

ESTUDIO DE PENETRABILIDAD DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO APLICADO TÓPICAMENTE EN VOLUNTARIOS SANOS

✉ Francisco Hernández Bernal,¹ Tania González López,¹ Giselle Pentón Rol² y Pedro López-Saura¹

¹División de Ensayos Clínicos y Preclínicos, ²División de Farmacéuticos, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado postal 6162, La Habana, Cuba.

ABSTRACT

A double-blind, phase-I clinical trial was carried out in healthy volunteers to know the penetrability of topically applied epidermal growth factor (EGF). Twenty-four individuals were randomly distributed in three groups. The treated groups received EGF (10 or 100 µg/g) in 1 % silver sulfadiazine cream. The control group received the latter cream alone. The serum EGF concentration was measured by an ELISA. Negligible penetrability was obtained despite a 10-fold higher concentration, compared to the therapeutic dose, was used. This low penetrability contributes to the safety of the product reducing the possibility of systemic or distant adverse effects.

Key words: clinical trial, epidermal growth factor, EGF, phase I

Biotecnología Aplicada 1997;14:31-32

RESUMEN

Se realizó un ensayo clínico Fase I, controlado y a doble ciegas en voluntarios sanos, para conocer la penetrabilidad del factor de crecimiento epidérmico (EGF) aplicado tópicamente. Veinticuatro sujetos fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos: dos de estudio y el otro de control. En los primeros se empleó el factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (10 o 100 µg/g) en crema hidrófila de sulfadiazina de plata al 1 %, y en el control, crema de sulfadiazina de plata al 1 %. Se midió la concentración de EGF en el suero mediante un ELISA y se obtuvieron umbrales despreciables de penetrabilidad del péptido, aun cuando se emplearon concentraciones del principio activo diez veces superiores a las utilizadas en la formulación administrada a pacientes. La baja penetrabilidad contribuye a la seguridad del producto, con lo cual se reduce la posibilidad de efectos adversos sistémicos o a distancia.

Palabras claves: ensayo clínico, factor de crecimiento epidérmico, EGF, Fase I

Introducción

Como parte de los estudios farmacológicos de un medicamento tópico, es importante estudiar la penetrabilidad del principio activo al suero.

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un agente mitogénico potente para una gran variedad de células y tejidos de origen ectodérmico o mesodérmico (1-3). Esta proteína y su receptor han sido localizados en distintas células que componen la piel. Los queratinocitos, las células del *ductus* de las glándulas sudoríparas, folículo piloso, células mioepiteliales, músculo liso epitelial y las células musculares responsables de la piloerección, exhiben un elevado número de receptores (4).

Existen evidencias de la efectividad del EGF humano recombinante (rh-EGF) como cicatrizante en el tratamiento tópico de lesiones cutáneas (5-7). Se han realizado estudios de cinética y biodistribución en animales de laboratorio (con piel sana y lesionada) en los que se obtuvo poca penetrabilidad del EGF y una vida media en sangre corta. Los niveles del producto detectados en la circulación sanguínea fueron muy bajos en cada tiempo de muestreo. Los

niveles detectados no sobrepasaron el 0,01 % (8, 9) de la dosis administrada.

En los estudios toxicológicos realizados, tanto en administraciones a corto como a largo plazo, se ha demostrado que el EGF tiene un amplio margen de seguridad, si se tiene en cuenta que se utilizaron dosis muy superiores a las terapéuticas recomendadas, por lo cual el riesgo tóxico para los pacientes es mínimo (10).

Un estudio preliminar de penetrabilidad del EGF aplicado en voluntarios sanos por vía tópica fue realizado (11) en el que se incluyeron ocho individuos a quienes se les administró crema de sulfadiazina de plata al 1 % con aditivo de rh-EGF (10 µg/g). Mediante un ELISA se determinó la concentración de EGF a partir del suero obtenido por extracción de sangre a la hora 0, 1, 2, 4, 8 y 24 de aplicado el producto de estudio. No se pudo establecer una relación de la concentración del EGF en suero respecto al tiempo, y los datos fueron similares a las concentraciones fisiológicas reportadas (12). Los autores recomendaron repetir este estudio

1. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Ann Rev Biochem* 1979; 48:193-216.

2. Buckley A, Davidson JM, Kamerath CG, Wolt TB, Woodward SC. Sustained release of epidermal growth factor accelerates wound repair. *Proc Nat Acad Sci USA* 1985;82:7340-7344.

3. Gross I, Dynia D, Rooney S, Smart DA, Warshaw JB, Sissom JF, Hoath SB. Influence of epidermal growth factor on fetal rat lung development *in vitro*. *Pediatr Res* 1986;20:473-476.

4. Martin P, Hopkinson-Woolley J, McCluskey J. Growth factors and cutaneous wound repair. *Program Growth Factor Res* 1992;4:25-44.

5. Brown GL, Cutsinger L, Brightwell JR, Ackerman DM, Tobin GR, Polk MC Jr et al. Enhancement of epidermal regeneration by biosynthetic epidermal growth factor. *J Exp Med* 1986;163:1319-1324.

✉ Autor de correspondencia

utilizando una crema con una mayor concentración de rh-EGF y empleando un adecuado método analítico, elementos considerados en el presente ensayo clínico.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos determinar los niveles sanguíneos de EGF en voluntarios sanos para conocer la posible penetrabilidad del principio activo después de la aplicación tópica de crema de sulfadiacina de plata combinado con rh-EGF en diferentes dosis y utilizando un método analítico de alta sensibilidad.

Materiales y Métodos

Sujetos

La muestra estuvo compuesta por 24 sujetos masculinos, aparentemente sanos, mayores de 20 años de edad y que dieron su consentimiento de participación en el ensayo. Se excluyeron los individuos tratados en los últimos tres meses con EGF por cualquier vía. La asignación de los sujetos a cada grupo se realizó de manera aleatoria.

Productos

En los grupos de estudio se usó rh-EGF, obtenido a partir de una cepa transformada de *Saccharomyces cerevisiae* (13) en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, Ciudad de La Habana) añadido a 10 o 100 µg/g de crema hidrófila con sulfadiacina de plata al 1%. El grupo control recibió crema hidrófila con sulfadiacina de plata al 1% (SDP).

Metodología experimental

El producto se aplicó una vez en la zona de la espalda, que abarca desde la base del cuello y las articulaciones húmero-escapulares hasta la altura de la cintura pelviana, lo que constituyó aproximadamente el 14% de superficie corporal total. Se cubrió toda la piel comprendida en el área anteriormente descrita. El individuo mantuvo descubierto el torso durante dos horas a partir de la aplicación de la crema, momento en que se pudo cubrir la espalda hasta la última extracción de sangre (8 h). La cantidad de crema aplicada a cada persona fue de 10 g, lo que se correspondió con 100 µg o 1 mg total de rh-EGF, según el grupo de estudio asignado.

A cada individuo se le extrajo 3 mL de sangre antes de iniciar el tratamiento, y posteriormente, a la hora 1, 2, 4 y 8 de aplicado el producto de estudio. Se obtuvo el suero mediante incubación de la muestra de sangre durante dos horas a 37 °C y centrifugación a 3 000 rpm durante 15 min. Las alícuotas de cada muestra de suero se conservaron en tubos Eppendorf a -20 °C, debidamente rotuladas.

Se determinó la concentración sanguínea de EGF en suero por ELISA tipo "sandwich" con los anticuerpos monoclonales CB-EGF.1 y CB-EGF.2 conjugado con biotina y la posterior utilización del sis-

tema de amplificación estreptavidina-peroxidasa. El sistema tiene una sensibilidad de 50 a 100 pg/mL (14).

Se empleó como método estadístico el análisis de la varianza (ANOVA).

Resultados y Discusión

Se analizaron los 24 sujetos (ocho sujetos por grupo) que componían la muestra. Se cumplió con la aleatorización y no se excluyó ningún individuo. Todos los sujetos estuvieron comprendidos entre las edades de 20 a 31 años. La distribución según el color de la piel mostró el 63% de individuos blancos y el 37% de negros y mestizos. Los tres grupos de estudio fueron homogéneos en los aspectos antes señalados.

En la Tabla 1 se muestra la media y la desviación estándar de los valores de concentración de EGF detectados en el suero para cada tiempo según el grupo de estudio. Los resultados obtenidos mostraron umbrales despreciables de penetrabilidad del péptido, aún cuando se emplearon concentraciones del principio activo 10 veces superiores a las utilizadas en la formulación administrada a pacientes. Éstos estuvieron en el rango de 0,03 a 3,6 ng/mL en los grupos estudiados, similares a lo reportado en la literatura (0,05 a 3,0 ng/mL) como concentración fisiológica de EGF humano para el suero (12), por tanto nuestros resultados coincidieron con los obtenidos en el estudio previo de penetrabilidad (11).

El EGF detectado corresponde al EGF humano endógeno y no ocurre, u ocurre en pequeñas cantidades, absorción de la proteína a partir de la aplicación tópica del mismo en forma de crema a las concentraciones señaladas.

Estos resultados son importantes, ya que la poca penetrabilidad demostrada sugiere que la molécula es preferencialmente captada por los receptores localizados en las células del epitelio cutáneo así como de los fibroblastos presentes en la dermis, lo que contribuye a la seguridad del producto, reduciendo la posibilidad de efectos adversos sistémicos o a distancia. No obstante, los estudios toxicológicos en animales de experimentación no han revelado eventos adversos con el empleo de este principio activo por vía parenteral.

Tabla 1. Niveles séricos de EGF. Media y desviación estándar para cada tiempo según el grupo de estudio.

| Tiempo (h) | SDP Media (ng/mL) ± DE | rh-EGF (10 µg/g) Media (ng/mL) ± DE | rh-EGF (100 µg/g) Media (ng/mL) ± DE | p |
|------------|------------------------------|---|--|------|
| 0 | 1,096 ± 0,704 | 0,878 ± 0,334 | 0,608 ± 0,273 | n.s. |
| 1 | 0,92 ± 0,447 | 0,663 ± 0,455 | 0,805 ± 0,201 | n.s. |
| 2 | 0,835 ± 0,194 | 0,671 ± 0,392 | 1,147 ± 1,09 | n.s. |
| 4 | 0,792 ± 0,122 | 0,589 ± 0,58 | 0,774 ± 0,401 | n.s. |
| 8 | 0,741 ± 0,231 | 0,749 ± 0,467 | 0,538 ± 0,204 | n.s. |

6. Barroso MC, Fonseca R, Alert J, Alsiná S, Vázquez E, Lombardero J et al. Efecto del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante sobre úlceras cutáneas: reporte preliminar. *Interferón y Biotecnología* 1989;6:57-61.

7. Quiñones M, Mc Cook J, Zacca E, Martínez MA. Efecto del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante sobre las úlceras de miembros inferiores causadas por insuficiencia venosa crónica. *Progreso en Ciencias Médicas (Venezuela)* 1991;5:11-14.

8. Mateo de Acosta C, Justiz E, Lage A. Studies on the epidermal growth factor. V. EGF biodistribution in nude and xenotransplanted mice. *Interferón y Biotecnología* 1989;6:265-272.

9. Morín MA, Pérez LC, Cisneros E, Manso L. Estudio de penetrabilidad del factor de crecimiento epidérmico humano aplicado por vía tópica en ratones. *Biotecnología Aplicada* 1993;10:9-10.

10. Díaz A, Berlanga J, Lázcano R. Evaluación teratogénica del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante en ratas. *Biotecnología Aplicada* 1993;10:14-15.

11. González T, Pérez LC, López-Saura P. Estudio de penetrabilidad del EGF aplicado en voluntarios sanos por vía tópica. Reporte preliminar. *Biotecnología Aplicada* 1993;10:8-9.

12. Hayashi T, Sakamoto S. Radioimmunoassay of human epidermal growth factor levels in human body fluids. *J Pharmacobio-Dyn* 1988;11:146-151.

13. Cinza AM, Quintana M, Lombardero J, Poutou R, Pérez E, Pérez LC et al. A batch process for production of human Epidermal Growth Factor in yeast. Product characterization. *Biotecnología Aplicada* 1991;8:166-174.

14. Mainet D, Caccamo F, Duarte C. A fast and sensitive non competitive streptavidin-biotin enzyme immunoassay for human epidermal growth factor. *Biotecnología Aplicada* 1993;10:176-182.