este método requiere de la conjunción de tres elementos esenciales: Fs, luz y oxígeno [Dougherty, 1998; Dolmans, 2003]. Dichos elementos son individualmente inocuos, pero en combinación pueden iniciar una reacción fotoquímica que culmina en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), en especial oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), radical anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) [Agostinis, 2011].

Sustancias fotosensibilizadores

Características de un Fs ideal: a) capacidad de localizarse en las células a tratar; b) distribución homogénea en el tejido diana; c) alta liposolubilidad; d) breve lapso de tiempo entre su administración y la acumulación máxima en los tejidos; e) vida media corta y rápida eliminación de los tejidos normales; f) activación a λ con penetración tisular óptima; g) alto rendimiento en la generación de oxígeno ROS y h) ausencia de reactividad en oscuridad [Stapleton, 2003].

El ácido α -aminolevulínico (ALA) es el primer compuesto intermedio en la síntesis de las porfirinas. Se forma dentro de la mitocondria a partir de glicina y succinil-CoA [Rossi, 1990]. EL ALA realiza una «fotosensibilización endógena» del tejido tumoral ya que no es Fs por sí mismo, sino que es convertido enzimáticamente en el Fs activo, la protoporfirina IX (PpIX) [Orestein, 1996].

A diferencia de la mayoría de los Fs, que requieren administración intravenosa, ALA puede ser administrado por vía tópica u oral. Como resultado de la aplicación tópica de una solución de ALA al 20%, la PpIX se acumula en la piel. Al ser iluminada con luz de adecuada λ y en dosis suficiente, las células anómalas resultan destruidas [Gilaberte, 2006]. A las 24-48h de su administración, la PpIX, es eliminada totalmente de los tejidos disminuyendo el potencial de fotosensibilidad generalizada posteriores al tratamiento [Orestein, 1996; Cappugi, 2001].

Penetración de la luz en los tejidos y dosimetría

La penetración de la luz depende de las características del tejido a tratar. A mayor λ mayor penetración tisular. La penetración está influenciada por la absorción óptica debida a los cromóforos tisulares endógenos, la dispersión óptica dentro del tejido y el F_s [Anderson, 1992]. La elección de la fuente de luz debe basarse en la absorción del F_s y tipo de enfermedad a tratar. La eficacia clínica de la TFD depende de la dosis lumínica, de la densidad de potencia y del tiempo de exposición a la luz.

Lesiones de piel

La TFD utilizando ALA y sus derivados ha sido extensamente estudiada en el tratamiento de lesiones premalignas y malignas de piel. Dentro de las premalignas se encuentran las queratosis actínicas (QA), comúnmente presente en las áreas de mayor exposición solar. Las QA aparecen como resultado de una proliferación y diferenciación anómala de queratinocitos epidérmicos con riesgo de progresión a carcinoma epidermoide infiltrante o carcinoma basocelular. Clínicamente las QA aparecen como lesiones simples y a veces toman un aspecto múltiple con cambios queratósicos en su superficie. Estas lesiones miden unos pocos milímetros, en estadios tempranos su apariencia es escamosa con un leve eritema.

El Departamento de Bioingeniería, del Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Médicas, UNC, desarrolló una nueva versión de dispositivo emisor (NDE). Este presenta bajo costo de fabricación, emite luz pulsada intensa y es capaz de irradiar luz roja (630 nm) y azul (405 nm) (Figuras 1). Este dispositivo es potencialmente útil en el tratamiento de QA y carcinoma basocelular. Por otra parte el Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC, ha formulado el compuesto basado en ALA, habilitado por ANMAT en presentaciones similares, y la Farmacia Central del Hospital Nacional de Clínicas (HNC), UNC, efectuó la preparación como formulación magistral y extemporánea al 20% en solución, debido a que la especialidad medicinal aprobada por la ANMAT no se encuentra disponible comercialmente.

Todas estas dependencias internas de la UNC articularon en la ejecución de un proyecto de Innovación Tecnológica, financiado por la SECYT-UNC, a los fines de

completar las etapas de desarrollo y los estudios necesarios, para poder utilizar el equipamiento y el medicamento para terapias en el HNC.

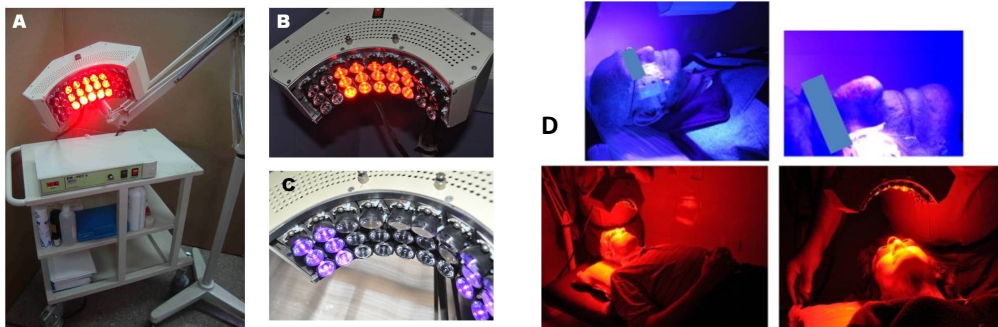


Figura 1. Lámpara empleada en el estudio. A y B muestran los LED rojos encendidos y C los LED azules. D: ambos LED iluminando el rostro del paciente.

2. Objetivos

Objetivo general: Evaluar en forma preliminar la eficacia y seguridad de la TFD en pacientes con QA, utilizando NDE y ALA como Fs.

Objetivos específicos:

- Estudiar la respuesta de pacientes diagnosticados clínicamente con QA, utilizando ALA y el NDE.
- Transferir la tecnología a la sociedad.
- Disponer de un tratamiento económicamente más accesible que los existentes, para tratar lesiones premalignas de la piel.

3. Materiales y métodos

Lugar de trabajo: HNC, Facultad de Ciencias Médicas, UNC.

Pacientes: aquellos que asistieron al Servicio de Dermatología del HNC. Cada paciente incorporado firmó el consentimiento informado.

Criterio de inclusión: pacientes con diagnóstico de QA, mayores de 18 años de edad de ambos sexos y con historia clínica completa.

Criterio de exclusión: pacientes con tratamientos fotosensibilizadores previos en la lesión, con porfiria y/o xeroderma pigmentoso, lesiones premalignas en la piel con

características ulcerosas y/o nodulares, lesiones basocelulares, epitelomas, QA con profundidad mayor a 3mm o que presenten signos de pigmentación y/o que estén recibiendo al mismo tiempo medicamentos inmunosupresores.

Equipamiento: se contó con el NDE, fuente lumínica parabólica, que emite pulsos con intensidad de emisión de luz, seguidos de pulsos de no emisión.

Consta de tecnología de iluminación de diodos emisores de luz LED (Light-Emitting Diode) de alto brillo. El NDE está compuesto por 27 LED. La tabla 1 presenta la información técnica de la fuente lumínica según mediciones realizadas por el Departamento Salud Ocupacional Radiofísica Sanitaria, Ministerio de Salud del Gobierno de la Provincia de Córdoba:

Tabla 1: Características del NDE

Alimentación	AC Input: 220 Voltios , DC Output: 12 y 5 Voltios Modo: Switching Seguridad: Cumple con normas IEC601 de la Comisión Electrotécnica Internacional
Emisores (para tratamiento)	Cantidad: 15 unidades. Espectro: 630 nm. Dicha λ es la requerida para la activación del ALA y permite una penetración dérmica profunda. Intensidad: 80 lúmenes por cada emisor Focalización: 10 cm ² Distancia de la aplicación: 90 mm.
Emisores (para diagnóstico)	Cantidad: 12 unidades. Espectro: UV a 405nm Intensidad de emisión: 45mW por cada emisor Focalización: 100 cm ² Distancia de aplicación: 150 mm

Materiales: debido a que la presentación aprobada por ANMAT para la aplicación de TFD en QA, de grosor mínimo a moderado (grado 1 o 2) no se encuentra disponible en nuestro país se elaboró una solución magistral y extemporánea al 20% de ALA (sALA),

Período incubación: el período óptimo fue de 2 hs, establecido con la luz azul y monitoreando el tiempo requerido para alcanzar la máxima fluorescencia, producida por

la conversión del ALA en protoporfirina IX en las mitocondrias, luego de la aplicación de sALA en un voluntario.

Estudio clínico: abierto y prospectivo aprobado por Comité de Ética del HNC. Período de estudio: desde octubre de 2013 hasta octubre de 2014. Se incluyeron 30 pacientes con QA (16 varones y 14 mujeres), edad promedio 74 años (46-89). Se los citó una semana previa al comienzo del tratamiento, para hacerles la anamnesis. Se llenaron planillas con datos de los pacientes y esquemas con las ubicaciones de sus lesiones.

Tratamiento fotodinámico: consistió en la aplicación tópica de sALA en las lesiones, teniendo en cuenta que dicha solución no escurra ni gotee. Luego, fueron cubiertas durante 2 hs con un apósito para protegerlas de la luz artificial o solar y evitar la fotodescomposición del ALA. Luego del período de incubación, las mismas fueron irradiadas durante 4 minutos a 630 nm (potencia 100 mW/cm², energía 25 J/cm²). Las lesiones fueron fotografiadas antes y después de cada tratamiento.

Los pacientes fueron examinados al inicio, a los 15 días pos-tratamiento y a los 6 meses, solo en aquellos pacientes que hasta la fecha del estudio cursaron ese tiempo. En aquellos pacientes que presentaron una curación parcial o no la presentaron en algunas de las lesiones tratadas, fueron re-tratados al mes del comienzo del tratamiento. Cabe aclarar que los pacientes serán examinados a los 6 y 12 meses para evaluar la recurrencia de la/s lesiones. Se considerará que un paciente no tiene recurrencia, si ninguna de sus lesiones reaparece después de 12 meses.

Seguridad y eficacia: Los pacientes fueron indagados en cada ocasión acerca de la aparición de eventos adversos, la frecuencia, importancia y severidad de los mismos. A sí mismo, se sabe que el ALA utilizado en las TFD produce dolor y molestias durante la irradiación, por lo tanto, se utilizó agua termal para aliviar las reacciones adversas ocasionadas por el tratamiento. Se consideró efectivo al tratamiento, cuando hubo ausencia de escamas o rugosidad.

Fuente de financiamiento: Subsidio para Innovación y Transferencia de Tecnología, otorgado por la Secretaría de Ciencia y Tecnología (SECYT) de la UNC.

Evaluación de la Información: Luego de la toma de los datos por parte de los investigadores, la información generada se llevó a una “base de datos” (planilla Excel), para su procesamiento. Los datos de los pacientes que se retiraron del estudio, se

consideraron *valores perdidos*. El aspecto estético en general del paciente fue evaluado utilizando métodos descriptivos por parte de los dermatólogos.

4. Resultados

De los 30 pacientes tratados, uno de ellos no volvió al control, por lo que se descartó. En los 29 pacientes restantes, se trataron 337 lesiones ubicadas en frente (96), cuero cabelludo (93), mejilla (79), nariz (54), mano (10), labio (2), oreja (1), espalda (1) y mentón (1). A los 15 días pos-tratamiento, se observó desaparición completa de rugosidad en 273 (81%) de las lesiones en 28 pacientes. De las 64 lesiones restantes, 23 (en 9 pacientes) fueron re-tratadas y 16 de ellas se curaron, por lo que el porcentaje de curación ascendió a 85,75%. Las lesiones curadas entre las tratadas y re-tratadas fueron: 89 en la frente, 70 en el cuero cabelludo, 57 en la mejilla, 49 en la nariz, 10 en mano, 2 en labio y 1 en oreja, espalda y mentón (Figura 2).

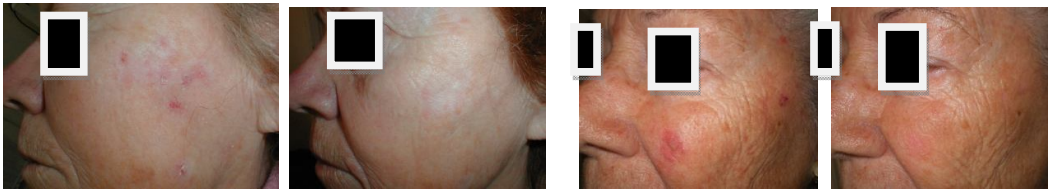


Figura 2: Imagen representativa de pacientes antes del tratamiento y post tratamiento.

Siete pacientes con 29 lesiones curadas, fueron controlados a los 6 meses sin observar recurrencia en ninguna de ellas. No se observaron cicatrices importantes o hiperpigmentación. Las reacciones adversas fueron predecibles: prurito (2 pacientes), ardor (7 pacientes), picazón (3 pacientes), dolor (1 paciente), molestia (1 pacientes), molestia y picazón (2 pacientes) y ardor y picazón (1 paciente) y revirtieron a las 24 horas. Doce pacientes no refirieron molestias de ningún tipo.

5. Discusión

La TFD es un tratamiento de elección frente a otras terapias, debido a que es muy selectivo, con excelentes resultados cosméticos, no invasivo y tiene la posibilidad de tratar múltiples lesiones simultáneamente. Es, además, un tratamiento ambulatorio, no afecta las células pigmentarias y puede ser aplicada varias veces sin contraindicaciones

ni efectos acumulativos. Puede aplicarse en pacientes en donde la cirugía no está indicada como los pacientes añosos o que tengan problemas ante anestesia o sensibilidad a los fármacos. Asimismo, la TFD tiene un bajo potencial de daño a nivel de ADN (λ del espectro visible) y al utilizarse Fs que no se acumulan en forma significativa en el núcleo celular, la TFD evita de esta manera inducir mutaciones o carcinogénesis [Gomer, 1988]. La especificidad relativa del Fs en las células anormales, reducen los riesgos potenciales. [Morton, 2002]. Sin embargo, el alto índice de recurrencia tumoral y el elevado costo del tratamiento limitan el acceso a esta terapia solo a un grupo selecto de pacientes [Pittau, 1998; Pons, 2002]. Este estudio pudo confirmar las ventajas de la TFD y además, demostrar las siguientes ventajas frente a las TFD convencionales: menor período de incubación, el cual fue determinado en 2 horas frente a las 3-14 horas que requieren las TFD convencionales, y menor tiempo de irradiación (4 min vs. 9 min).

Una desventaja atribuida al ALA, son los efectos adversos que presenta en el momento de la irradiación, como son dolor y molestia, debiendo en muchos casos suspender el tratamiento. En el presente estudio, la tolerabilidad fue mejor que en otros ensayos clínicos que utilizaron ALA como agente fotosensibilizante. Esto podría vincularse a las características de emisión de luz del NDE utilizado, emite pulsos con intensidad de emisión de luz, seguidos de pulsos de no emisión; evitando así, el aumento de la temperatura en la zona tratada. Para calmar las molestias ocasionadas, fue suficiente la utilización de agua termal para revertirlas.

El NDE presenta además, otras ventajas frente a otros dispositivos, y es la utilización de LED, los cuales, al emitir luz difusa permiten que la superficie irradiada se ilumine en forma homogénea. Los mismos, consumen energía en una fracción de velocidad de los sistemas basados en la tecnología de banda ancha, por lo cual utilizan menos del 10% de la energía que una lámpara halógena, manteniendo los costos de la energía bajos y otorgándole una mayor vida útil con una menor generación de calor y menor consumo de energía pero con una longitud de onda específica.

Para llevar a cabo el presente estudio, fue necesario, la articulación de dependencias internas de la UNC para la ejecución del proyecto de Innovación Tecnológica, financiado por la SECYT-UNC.

Cabe destacar que como parte del proyecto, se pretende la construcción en serie del dispositivo emisor a través de la Institución Contraparte participante del proyecto, que es una reconocida empresa local fabricante de equipamiento médico.

6. Conclusión

La TFD en estudio es segura y efectiva para el tratamiento de QA, con una elevada tasa de curación en la primera aplicación. La irradiación puede iniciarse en un corto tiempo pos-aplicación y es muy bien tolerada por los pacientes.

Bibliografia

Agostinis, P., et al., *Photodynamic therapy of cancer: an update*. CA Cancer J Clin, 2011. 61(4): p. 250-81.

Anderson, R.R., *Optics of the skin.*, in *Clinical Photomedicine*, S. Lim H. W. and N. A., Editor. 1992, Macel Dekker: New York. p. 19-30.

Cappugi, P., et al., *Topical 5-aminolevulinic acid and photodynamic therapy in dermatology: a minireview*. J Chemother, 2001. 13(5): p. 494-502.

Dolmans, D.E., D. Fukumura, and R.K. Jain, *Photodynamic therapy for cancer*. Nat Rev Cancer, 2003. 3(5): p. 380-7.

Dougherty, T.J., et al., *Photodynamic therapy*. J Natl Cancer Inst, 1998. 90(12): p. 889-905.

Gilaberte, Y., et al., *Terapia fotodinámica en dermatología*. Actas Dermosifiliogr. , 2006(97): p. 83-102.

Gomer, C.J., N. Rucker, and A.L. Murphree, *Transformation and mutagenic potential of porphyrin photodynamic therapy in mammalian cells*. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med, 1988. 53(4): p. 651-9.

Morton, C.A., et al., *Guidelines for topical photodynamic therapy: report of a workshop of the British Photodermatology Group*. Br J Dermatol, 2002. 146(4): p. 552-67.

Orenstein, A., et al., *A comparative study of tissue distribution and photodynamic therapy selectivity of chlorin e6, Photofrin II and ALA-induced protoporphyrin IX in a colon carcinoma model*. Br J Cancer, 1996. 73(8): p. 937-44.

Pittau, R.F., et al., *An inexpensive light source for oncologic photodynamic therapy*. IEEE Eng Med Biol Mag, 1998. 17(3): p. 105-6.

Pons, P., et al., [*Prototype of light source for photodynamic therapy in Centre of Electron Microscopy*]. Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba, 2000. 57(1): p. 31-6.

Rossi, E., et al., *Inhibition of human lymphocyte ferrochelatase activity by hemin*. Biochim Biophys Acta, 1990. 1038(3): p. 375-81.

Stapleton, M. and L.E. Rhodes, *Photosensitizers for photodynamic therapy of cutaneous disease*. J Dermatolog Treat, 2003. 14(2): p. 107-12.