

MICROFUROS MECÂNICOS E A LASER ER:YAG NA PERMEÇÃO TRANSDÉRMICA DE ALA.

P. G. S. Rodrigues*, P. F. C. de Menezes*, M.B. Requena*, P. T. Weis*, T. C. Fortunato *, A. Escobar**, A. B. de Nardi**, C. Kurachi* e V.S. Bagnato*

*Universidade de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos, São Carlos, Brasil

** Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, Brasil

e-mail: phamilla@ymail.com

Resumo: O ácido aminolevulínico (ALA) é um precursor da Protoporfirina IX na síntese do heme e utilizado em forma tópica para tratamento de lesões de pele, incluindo câncer de pele, por terapia fotodinâmica. Quando aplicado topicamente o ALA induz a formação e acúmulo seletivo de PpIX nas lesões, e, sendo a PpIX um agente fotossensível, ao irradiar o tecido com luz, desencadeiam-se uma série de reações que levam à morte do tecido lesionado. Porém, umas das limitações desta terapia, é a dificuldade de penetração do ALA na pele. Diante disso, diversos métodos têm sido estudados na tentativa de melhoria da penetração e, conseqüentemente, na possibilidade de tratamentos de lesões mais profundas de pele. Um destes métodos é o uso de microfuros como canais de permeação do tópico. Neste estudo compara-se a produção de PpIX a partir de um único microfuro com laser Er:YAG com a produção de um único microfuro mecânico utilizando agulhas de acupuntura. O aumento na produção e distribuição da PpIX nos tratamentos com microfuros mostrou que ambas técnicas podem ser utilizadas na melhoria da entrega do tópico utilizado.

Palavras-chave: ALA, microfuros, laser Er:YAG, agulha de acupuntura .

Abstract: *The aminolevulinic acid (ALA) is a precursor of Protoporphyrin IX in heme synthesis and used in topical form for the treatment of skin lesions, including skin cancer by photodynamic therapy. When topically applied the ALA induces the formation and selective accumulation of PpIX in the lesions. Being the PpIX an photosensitive agent, lead to a series of reaction that provoke the death of the injured tissue when irradiated with a specific wavelength of light. However, one of the limitations of this therapy is the difficulty of penetration of ALA in the skin. Therefore, a variety of methods have been studied in an attempt to improve penetration of ALA and thus the possibility of treatments of deeper lesions of skin. One of these methods is the use of microholes as channels of topical permeation. In this study we seek to compare the PpIX production from a single microchannel with Er: YAG laser in relation to the production of a single mechanical microchannel using acupuncture needle. The increase of PpIX production and PpIX distribution in skin treated with microholes showed that both methods can be used to*

allow an improvement in transdermal drug delivery.

Keywords: *ALA, microchannels, Er:YAG laser, needle of acupuncture .*

Introdução

O ácido aminolevulínico (ALA) é uma precursor da Protoporfirina IX (ppIX) na síntese do heme, e utilizado como pró-droga (tópica) em tratamentos de lesões de pele por Terapia Fotodinâmica (TFD). Dentre as lesões comumente tratadas por TFD está Doença de Bowen, Câncer Basocelular, Psoríase, entre outros. Este tratamento é possível, pois certos tipos de células tem a capacidade de acumular PpIX (que é fotoativo), quando administrada exogenamente, assim, ao irradiar o tecido com um comprimento de onda específico, desencadeia na morte do tecido lesionado [1][2].

Porém dentre as limitações desta Terapia, está o fato de que a primeira camada da pele, o estrato córneo, ser uma barreira à penetração de medicamentos tópicos, outra questão é caráter mais hidrofílico do ALA em contrapartida à lipofilicidade do estrato córneo. Sendo assim, a dificuldade em o ALA penetrar as primeiras camadas da pele tem sido uma das limitações desta terapia [1][2]. Diante deste exposto, diversas técnicas tem sido estudadas na tentativa de melhoria de entrega de tópicos, dentre elas estão a síntese de novos derivados de ALA [3][4], associação com técnicas mecânicas de iontoforese, [5][6], ultrassom [7], e microfuros por ablação à laser de femtosegundos [8] de CO₂ fracionado [9], de Er:YAG [10][11] e rolos de microagulhas[12][13].

No estudo de Fang et al. [5] comparando técnicas de microdermoabrasão e Er:YAG, ele mostrou um maior aumento da permeação de ALA para o grupo tratado com laser Er:YAG, aumentando com a fluência utilizada (máximo de 2.6 J/cm²). Similar resultado foi mostrado no estudo de Shen et al. [14] (fluência de até 3.1 J/cm²) em tumores, onde o tecido lesionado e tumoral tratado com com Er:YAG produziu até 4.9 vezes mais PpIX se comparado com o não tratado. Também o estudo de Lee et al. [15] mostrou que um fluxo crescente de até 260 vezes de ALA, em pele de porco, conforme a fluência de Laser utilizada (até 3 J/cm²). Concernente ao uso de agulhas mecânicas na melhoria de tratamentos tópicos por TFD, o estudo de Donnelly et al. [16] utilizando um

arranjo de microagulhas de 0.27mm de comprimento conseguiu aumentar a distribuição de ALA (aplicado por meio de bioadesivo).

Como complemento, neste estudo foi avaliado a produção de PpIX ao redor de um único furo de laser Er:YAG, comparando-a com a produção ao redor de um único furo com agulha de acupuntura. A ideia deste estudo é verificar se a forma de realização do microfuro (a laser, ou manual) diferenciam em produção e distribuição de PpIX.

Materiais e métodos

O estudo foi aprovado pelo “Comitê de ética em Experimentação Animal” da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Brasil.

Animais – Um suíno (*Sus Scrofa Domesticus*) fora utilizado no presente estudo, com massa de 20 Kg. O animal foi pré-anestesiado, e minutos após foram conduzidos para a sala de realização de experimento, onde receberam administração anestésica com Propofol (4mg/Kg) intravenoso. Após intubação orotraqueal, a anestesia foi mantida com Isoflurano diluída em 100% de oxigênio (1L/min). O animal foi anestesiado sobre ventilação controlada, cuja pressão nas vias aéreas e a frequência respiratória foram ajustadas para manter a normocapnia. Após o fim dos procedimentos, a administração dos anestésicos foi interrompida, e o animal extubado. A eutanásia foi realizada quimicamente, por excesso de anestesia. Todo este procedimento foi verificado por médicos veterinários especializados.

Laser Er:YAG – Fora utilizado um laser portátil de 2,94 μ m, disparo único, e curta duração (250 μ s) com possibilidade de 8 níveis de energia (Laser Doc LGM701, Isotech Co.,Ltd, Coréia). Este laser é utilizado para perfuração do dedo, desta maneira, coletando o sangue e aferindo a glicose. Tal laser é conhecido por perfurar cerca de até 0.3mm de profundidade na pele do dedo. Foi usado a energia de 116 mJ. O microfuro foi realizado no dorso do animal, no centro de uma área circular previamente definida de 5 mm de diâmetro, o creme com 20% de ALA foi aplicado nesta área, e após 3 horas de aplicação foram coletados 30 espectros, e realizado a média de intensidade de fluorescência em cada região de microfuro.

Agulha de Acupuntura: Foi ajustada de forma que pudéssemos controlar o comprimento da agulha que perfuraria a pele na realização dos microfuros. O comprimento utilizado foi de 0.8 mm. Da mesma maneira que foram realizados com o laser, os furos com agulhas de acupuntura tiveram a mesma densidade de furos, e depois de realizado os microfuros de 0.8 mm de comprimento no centro de uma área circular de cinco mm de diâmetro foi aplicado o creme, e incubado por 3horas.

Imagens de Fluorescência – Imagens de fluorescência foram realizadas utilizando um dispositivo

comercial (Evince, MMOptics, São Carlos-SP, Brasil) acoplado a uma câmera fotográfica (Sony DSC-H50 9.1MP) com capacidade de zoom óptico de 15x e uma lente macro. A Câmera foi ajustada para um zoom de 3x, e imagens da fluorescência da PpIX foram obtidas no foco da lente após 3 horas da aplicação do creme.

Espectroscopia de Fluorescência – Um espectrômetro (USB2000-FL, Ocean Optics), filtro 540 nm, computador operando um software específico, um Laser Nd: YAG de frequência dobrada com excitação em 532 nm (AIX-532-30, AIXIZ lasers, Houston, TX, USA), e uma fibra óptica em Y (com duas fibras de 400 μ m de diâmetro), compôs o sistema de coleta de espectros de fluorescência. Os espectros de fluorescência foram coletados após 3 horas da aplicação do creme. Os espectros foram introduzidos em uma rotina em Matlab de modo que pudessem ser calculadas as médias e desvios das intensidades emitidas em 635nm, respectivo à banda de emissão da PpIX, em uma região de cada tratamento.

Resultados

A Figura 1, abaixo, mostra uma imagem de fluorescência da PpIX após 3horas da aplicação do creme, em cada grupo. O controle se refere àquele tratamento onde não houve realização de microfuros de permeação anteriormente a aplicação do creme, e a autofluorescência onde não houve aplicação do creme.

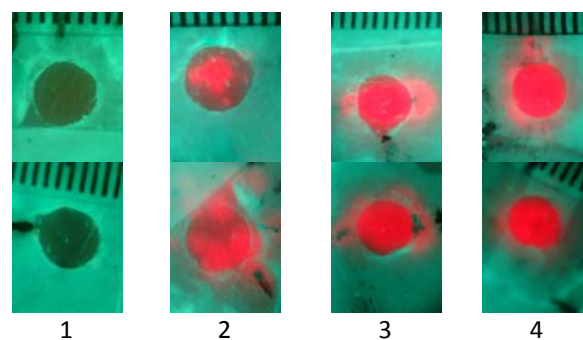


Figura 1- Imagem de Fluorescência da PpIX 3 horas após a aplicação do creme (20% ALA). 1- autofluorescência; 2- controle; 3- agulha de acupuntura de 0.8mm; 4- laser Er:YAG de 116mJ.

A Tabela 1, abaixo, mostra os valores de intensidade de fluorescência para uma região de cada tratamento.

Tabela1-Médias das intensidades dos espectros de fluorescência 3horas após a aplicação do creme (20% ALA).

Tratamentos	Média de intensidade (u.a)
Autofluorescência	23.1 \pm 0.3
Controle	41 \pm 4
Acupuntura (0.8mm)	117 \pm 6
Laser Er:YAG (116mJ)	123 \pm 3

Discussão

O ALA é um composto que apresenta característica de baixa penetrabilidade na pele, e sua penetração transdérmica se dá em maior parte devido à presença de poros e glândulas sebáceas e sudoríparas. Porém estes anexos representam apenas 0.1 à 1 % da área de superfície da pele [17]. Este fato representa uma das principais limitações nos tratamentos de lesões profundas de pele. Diante disso, a busca por meios de melhoria na entrega transdérmica de medicamentos tem sido constante.

Neste estudo tivemos o intuito de comparar dois mecanismos diferentes de realização de microfuros, no papel da melhoria da penetrabilidade do tópico a base de ALA. Esta avaliação é possível mediante espectros e imagens de fluorescência pelo fato de que ALA é uma pró-droga que leva a um acúmulo de PpIX na célula, e esta, por sua vez emite fluorescência sobre determinadas regiões de excitação. Desta maneira, uma maior penetração de fármaco pode refletir em maior produção de PpIX, e conseqüentemente, uma maior intensidade de fluorescência.

Como pudemos ver através da Figura 1, a realização de microfuros permitiu uma maior distribuição de fluorescência vermelha, relativa à produção de PpIX, nos levando à hipótese de que o creme se difundiu a partir do microfuro. A Tabela 1, nos confirmou que a realização de microfuros possibilita uma maior produção de PpIX, visto que as intensidades nestes grupos, chegaram a um valor de 3 vezes mais do que intensidade do grupo controle. Porém, ao contrário da pressuposição de que haveria diferenças entre os dois mecanismos utilizados, não foi perceptível diferenças entre a produção de PpIX ao redor de microfuros por laser Er:YAG e por agulha de acupuntura. Porém, repetições, e estudos mais aprofundados sobre a profundidade de perfuração do laser Er:YAG e da agulha em pele de suínos e as diferenças de diâmetro de perfuração serão necessários para maiores conclusões.

Conclusão

Este estudo mostrou o potencial de microfuros na melhoria da entrega transdérmica de medicamentos, seja estes realizados por laser Er:YAG ou mecanicamente.

Agradecimentos

Agradeço a FAPESP, CAPES, CNPQ e ao programa CEPOF/IFSC-USP.

Referências

[1] Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin: IX: Basic principles and present clinical experience. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1990; 6(1-2): 143-148.

- [2] Torezan L, Niwa ABM, Festa Neto C. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. *Anais Brasileiro de Dermatologia*. [online]. 2009; 84(5): 445-459.
- [3] Brunner H, Hausmann F, Knuechel R. New 5-Aminolevulinic acid esters Efficient Protoporphyrin Precursors for Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*. 2003; 78(5): 481-486.
- [4] Casas A, Fukuda H, Di Venosa G, A Batlle A. Photosensitization and mechanism of cytotoxicity induced by the use of ALA derivatives in photodynamic therapy. *British Journal of Cancer*. 2001; 85(1): 279-284.
- [5] Fang JY, Lee WR, Shen SC, Fang YP, Hu CH. Enhancement of topical 5-aminolaevulinic acid delivery by erbium:YAG laser and microdermabrasion: a comparison with iontophoresis and electroporation. *British Journal of Dermatology*. 2004; 151(1): 132-140.
- [6] Rhodes LE, Tsoukas MM, Rox Anderson R, Kollias N. Iontophoretic delivery of ALA provides a quantitative model for ALA pharmacokinetics and PpIX phototoxicity in human skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 1997; 108(1): 87- 91.
- [7] Liwei MA, Moan J, Peng Q, Iani V. Production of protoporphyrin ix induced by 5-aminolevulinic acid in transplanted human colon adenocarcinoma of nude mice can be increased by ultrasound. *International Journal of Cancer*. 1998; 78(1): 464-469.
- [8] Nicolodelli G, Kurachi C, Rego RF, Omairi T, Bagnato VS. Evidence of 5-aminolevulinic acid (ALA) penetration increase due to microdrilling in soft tissue using femtosecond laser ablation. *Lasers in Medical Science*. 2012; 27(1):1067-1071.
- [9] Letada PR, Shumaker PR, Uebelhoer NS. Demonstration of protoporphyrin IX (PpIX) localized to areas of palmar skin injected with 5-aminolevulinic acid (ALA) and pre-treated with a fractionated CO₂ laser prior to topically applied ALA. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2010; 7(1): 120-122.
- [10] Forster B, Klein A, Szeimies RM, Maisch T. Penetration enhancement of two topical 5-aminolaevulinic acid formulations for photodynamic therapy by erbium:YAG laser ablation of the stratum corneum: continuous versus fractional ablation. *Experimental Dermatology*. 2010; 19(9): 806-812.
- [11] Šmucler R, Vlk M. Combination of Er:YAG laser and photodynamic therapy in the treatment of nodular basal cell carcinoma. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2008; 40(2):153-158.
- [12] Mikolajewska P, Donnelly RF, Garland MJ, Morrow DIJ, Singh TRR, Iani V, Moan J, Juzeniene A. Microneedle Pre-treatment of Human Skin Improves 5-Aminolevulinic Acid (ALA)- and 5-Aminolevulinic Acid Methyl Ester (MAL)-Induced PpIX Production for Topical Photodynamic Therapy Without Increase in Pain or Erythema.

- Pharmaceutical Research. 2010; 27(1): 2213–2220.
- [13] Donnelly RF, Morrow DIJ, Fay F, Scott CJ, Abdelghany S, Singh RRT, Garland MJ, Woolfson AD. Microneedle-mediated intradermal nanoparticle delivery: Potential for enhanced local administration of hydrophobic pre-formed photosensitisers. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2010; 7(4): 222–231.
- [14] Shen SC, Lee WR, Fang YP, Hu CH, Fang JY. In vitro percutaneous absorption and in vivo protoporphyrin IX accumulation in skin and tumors after topical 5-aminolevulinic acid application with enhancement using an erbium:YAG laser. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006; 95(4): 929–938.
- [15] Lee WR, Shen SC, Pai MH, Yang HH, Yuan CY, Fang JY. Fractional laser as a tool to enhance the skin permeation of 5-aminolevulinic acid with minimal skin disruption: A comparison with conventional erbium:YAG laser. *Journal of Controlled Release*. 2010; 145(2):124–133.
- [16] Donnelly RF, Morrow DIJ, McCarron PA, Woolfson AD, Morrissey A, Juzenas P, Juzeniene A, Iani V, McCarthy HO, Moan J. Microneedle-mediated intradermal delivery of 5-aminolevulinic acid: Potential for enhanced topical photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release*. 2008; 129(1): 154–162
- [17] Rafeiro DFB. *Novas estratégias de promoção de permeação transdérmica [Dissertação]*. Lisboa: Universidade Lusófona; 2013.