

NIVELES DE TOPOTECAN EN EL VITREO LUEGO DE LA ADMINISTRACION PERIOCLAR EN CONEJOS

Dres. G. Chantada¹, G. Bramuglia⁵, A. Fandiño², M. T. G. de Dávila⁴, F. Casco⁴, G. Mato³, J. Cacici⁵, J. O. Croxatto⁶, M. Rubio⁵, D. Abramson⁷

RESUMEN

Objetivo: Estudiar los niveles de topotecan total y lactona en el vítreo luego de la administración periocular en un modelo animal. Material y métodos. Se administró 1 mg de topotecan periocular en ambos ojos a 9 conejos sin retinoblastoma y se midieron niveles en el vítreo a las 0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 24 horas. Se midieron niveles plasmáticos en 2 animales a las 2 horas. Se midió topotecan total y lactona por HPLC. Todos los animales fueron enucleados al completar el experimento y los ojos fueron examinados patológicamente para evaluar toxicidad. Resultados: Tanto el topotecan total como la lactona alcanzaron altos niveles en el vítreo, mostrando un pico a los 30 minutos de la administración periocular. Los niveles medios en el pico fueron de 158 ng/ml para el topotecan total y 122 ng/ml para el topotecan lactona decayendo con una vida media de 2.44 hs y 2.8 hs para el topotecan total y lactona respectivamente. Se encontraron bajos niveles plasmáticos en los 2 animales estudiados a las 2 hs de la administración de topotecan periocular (32.0 ng/ml). No se evidenció toxicidad significativa. Conclusiones: En este estudio preliminar, el topotecan mostró lograr penetrar al vítreo luego de la administración periocular a concentraciones potencialmente tumoricidas. Nuestro grupo proseguirá con estudios más detallados para evaluar su comportamiento farmacocinético con el fin de utilizarlo potencialmente en paciente con retinoblastoma.

Palabras clave: retinoblastoma, topotecan, vítreo, administración periocular

Medicina Infantil 2007; XIV: 129 - 133.

ABSTRACT

Purpose: To evaluate topotecan levels in the vitreous after periocular administration. Material and methods: Nine non tumor-bearing rabbits were given 1mg of periocular topotecan to each eye and vitreous levels were obtained at 0.25, 0.5, 1, 2, 4 and 24 hours. Plasma levels were obtained at 2 hours in two animals. Total and lactone topotecan were measured by HPLC. All animals were enucleated at the completion of the experiments and eyes were pathologically assessed for toxicity. Results: Total and lactone topotecan reached high concentrations in the vitreous and peaked at 30 minutes after periocular administration (mean 158 ng/ml and 122 ng/ml respectively) declining thereafter with a $t_{1/2}$ of 2.44 hs and 2.8 hs for the total and lactone forms respectively. Low total topotecan levels were found in plasma 2 hours after subconjunctival administration (32.0 ng/ml). No serious toxicity occurred. Conclusions: Topotecan achieves high levels of the lactone form in the vitreous after periocular administration. Its potential use in retinoblastoma will be further studied.

Key words: retinoblastoma, topotecan, vitreous, periocular administration.

Medicina Infantil 2007; XIV: 129 - 133.

Servicios de: ¹Hemato-oncología, ²Oftalmología, ³Farmacia Oncológica y ⁴Patología. Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan. ⁵Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, ⁶Patología Ocular, Fundación Oftalmológica Argentina Jorge Malbrán, ⁷Ophthalmology and Surgery, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY, USA.
Correspondencia: Guillermo Chantada,
Combate de los Pozos 1881, Ciudad de Buenos Aires, (CP 1245).
Te: 4308-4300 (Int.1302) - Fax: 4308-5325

INTRODUCCION

La quimioterapia sistémica se administra a pacientes con retinoblastoma con el objetivo de reducir el volumen tumoral con el fin de evitar ya sea la enucleación o la radioterapia externa. Las siembras en el humor vítreo son un factor limitante del éxito de este tratamiento ya que cuando el tumor lo invade, la mayoría de los ojos son

finalmente enucleados¹⁻⁴. El vítreo carece de vasculatura, por lo que la penetración de las drogas quimioterápicas es escasa cuando se las administra por vía endovenosa, inclusive algunas como el etopósido ni siquiera es detectada en el vítreo⁵. Una estrategia para mejorar la llegada de la quimioterapia al vítreo es el uso de la vía periocular o intravítrea. Esta última es poco recomendada en el retinoblastoma debido a que puede causar diseminación del tumor en la orbita. La vía periocular es, aunque menos eficiente, la más recomendada para poder evitar este riesgo. De este modo, esta estrategia propuesta por el grupo del Dr Abramson en Nueva York es la más utilizada, siendo el carboplatino la única droga probada hasta ahora extensamente⁶. Por tal razón, en vista de la escasa cantidad de drogas utilizadas por esta vía, es necesario identificar nuevas alternativas terapéuticas con distinto mecanismo de acción para la administración periocular⁵⁻⁷.

El topotecan es una alternativa atractiva para su uso periocular. Ha sido relativamente bien estudiado en un gran variedad de malignidades pediátricas y se han descrito su uso mediante vías de administración alternativas como ser intratecal o intraperitoneal⁸⁻⁹, habiéndose probado en el retinoblastoma inclusive por nuestro grupo. El topotecan no se caracteriza por tener toxicidad significativa ocular o en el sistema nervioso teniendo actividad sinérgica con el carboplatino¹⁰⁻¹². Estudios recientes en modelos animales demostraron que la combinación topotecan-carboplatino es la más activa de todas las probadas¹². Sin embargo, es imposible asociar ambas drogas por vía endovenosa, debido a su toxicidad, fundamentalmente hematológica. La actividad antitumoral del topotecan es dependiente de la dosis y del esquema de administración y su farmacocinética depende de múltiples factores como se el pH, la unión a proteínas plasmáticas, pudiendo todos ellos alterar la relación carboxilato/lactona. Por consiguiente, en vista de estas particularidades de la droga, es esencial su estudio farmacocinético para evaluar estos hechos. Existen escasas publicaciones acerca del topotecan periocular, por lo que este hecho nos motivó a realizar este estudio con el fin determinar si el topotecan alcanza niveles adecuados en el vítreo luego de su administración periocular.

MATERIAL Y METODOS

Animales

Estudiamos 9 conejos de Nueva Zelanda pesando 2 a 2,5 Kg para los experimentos. Todos los animales permanecieron anestesiados durante el procedimiento recibiendo ketamina (35 mg/kg) y xylazina (3.5 mg/kg) junto con Lidocai-

na tópica para la administración periocular y la toma de muestra. Luego de completado el experimento, todos los animales fueron sacrificados utilizando dosis letales de pentobarbital y ambos ojos fueron enucleados previo al sacrificio del animal. Los animales fueron manejados de acuerdo a las normas de la Association for Research in Vision and Ophthalmology para el manejo de animales para investigación oftalmológica

Administración de la quimioterapia

Se utilizó topotecan comercialmente disponible (Hycamtin®). La droga se diluyó en PBS a una concentración final de 1 mg/ml y fue administrada en forma inmediata en forma periocular en el cuadrante inferior del ojo.

Estrategia de muestreo

El vítreo se punzó en forma transconjuntival utilizando una aguja 16-18 G y una jeringa de tuberculina. Se han procurado muestras del vítreo luego de la administración de topotecan periocular en ambos ojos a las 0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 24 horas. Se decidió administrar la droga a ambos ojos teniendo en cuenta que ese era un escenario posible en la situación clínica en la que pacientes con retinoblastoma bilateral avanzado requirieran tratamiento. Se obtuvieron niveles plasmáticos a las 2 horas en 2 animales. Las muestras fueron congeladas inmediatamente a -20 C hasta las mediciones de la droga por HPLC.

Mediciones de Topotecan

Las muestras de vítreo fueron disueltas previamente con PBS (pH: 7.4) y luego analizadas para topotecan total y lactona utilizando un método previamente descrito de cromatografía líquida de alta performance (HPLC)¹⁴. La separación se realizó en una columna Phenomenex Luna C18 (150 mm x 4.6 mm I.D., 3 µm tamaño de partícula), precedida de una columna Phenomenex SecurityGuard (3 mm x 10 mm I.D. packed with C18). El topotecan fue detectado con un fluorómetro. La longitud de onda de excitación se estableció en 362 nm y la de emisión en 502 nm. El flujo fue 1ml/min. La fase móvil consistió en un buffer de TEAA (2% buffer de acetato de trietilamina pH=5.5): acetonitrilo (90:10).

Evaluación de toxicidad

Los ojos enucleados fueron inmediatamente fijados en formol al 10% y luego fueron evaluados para detectar evidencias de toxicidad corneal, retinal, del nervio óptico y de esclera. Dos patólogos revisaron las laminillas a ciegas (MTGD y OC) Se realizó fundoscopia en todos los animales enucleados más allá de las 24 horas de

haber recibido el topotecan por una experimentada oftalmopediatra (AF).

RESULTADOS

Niveles vítreos

Los niveles medidos en el vítreo, mostraron un pico a los 30 minutos luego de la administración periocular y declinaron posteriormente con una vida media ($t_{1/2}$) de 2.44 horas y 2.8 horas para las formas totales y lactona de topotecan respectivamente (Tabla 1 y Figura 1). Las concentraciones medias de topotecan y lactona a los 30 minutos fueron 158 ng/ml y 122 ng/ml respectivamente (Figura 1). No se encontraron evidencias de topotecan a las 24 horas y a la semana. Tanto la lactona y el topotecan total mostraron un pico al mismo tiempo pero la proporción relativa de lactona tendió a reducirse con el tiempo (Figura 1).

Niveles plasmáticos

Se encontraron bajos niveles de topotecan a las 2 horas en un animal luego de la administración de 1 mg de topotecan a cada ojo (32 ng/ml de topotecan total) y en el animal restante no se logro detectar.

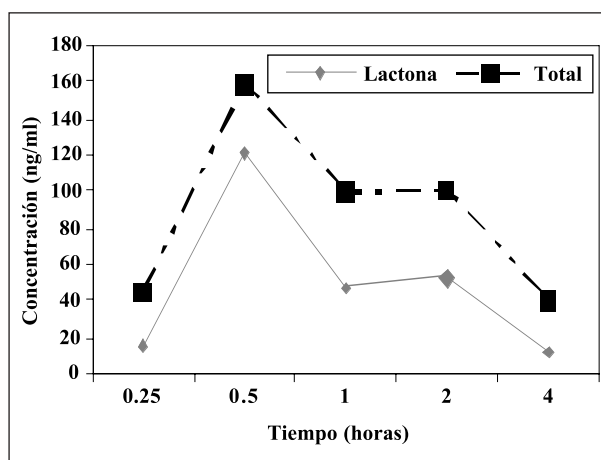


Figura 1: Concentraciones medias de topotecan (total and lactone) en el vítreo luego de la administración periocular de 1 mg.

Toxicidad

Todos los animales presentaron edema periorbitario leve luego de la administración de topotecan periocular, aunque resolvió en pocas horas sin tratamiento específico. No se evidencio toxicidad en el fondo de ojo en ningún animal. No hubo evidencia de toxicidad en el estudio histopatológico.

TABLA 1: CONCENTRACIONES VÍTREAS DEL TOPOTECAN TOTAL (Y LACTONA) LUEGO DE LA ADMINISTRACIÓN PERIOULAR DE 1 MG A AMBOS OJOS. (OD=OJO DERECHO, OS OJO IZQUIERDO, ND: NO DETECTABLE, NA: NO MEDIDO).

Conejo	Primera muestra	Nivel (ng/ml)	2a muestra	Nivel (ng/ml)	3a muestra	Nivel (ng/ml)
1	0.25 hs	OD: 39.5 (10.1) OS: 49.2 (19.8)				
2	0.5 hs	OD: 146.9 (94.7) OS: 148.4 (86.9)	1 h	OD: 148.4 (86.8) OS: 141.5 (80.9)	2 hs	OD: 180.7 OS: NA
3	0.5 hs	OD: 162.4 (154.7) OS: 173.8 (149.8)	2 hs	OD: 146.9 (124.6) OS: NA		
4	1 h	OD: 61.34 (13.3) OS: 47.5 (4.5)				
5	2 hs	OD: 34.3 (19.2) OS: 40.3 (13.5)	4 hs	OD: 55.7 (24.7) OS: 33.0 (NA)		
6	4 hs	OD: 13 (5) OI: 32.5 (5.2)				
7	24 hs	OD: ND OS: ND				
8	1 semana	OD: ND OS: ND				
9	1 semana	OD: ND OS: ND				

DISCUSION

La administración local de quimioterapia ha recibido una creciente atención en la literatura ya que se la reconoce como una forma eficaz de lograr altos niveles de quimioterapia en el segmento posterior del ojo, a la vez que los efectos sistémicos son poco importantes. Este hecho es de especial importancia en el retinoblastoma ya que estos niños presentan una predisposición especial a desarrollar segundas neoplasias.

En nuestro estudio, encontramos que el topotecan logra altos niveles en el vítreo luego de la administración de 1 mg por la vía periocular a ambos ojos. La elección del topotecan para esta investigación, se basó en experiencias previas de nuestro grupo así como en las características favorables de esta droga, como ser su escasa toxicidad y sus características farmacocinéticas¹⁰. En nuestro estudio, se encontraron altos niveles de la droga en el vítreo luego de la administración periocular, tal como se conoce para el carboplatino, la droga de mayor uso en este tumor. Sin embargo, en nuestro estudio, se administró la droga a ambos ojos simultáneamente y los niveles plasmáticos no han sido estudiado en detalle ya que el objetivo primario del estudio fue determinar si la droga lograba niveles potencialmente útiles en el vítreo. Existe la posibilidad de que la droga se absorba por vía sistémica luego de la administración periocular. Para descartar esta eventualidad, una vez determinado el pasaje al vítreo por medio de este estudio, nuestro grupo decidió hacer una investigación más detallada de la cinética de la droga luego de la administración periocular. De ser la circulación sistémica la vía preferente de absorción, el hecho de haber administrado la droga a ambos ojos, sería capaz de aumentar artificialmente las concentraciones de topotecan en el vítreo, ya que la dosis real sería de 2 mg. En nuestro próximo estudio, con el fin de evitar esta eventualidad, se administrará la droga a un solo ojo. Otro dato importante de este estudio, es que la forma lactona del topotecan muestra una alta proporción en el vítreo, hecho no reportado hasta el momento. Es posible que el vítreo sea un ambiente favorable para la forma lactona, en particular debido a su bajo contenido proteico, a pesar de que el pH del vítreo es similar al plasmático, el cual favorece a la forma carboxilada. Sin embargo, el vítreo del conejo puede mostrar particularidades especiales no presentes en el humano que alteren esta relación. Por razones obvias, no es posible obtener niveles en el vítreo en humanos. Además, la permeabilidad de la esclera puede ser distinta en ambas especies al tiempo que los ojos de pacientes con retinoblastoma pueden mostrar mayor permeabili-

dad ocular que aquellos sin tumor. Este hecho fue demostrado con el carboplatino, ya que los niveles que se obtienen en humanos luego de la administración endovenosa a pacientes que requerían enucleación y quimioterapia al ojo contralateral, demostraron mayores niveles que los que los estudios en animales había previsto. El estudio en modelos murinos con retinoblastoma sería otra alternativa, aunque la administración periocular en estos animales tiene amplias limitaciones que impiden una reproducibilidad total de los resultados. Específicamente, las mutaciones que ocurren en el retinoblastoma murino, no necesariamente se correlacionan con las que ocurren en humanos y eso puede influir en su sensibilidad al tratamiento. Las punciones repetitivas también pueden influir en los niveles que se detectan en el humor vítreo, ya que la disrupción anatómica que causan pueden alterar la barrera hemato-ocular¹⁸. Para un estudio farmacocinético completo, se requerirían alrededor de 100 muestras, lo cual es difícilmente justificable en estos estudios descriptivos¹⁹. Por esa razón, la mayoría de los estudios de farmacología ocular de las drogas quimioterápicas en animales cuentan con un número limitado de animales, debiendo incluir un número mayor cuando se realizan estudios comparativos^{5,20-22}. El uso de técnicas de microdiálisis se ha propuesto para solucionar este problema ya que con ella, es posible tomar múltiples muestras de un mismo animal sin dañar la anatomía en forma significativa¹⁸. Sin embargo, esta técnica aun no se ha utilizado en modelos de aplicación de quimioterapia periocular. En el caso particular del topotecan, debería considerarse además la posibilidad de conversión *ex vivo* de la droga a la forma carboxilada inactiva, lo cual daría datos sobre el topotecan total y no sobre la fracción de lactona²³.

Para concluir, este estudio demuestra que:

- El topotecan penetra adecuadamente al humor vítreo luego de la administración periocular, logrando altos niveles de su forma activa (lactona) en nuestro modelo experimental.
- No se evidenció toxicidad clínica ni histopatológica.

Dados estos resultados preliminares alentadores, nuestro grupo está llevando a cabo estudios más detallados para obtener un perfil farmacocinético más preciso y evaluar los mecanismos de absorción periocular de la droga.

Agradecimientos

Este estudio fue realizado gracias al apoyo del Fund for Ophthalmic Knowledge. El topotecan fue donado por el Dr. Carlos Trapani (Glaxo Smith Klein, Argentina) mediante un apoyo sin condicionamientos. Agradecemos a María Labraga por colaboración técnica.

REFERENCIAS

1. Abramson DH, Frank CM. Second nonocular tumors in survivors of bilateral retinoblastoma: A possible age effect on radiation-related risk. *Ophthalmology* 1998; 105:573-580.
2. Shields CL, Mashayekhi A, Demirci H, Meadows AT, Shields JA. Practical approach to management of retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2004; 122:729-35.
3. Lee TC, Hayashi NI, Dunkel IJ, et al. New retinoblastoma tumor formation in children initially treated with systemic carboplatin. *Ophthalmology*. 2003; 110:1989-94.
4. Rodriguez-Galindo C, Wilson MW, Haik BG, et al. Treatment of intraocular retinoblastoma with vincristine and carboplatin. *J Clin Oncol*. 2003; 21:2019-25.
5. Mendelsohn M, Abramson D, Madden T, et al. Intraocular concentrations of chemotherapeutic agents after systemic or local administration. *Arch Ophthalmol* 1998; 116:1209-1212.
6. Abramson DH, Frank C, Dunkel I. A phase I/II study of subconjunctival carboplatin for retinoblastoma. *Ophthalmology* 1999;106:1947-1950.
7. Kaneko A, Suzuki S. Eye-preservation treatment of retinoblastoma with vitreous seeding. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33:601-607.
8. Verschraegen CF, Jaecckle K, Giovanella B, et al. Alternative administration of camptothecin analogues. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;922:237-46.
9. Blaney S, Heideman R, Berg S, et al. Phase I clinical trial of intrathecal topotecan in patients with neoplastic meningitis. *J Clin Oncol* 2003; 21:143-147.
10. Chantada G, Fandiño A, Casak S, et al. Activity of topotecan in retinoblastoma. *Ophthalmic Genet* 2004; 25: 37-43.
11. Frangoul H, Ames M, Mosher R, et al. Phase I study of topotecan administered as a 21-day continuous infusion in children with recurrent solid tumors: A report from the Childrens Cancer Group. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 3956-3962.
12. Rowinsky EK, Kaufmann SH, Baker SD, et al. Sequences of topotecan and cisplatin: phase I pharmacologic and in vitro studies to examine sequence dependence. *J Clin Oncol* 1996; 14:3074-3084.
13. Laurie NA, Gray JK, Zhang J, et al. Topotecan combination chemotherapy in two new rodent models of retinoblastoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11:7569-7578.
14. Rodriguez-Galindo C, Radomski K, Stewart CF, et al. Clinical use of topoisomerase I inhibitors in anticancer treatment. *Med Pediatr Oncol*. 2000; 35:385-402.
15. Warner DL, Burke TG. Simple and versatile HPLC method for the simultaneous quantitation of the lactone of the lactone and carboxylate forms of camptothecin anticancer drugs. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1997; 691: 161-171.
16. Zamboni WC, Houghton PJ, Hulstein JL, et al. Relationship between tumor extracellular fluid exposure to topotecan and tumor response in human neuroblastoma xenograft and cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1999;43:269-76
17. Abramson D, Frank C, Chantada G, et al. Intraocular carboplatin concentrations following intravenous administration for human intraocular retinoblastoma. *Ophthalmic Genet* 1999; 20:31-36.
18. Macha S, Mitra A. Ocular pharmacokinetics in rabbits using a novel dual probe microdialysis technique. *Exp Eye Res* 2001; 72:289-299.
19. Drusano G, Liu W, mayers M, Perkins R, Madu A, Miller M. The determination of robust ocular pharmacokinetic parameters in serum and vitreous humor of albino rabbits following systemic administration of ciprofloxacin from sparse data sets by using IT2S, a population pharmacokinetic model. *Antimicrob Agents and Chemoter* 1995; 39: 1683-1687.
20. Wilson T, Chan H, Moselhy G, et al. Penetration of chemotherapy into vitreous is increased by chemotherapy and cyclosporin in rabbits. *Arch Ophthalmol* 1996; 114:1390-1395.
21. Mao Y, Wu Z, Lin S, Li W. Measurement and the clinical significance for the intraocular concentrations of carboplatin after systemic and local administration in rabbits *Yan Ke Xue Bao*. 2004; 20:123-6.
22. Hayden B, Jockovich ME, Murray T, et al. Pharmacokinetics of systemic versus focal carboplatin chemotherapy in the rabbit eye: Possible implication in the treatment of retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:3644-3649.
23. Leggas M, Zhuang Y, Welden J, Self Z, Waters C, Stewart C. Microbore HPLC method with online microdialysis for measurement of topotecan lactone and carboxylate in murine CSF. *J Pharm Sci* 2004; 93:2284-2295.