

Comparación de la aplicación sistémica vs. local de Bleomicina en perros sometidos a electroquimioterapia

Comparison of the systemic vs. local application of Bleomycin in dogs undergoing electrochemotherapy

Edison Gustavo Salazar-Acuña* , Edy Castillo-Hidalgo  y William Moran-Obando 

¹Universidad Católica De Cuenca, Cuenca, Azuay, Ecuador. *Correo electrónico: edison.salazar.60@est.ucacue.edu.ec

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue comparar el efecto de la electroquimioterapia (EQT) más bleomicina local y sistémica, en perros con neoplasias de diferentes orígenes celulares, los cuales fueron atendidos en la Clínica Veterinaria "La Primavera" de la ciudad de Quito, Pichincha, Ecuador, para lo cual se contó con 10 pacientes caninos (*Canis lupus familiaris*). El diagnóstico se realizó mediante histopatología y citología, el cálculo volumétrico del tumor se obtuvo mediante la fórmula para calcular el volumen tumoral $[(a \times b \times c \times (\pi/6))]$. El tratamiento se basó en la administración de bleomicina 15 unidades internacionales por metro cuadrado (IU·m²) de superficie corporal, vía sistémica, e infiltración intratumoral de bleomicina a la dosis de 0,25 IU por centímetro cúbico (IU·cm³) de superficie tumoral, considerando la alta selectividad de la bleomicina por las células epiteliales y las características de vascularización tumoral, de forma posterior se aplicaron pulsos eléctricos con una intensidad de 1.000 voltios por centímetro cuadrado (V·cm²), utilizando diferentes tipos de electrodos. Veintiocho días (d) posteriores a la aplicación de la terapia se logró reducir en un 50 % las masas tumorales, logrando una respuesta objetiva al tratamiento aplicado.

Palabras clave: Electroquimioterapia; bleomicina; local; sistémica; oncología

ABSTRACT

The objective of the present study was to compare the effect of electrochemotherapy (ECT) plus local and systemic bleomycin, in dogs with neoplasms of different cellular origins, which were treated at the "La Primavera" Veterinary Clinic in the City of Quito, Pichincha, Ecuador. There were 10 canine patients (*Canis lupus familiaris*). The diagnosis was made by histopathology and cytology, the volumetric calculation of the tumor was obtained using the formula to calculate the tumor volume $[(a \times b \times c \times (\pi/6))]$. The treatment was based on the administration of bleomycin 15 International Unit per square meter (IU·m²) of body surface, systemic route, and intratumoral infiltration of bleomycin at a dose of 0.25 IU per cubic centimeter (IU·cm³) of tumor surface. Considering the high selectivity of bleomycin for epithelial cells and the characteristics of tumor vascularization, electrical pulses were subsequently applied with an intensity of 1,000 volts per square centimeter (V·cm²), using different types of electrodes. Twenty eight days after the application of the therapy, the tumor masses were reduced by 50%, achieving an objective response to the applied treatment.

Key words: Electrochemotherapy; bleomycin; local; systemic; oncology

INTRODUCCIÓN

La electroquimioterapia (EQT) es un tratamiento utilizado como herramienta terapéutica en Oncología Veterinaria y Humana, técnica que se fundamenta en el uso de quimioterapéuticos a bajas dosis, asociado a la aplicación de campos eléctricos de alta intensidad de forma pulsada [18], la cual es adecuada para el tratamiento de neoplasias cutáneas o incluso subcutáneas [8, 9], que no pueden ser extraídas de forma quirúrgica [1, 13]. Esta metodología se basa en la administración de quimioterapéuticos, ya sea por vía local o sistémica, acompañada de un campo eléctrico en el área tumoral, aumentando de esta forma la permeabilidad del fármaco aplicado en el área tratada [6, 15, 17].

La bleomicina es un fármaco quimioterapéutico antineoplásico y/o citotóxico, se clasifica como antibiótico antitumoral y es producido por un *Streptomyces* y separado en bleomicina a y b, la cual puede ser administrada por vía sistémica, local o intratumoral a dosis de 15 UI·m² de superficie corporal [2, 7]. El diagnóstico citológico se realiza por punción y la confirmación diagnóstica a partir de biopsia del tejido tumoral, mediante un estudio histopatológico, el cálculo volumétrico del tamaño del tumor se realiza mediante el uso de la fórmula para calcular el volumen tumoral que se expresa de la siguiente forma:

$$a \times b \times c \times \left(\frac{\pi}{6}\right)$$

siendo: (a) ancho, (b) largo, (c) alto y $(\pi / 6)$ constante [15].

La administración endovenosa (IV) lenta, de bleomicina a dosis de 15 UI·m², permite una gran distribución del agente a la zona tumoral en la mayoría de los pacientes [16], en tanto que la administración del fármaco a nivel local (intratumoral) se debe realizar a dosis de 0,25 UI·cm³ de volumen tumoral y, en múltiples aplicaciones con el fin de cubrir la totalidad de la masa [8, 15], no obstante sea cual fuera la técnica de administración de bleomicina, a los ocho minutos (min) posteriores a la administración del agente quimioterapéutico, se debe proceder con la aplicación de la electroporción [19], cuyas pulsaciones eléctricas no se deben prolongar un lapso de 45 min, considerando que de forma posterior a este tiempo, es posible que las zonas tratadas no cuenten con la concentración idónea de bleomicina [1, 10].

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó en 10 pacientes caninos (*Canis lupus familiaris*), de diferentes razas y edades, con una muestra compuesta por 4 hembras y 6 machos, cuyo criterio de inclusión fue la presencia de tumores cutáneos con signos de malignidad, en los cuales se realizó el cálculo del volumen tumoral mediante la siguiente fórmula: $[a \times b \times c \times (\pi/6)]$ (TABLA I).

TABLA I
Medidas de los tejidos tumorales, antes del tratamiento

Paciente	Volumen tumoral inicial			Volumen cm ² a×b×c×(π/6)
	a (cm)	b (cm)	c (cm)	
Chavo	1,3	1,2	1,2	1,93
Fina	5,7	5,8	2,9	7,53
Jacinto	4,1	3,8	2,2	5,28
Jagger	5,6	5,0	3,4	7,32
Lili	3,6	2,9	2,7	4,81
Lucas	4,2	3,6	2,4	5,33
Luna	6,6	5,7	3,6	8,32
Pinki	3,5	2,9	1,6	4,18
Quijote	6,8	8,2	3,5	9,68
Zeus	4,8	3,8	3,6	6,38

a: ancho, b: largo, c: alto

Los pacientes seleccionados fueron sometidos a dos tratamientos: T1, bleomicina sistémica a dosis de 15 UI·m² más EQT con un tiempo de espera de 8 min y T2, bleomicina local a dosis de 0,25 UI·cm³ más EQT sin tiempo de espera, las pulsaciones eléctricas en ambos casos se prologaron por un lapso de 45 min.

Con el fin de minimizar los cambios fisiológicos producidos por el estrés, los tratamientos fueron bajo el uso de anestesia general en los dos grupos experimentales (TABLA II).

TABLA II

Número de pacientes sometidos a tratamiento con bleomicina tanto, local vs. sistémica, su volumen tumoral inicial y post tratamiento

Paciente	Edad	Sexo	Raza	Diagnostico	Ubicación Anatómica	Tratamiento
Chavo	11	M	Schnauzer	Melanoma	Escroto	Local
Fina	2	H	Mestizo	Sarcoma de tejido blando	Miembro posterior	Local
Jacinto	8	M	Mestizo	Carcinoma de células escamosas	Abdomen	Local
Jagger	8	M	Pastor inglés	Melanoma	Abdomen	Sistémico
Lili	9	H	Golden Retriever	Mastocitoma	Dorsal a los huesos del tarso	Local
Lucas	7	M	Mestizo	Melanoma	Cavidad oral	Sistémico
Luna	5	H	Golden Retriever	Mastocitoma de alto grado	Miembro posterior derecho	Sistémico
Pinki	13	H	Schnauzer	Sarcoma de tejido blando	Abdomen	Local
Quijote	4	M	Pitbull	Carcinoma de células escamosas	Miembro posterior izquierdo	Sistémico
Zeus	8	M	Mestizo	Melanoma	Cavidad oral	Sistémico

Protocolo anestésico

Para la inducción anestésica se utilizó propofol, vía IV, a dosis 3 miligramos/kilogramo (mg·kg⁻¹), diazepam IV 0,5 mg·kg⁻¹, en tanto que la analgesia se realizó mediante un bolo de fentanilo IV 2 microgramos/kilogramo (ug·kg⁻¹), y el mantenimiento anestésico se realizó con isoflurano (2 %)[11].

1. Protocolo EQT más bleomicina sistémica (T1)

A cada unidad experimental se administró bleomicina sistémica a dosis de 15 UI·m⁻², por vía IV lenta 30 a 45 segundos (seg), de forma posterior un tiempo de esperar de 8 min, para permitir la difusión del fármaco, pasado este periodo se instauró la electroporación que consistió en un ciclo de 8 pulsos de 1.000 V·cm² y 100 microsegundos de duración, a 10 hertz, para lo cual se utilizó un generador de pulsos (electroporador) BTX ECM 830 Harvard Apparatus, (Alemania) y un electrodo de 6 agujas, diseñado en el laboratorio de Sistemas Complejos (LSC), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, de la Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina.

2. Protocolo EQT más bleomicina local (T2)

Para el tratamiento local, se infiltró bleomicina intratumoral a dosis de 0,25 UI·cm³, utilizando una aguja hipodérmica 23 Gauge de 0,6×25 milímetros (mm) y una jeringa de 3 cm³, comenzando desde el centro del tumor y continuando hacia la periferia a 2 mm de distancia cada punción, el criterio de aplicación y volumen a inyectar se basó en múltiples inyecciones, con el fin de proporcionar una cobertura adecuada de la zona tumoral, e inmediatamente aplicamos los pulsos eléctricos ya que la bleomicina está en sitio tumoral y no es necesario esperar como se lo hace en la aplicación sistémica.

Luego de la intervención, todos los pacientes se retiraron al domicilio con la indicación de administración amoxicilina/ácido clavulánico a dosis de 15 mg·kg⁻¹ cada 12 horas (h) y meloxicam 0,1 mg·kg⁻¹ cada 24 h [8, 16].

El diseño experimental fue un diseño de muestra delimitado y los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis en el software estadístico libre Jamovi [14].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos tras la aplicación de los dos tratamientos permitieron obtener una respuesta parcial (RP) a la remisión tumoral, según la clasificación de la Organización Mundial De La Salud (OMS) para Medicina Humana [12], logrando a los 28 d posteriores a la aplicación del tratamiento, una citorreducción equivalente a la mitad del 90 % de los casos (9 pacientes), mientras que en el paciente restante se logró una respuesta completa (RC) de acuerdo a los criterios de la OMS [12], es decir se eliminó la masa tumoral, esto presumiblemente al tratarse de un tumor pequeño (1,3×1,2×1,2 cm), en estadio inicial. Por lo tanto, la combinación de bleomicina más EQT permitió una respuesta adecuada en el tratamiento oncológico en caninos, obteniendo una buena respuesta terapéutica en los dos tratamientos (TABLA III y FIGS. 1-6), datos que coinciden con los reportados por Tellado [15].

De acuerdo a T1 y T2 en relación a la última medición del volumen tumoral se determinó que, no hay diferencias significativas (P= 0,347) entre las dos terapéuticas empleadas.

A decir de Gargiulo y col. [4], la administración IV de bleomicina es una técnica terapéutica segura, eficiente en el tiempo y eficaz

TABLA III
Medidas de los tejidos tumorales, después del tratamiento

Paciente	Volumen tumoral inicial			Volumen cm ²
	a (cm)	b (cm)	c (cm)	
Chavo	0	0	0	0
Fina	2	2,1	0,8	2,56
Jacinto	1,8	2,6	0,8	2,72
Jagger	1,3	0,4	1,0	1,40
Lili	2,6	2,1	0,7	2,82
Lucas	1,4	1,2	0,5	1,60
Luna	3,8	3,5	1,5	4,60
Pinki	1,1	1,2	0,5	1,46
Quijote	3,2	5,0	1,3	4,97
Zeus	1,6	3,2	0,5	2,77

a: ancho, b: largo, c: alto



FIGURA 1. Zeus (Melanoma en cavidad oral)



FIGURA 2. Zeus (post tratamiento sistémico)



FIGURA 3. Luna (Mastocitoma de alto grado en miembro posterior derecho)



FIGURA 4. Luna (post tratamiento local)



FIGURA 5. Lucas (Melanoma en cavidad oral)



FIGURA 6. Lucas (post tratamiento sistémico)

para el tratamiento del carcinoma cutáneo de células escamosas del labio inferior en humanos, el cual permite preservar el aspecto estético, proporcionando una opción de tratamiento en pacientes geriátricos al haber encontrado una respuesta objetiva en el 71,4 % y una respuesta completa en el 28,6 % de los pacientes, siendo estos resultados similares a los obtenidos en el presente ensayo.

Cemazar y Serge [3] en su estudio afirma, que la principal diferencia entre la EQT y otras terapias ablativas locales es que, la EQT combina dos modalidades, la quimioterapia, más la aplicación de pulsos eléctricos. Por lo tanto, las células tumorales están muriendo no directamente debido a la aplicación de energía física, como en el caso de otras terapias ablativas locales [5].

Pese a que la EQT es una herramienta alternativa en el tratamiento de tumores y se destaca por su gran efectividad, mínima acción invasiva y efecto local, convirtiéndose en un método estándar en el tratamiento de tumores cutáneos, subcutáneos y orales en perros (*Canis lupus familiaris*), gatos (*Felis catus*) y caballos (*Equus caballus*) en Oncología Veterinaria, los estudios clínicos no son numerosos [5].

CONCLUSIONES

La EQT con bleomicina por vía sistémica (T1) o local (T2), permiten una RP a los 28 d postratamiento en el 90 % de los pacientes tratados, en tanto que en el 10 % se obtuvo un RC, poniendo en evidencia la eficacia del tratamiento para diferentes neoplasias con características de malignidad, lo cual permite sugerirlo como un método terapéutico efectivo y conservador en pacientes oncológicos.

El éxito de la técnica, está basado en elección idónea del paciente candidato a EQT; debiendo considerarse entre otros aspectos los siguientes: características del tumor, ubicación, estadio,

enfermedades concomitantes, permitiendo obtener un enfoque selectivo del paciente.

En la presente investigación no se observa diferencia en la respuesta de la EQT, con relación a la estirpe tumoral, dado que en todos los casos se obtuvo una buena respuesta.

En la administración de EQT local, los mastocitomas presentaron, un mayor grado de inflamación frente a neoplasias epiteliales o mesenquimales.

La EQT es una herramienta oncológica susceptible de ser aplicada en todas las estructuras anatómicas del cuerpo del paciente, contribuyendo a lograr la citorreducción de la masa tumoral y evitando de esta forma la intervención quirúrgica.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Católica de Cuenca.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses en este artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CAMPANA, L.; CLOVER, A.; VALPIONE, S.; QUAGLINO, P.; GEHL, P.; KUNT, C.; SNOJ, M.; ROSSI, C.; MIKLAVCIC, D.; SERSA, G. Recommendations for improving the quality of reporting clinical electrochemotherapy studies based on qualitative systematic review. **Radiol. Oncol.** 50: 1-13. 2016.
- [2] CEMAZAR, M.; TAMZALI, Y.; SERSA, G.; TOZON, N.; MIR, L.; MIKLAVCIC, D.; LOWE, R.; TEISSIE, T. Electrochemotherapy in Veterinary Oncology. **J. Vet. Intern. Med.** 22: 826-831. 2008.
- [3] CEMAZAR, M.; SERSA, G. Recent Advances in Electrochemotherapy. **Rev. Liebert. Pub.** 1: 204-213. 2019.
- [4] GARGIULO, M.; SERRA, J.; CORTESE, A.; MURPHY, D.; PARASCANDOLO, S.; RAZZANO, S. Long term effectiveness of electrochemotherapy for the treatment of lower lip squamous cell carcinoma. **Rev. J. Cranio Maxillo Facial Surg.** 46: 1968-1974. 2018.
- [5] LIZCANO, M. Revisión sistemática de literatura sobre la eficacia de la electroquimioterapia en tumores caninos de distinto origen histológico. 2019. Universidad Cooperativa de Colombia (UCC). Colombia. En línea: <https://bit.ly/3wGMw2f>. 12/01/2022.
- [6] LOWE, R.; GAVAZZA, A.; IMPELLIZERI, A.; SODEN, D.; LUBA, G. The Treatment of Canine Mast Cell Tumours with electrochemotherapy with or without surgical excision. **Rev. Vet. Comp. Oncol.** 15: 775-784. 2016.
- [7] MALI, B.; MIKLAVCIC, D.; CAMPANA, L.G.; CEMAZAR, M.; SERSA, G. Tumor size and effectiveness of electrochemotherapy. **Rev. Pub. Med.** 47: 32-41. 2013.
- [8] MAGLIETTI, F.; TELLADO, M.; OLAIZ, O.; MICHINSKI, S.; MARSHALL, G. Combined local and systemic bleomycin administration in electrochemotherapy to reduce the number of treatment sessions. **Rev. Radiol. Oncol.** 50: 58-63. 2016.
- [9] MATTHIESSEN, L.; JOHANNESSEN, H.; WESTERGREN, H.; MOSS, T.; KAMBY, C.; GEHL, J. Electrochemotherapy for large cutaneous recurrence of breast cancer: A phase II clinical trial. **Rev. Acta Oncol.** 51(6): 713-721. 2012.
- [10] MIKLAVCIC, D.; MALI, B.; KOS, B.; HELLER, R.; SERSA, G. Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. University Of Ljubljana. **Rev. Biomed.** 13: 29. 2014.
- [11] MIR, L.M. Bases and rationale of the electrochemotherapy. **Rev. Sci. Direct.** 4(11): 38-44. 2006.
- [12] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Manual para la notificación de los resultados del tratamiento de cáncer. 1980. Ginebra, Suiza. En línea: <https://bit.ly/3Ku1UEQ>. 15/01/2022.
- [13] ROSSELLÓ, A. El carcinoma de células escamosas felino: la electroquimioterapia y otros tratamientos. 2017. Universidad de Zaragoza. Rev. Zaguán. España. En línea: <https://bit.ly/3csYhTl>. 15/01/2022.
- [14] SANTABÁRBARA-SERRANO, J.; LASHERAS, I. Docencia de Bioestadística en Medicina con software gratuito Jamovi: una ventana de oportunidad. **Rev. Española Educ. Méd.** 1(1): 9-10. 2020.
- [15] TELLADO, M.; MAGLIETTI, F.; OLAIZ, N.; MICHINSKI, S.; MARSHALL, G. Nueva modalidad de Electroquimioterapia: administración local y sistémica para el tratamiento de tumores no respondedores en caninos y felinos. 2015. Vetoncología. Argentina. En línea: <https://bit.ly/3AuDoPz>. 15/01/2022.
- [16] TOUNEKTI, O.; PRON, G.; BELEHRADEK, J. Bleomycin, an Apoptosis-mimetic Drug That Induces Two Types of Cell Death Depending on the Number of Molecules Internalized. **Rev. Cancer Res.** 53: 5462-5469. 1993.
- [17] TOZON, N.; LAMPREHT-TRATAR, U.; ZNIDAR, K.; SERSA, G.; TEISSIE, J.; CEMAZAR, M. Operating Procedures of the Electrochemotherapy for Treatment of Tumor in Dogs and Cats. **J. Vis. Exp.** 24(116): 54760. 2016.
- [18] VEGA-DÍEZ, D.; RODRIGUEZ-VILLA, L.; TRASOBARES-MARUGAN, L. Foro de Residentes: Electroquimioterapia para el tratamiento de tumores cutáneos primarios y secundarios. **Actas Dermo-Sifiliográf.** 10: 1016. 2021.
- [19] ZAKELJ, M.; PREVC, A.; KRANJC, S.; CEMAZAR, M.; TODOROVIC, V.; SAVARIN, M.; SCANCAR, J.; KOSJEK, T.; GROSELJ, B.; STROJAN, P.; SERSA, G. Electrochemotherapy of radioresistant head and neck squamous cell carcinoma cells and Tumor Xenografts. **Rev. Pub. Med. Central.** 4(3): 1658-1668. 2018.