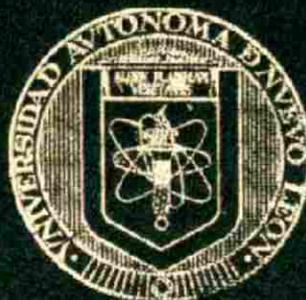


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



ESTUDIOS DE TOXICIDAD DERMICA DE LA T-514
(PEROXISOMICINA A.) AISLADA DEL GENERO
KARWINSKIA EN CONEJOS NUEVA ZELANDA

POR

VICTOR ARMANDO TAMEZ RODRIGUEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR
EN CIENCIAS con Especialidad en Farmacología
y Toxicología

'Abril' del 2001



ANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

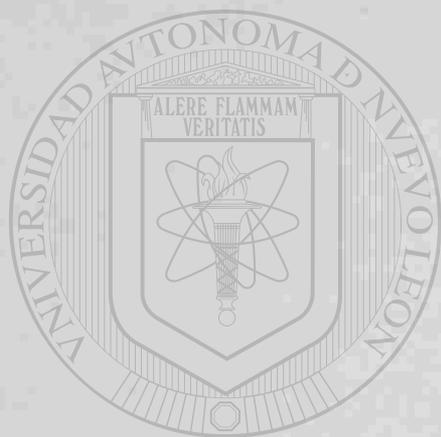


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD
QP981
.K37
T36
2001
c.1



1080092881



UANL

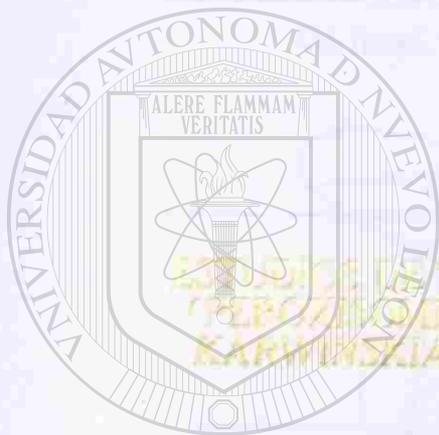
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



EFECTOS DE LA TOXICIDAD DÉRMICA DE LA Y-514
(EPOCENOLÉCTICA A) AISLADA DEL GÉNERO
KARWININSIA EN CONEJOS NUEVA ZELANDA

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

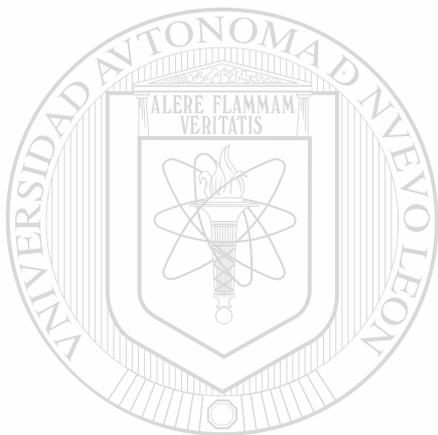
POR
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
VICTOR ARMANDO TAMEZ RODRIGUEZ

®

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR
EN CIENCIAS con Especialidad en Farmacología
y Toxicología

Abril del 2001

TD
9/29
37
T36
2001



UANL



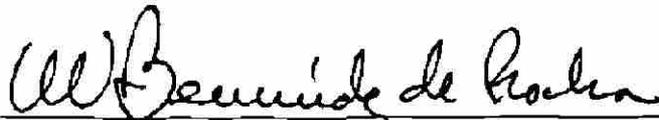
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**ESTUDIOS DE TOXICIDAD DÉRMICA DE LA T-514
(PEROXISOMICINA A₁) AISLADA DEL GÉNERO
KARWINSKIA EN CONEJOS NUEVA ZELANDA**

Aprobación de la tesis:



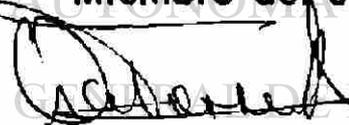
**Dr. med. María Victoria Bermúdez de Rocha
Director de la tesis**



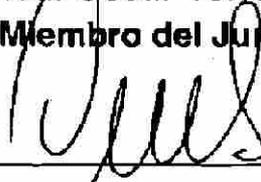
**Dr. med. Alfredo Piñeyro López
Codirector de la tesis**



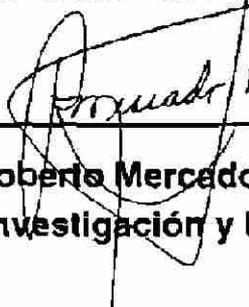
**Ph.D. Julio Sepúlveda Saavedra
Miembro del Jurado**



**Dr. med. Oscar Torres Alanís
Miembro del Jurado**



**Dr. med. Oscar de la Garza Castro
Miembro del Jurado**



**Dr. Roberto Mercado Longoria
Subdirector de Investigación y Estudios de Posgrado**

**ESTUDIOS DE TOXICIDAD DÉRMICA DE LA T-514
(PEROXISOMICINA A₁) AISLADA DEL GÉNERO
KARWINSKIA EN CONEJOS NUEVA ZELANDA**

Presentado por

Q.C.B. Víctor Armando Tamez Rodríguez

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. bajo la asesoría de la Dr. med. María Victoria Bermúdez de Rocha y la coasesoría del

Dr. med. Alfredo Piñeyro López.

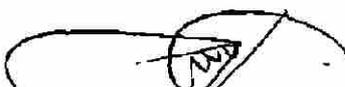
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Dr. med. María Victoria Bermúdez de Rocha

Director de la tesis



Dr. med. Alfredo Piñeyro López

Codirector de la tesis

Víctor Armando Tamez Rodríguez

Fecha de graduación: Abril, 2001

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio:

ESTUDIOS DE TOXICIDAD
DÉRMICA DE LA T-514
(PEROXISOMICINA A₁) AISLADA
DEL GÉNERO *KARWINSKIA* EN
CONEJOS NUEVA ZELANDA.

Número de páginas: 101

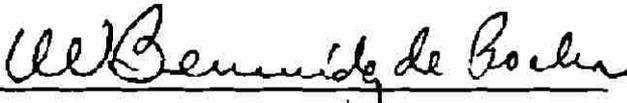
Candidato para la obtención del
Grado de Doctor en Ciencias con
Especialidad en Farmacología y
Toxicología.

Área de Estudio: Farmacología
y Toxicología

Propósito y Método de Estudio: La T-514 (Peroxisomicina A₁) es una antracenona dimérica que se extrae de plantas del género *Karwinskia*. Se ha comprobado que esta sustancia posee una alta toxicidad selectiva entre las poblaciones celulares de origen benigno y maligno. Estos resultados han motivado a la realización de diversos estudios con el fin de establecer su posible uso como agente antineoplásico. A través de este trabajo se pretende evaluar el potencial de irritación de la Peroxisomicina A₁ por vía dérmica así como determinar los efectos tóxicos sistémicos en los órganos blanco tales como hígado, pulmón y riñón. Así mismo, se presentan los procedimientos para la evaluación de la toxicidad dérmica y los resultados de la evaluación histopatológica.

Contribuciones y Conclusiones: Con base en los resultados obtenidos se concluyó que la Peroxisomicina A₁ administrada vía tópica, no produce efectos de fototoxicidad ni fotopigmentación, así como tampoco causa daño sistémico en los órganos blanco. De acuerdo al Índice de Irritación Primaria obtenido se considera a la Peroxisomicina A₁ como una sustancia no irritante o de irritación ligera. La Peroxisomicina A₁ administrada vía intradérmica produce ligera sensibilización.

FIRMA DEL ASESOR


Dr. med. María Victoria Bermúdez de Rocha

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida, la salud y las bendiciones recibidas para concluir hoy esta etapa.

A mis Padres que me dieron la oportunidad de vivir, crecer y la formación y educación necesaria para luchar en la vida.

A mi esposa (Rosy) e hijos (Cynthia y César) con todo mi cariño, por su estímulo, paciencia y comprensión.

a la Dr. med. María Victoria Bermúdez de Rocha con todo respeto, admiración y cariño, por su amistad y apoyo incondicional.

Al Dr. med. Alfredo Piñeyro López porque gracias a sus enseñanzas, su apoyo y su acertada crítica este trabajo llegó a su fin.

Al Dr. Jesús Ancer Rodríguez por sus valiosas sugerencias, disposición de ayuda e interés en la revisión del presente trabajo.

Al Dr. Juan Pablo Flores Gutiérrez por su colaboración y asesoría en los estudios anatomopatológicos.

A la Q.C.B. Martha Elizabeth Salazar Leal por su valiosa amistad, apoyo y consejo.

Al Ph.D. José Pisanty Ovadia con admiración y respeto, por escucharme, aguantarme y brindarme siempre sus enseñanzas.

Al M.V.Z. Gilberto Arévalo Martínez por haber compartido conmigo los buenos y los malos momentos. Gracias por tu amistad.

A mis compañeros del Doctorado por ser unos excelentes compañeros de camino y por los momentos que hemos pasado juntos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento proporcionado.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



Al comité evaluador de la tesis por sus observaciones, comentarios y consejos en el desarrollo del presente estudio.

A mis amigos quienes me animaron y acompañaron constantemente a seguir adelante y concluir hoy este trabajo.

A todos "Mil Gracias"

Gracias a todos



DOSIS SOLA FACIT VENENUM

¿Qué hay que no sea veneno?

Todo es veneno y nada existe sin veneno.

Solamente la dosis determina que algo no sea un veneno.

Philippus Theophrastus Aureolus Bombastus Von Hohenheim

“Paracelso”

(1492 - 1541)



IBLIOTECAS

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1 INTRODUCCIÓN	1
2 MATERIAL Y MÉTODOS	22
2.1 Material	22
2.1.1 Material biológico	22
2.1.2 Material y equipo general.	22
2.2 Métodos	26
2.2.1 Pruebas de toxicidad dérmica	26
2.2.1.1 Determinación de la Peroxisomicina A ₁ en sangre	28
2.2.1.2 Evaluación de la toxicidad tópica	28
2.2.1.3 Evaluación de la toxicidad subcutánea	34
2.2.1.4 Evaluación de la sensibilización	36
2.2.1.5 Evaluación de la fototoxicidad	39
2.2.1.6 Evaluación de la fotopigmentación.	42

Capítulo	Página
-----------------	---------------

2.2.2 Estudio histológico	42
-------------------------------------	----

2.2.3 Análisis estadístico	44
--------------------------------------	----

3 RESULTADOS	45
-------------------------------	-----------

3.1 Determinación de la Peroxisomicina A ₁ en sangre.	45
--	----

3.2 Toxicidad tópica	45
--------------------------------	----

3.3 Toxicidad subcutánea	51
------------------------------------	----

3.4 Sensibilización	58
-------------------------------	----

3.5 Fototoxicidad	63
-----------------------------	----

3.6 Fotopigmentación	69
--------------------------------	----

3.7 Análisis estadístico	73
------------------------------------	----

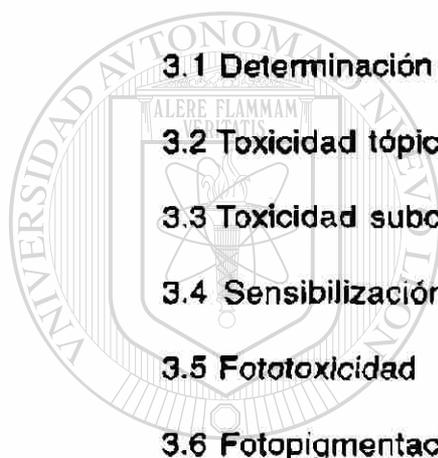
4 DISCUSIÓN	74
------------------------------	-----------

4.1 Toxicidad tópica	76
--------------------------------	----

4.2 Toxicidad subcutánea	79
------------------------------------	----

4.3 Sensibilización	80
-------------------------------	----

4.4 Fototoxicidad y Fotopigmentación	81
--	----



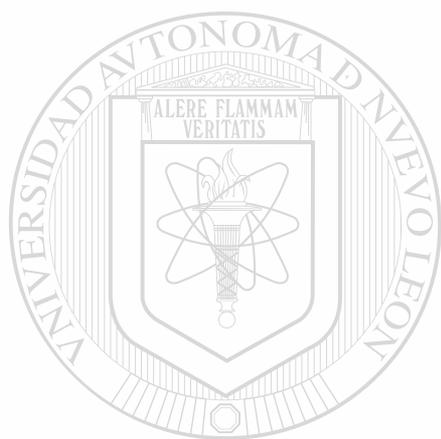
UANE

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Capítulo	Página
5 CONCLUSIONES	85
REFERENCIAS	87



UANL

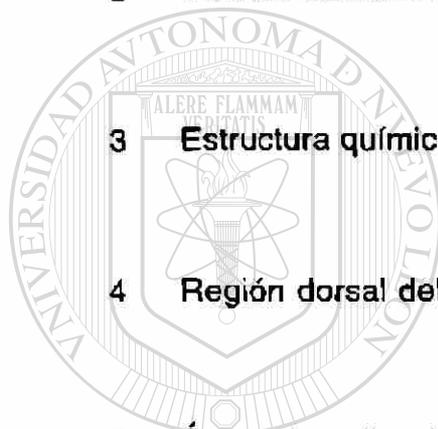
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Arbusto de la <i>Karwinskia humboldtiana</i>	13
2 Toxinas aisladas del fruto de la <i>Karwinskia humboldtiana</i> .	15
3 Estructura química de la T-514 (Peroxisomicina A ₁).	16
4 Región dorsal del conejo rasurada..	27
5 Áreas de aplicación de la Peroxisomicina A ₁	30
6 Secuencia de la aplicación en la región dorsal del conejo. Cuatro preparaciones 1%, 3%, 9% y C son asignadas a las cuatro áreas (1), (2), (3) y (4). Áreas (2) y (3) son de piel intacta. Áreas (1) y (4) tienen abrasiones epidérmicas.	31
7 Jaulas especiales para la restricción de los conejos.	32
8 Fotografía de la piel del conejo expuesta a la administración vía ID de 0.1 mL de la Peroxisomicina A ₁ al 1/1000.	37



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

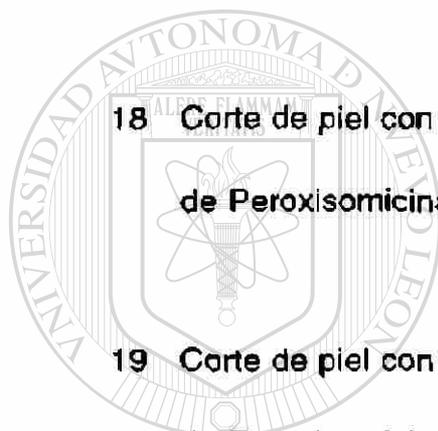


Figura**Página**

- 9 Fotografía a mayor aumento de la piel de conejo
expuesta a la administración vía ID de 0.1 mL
del vehículo. 38
- 10 Fotografía de la piel de conejo con administración vía
tópica de las diferentes soluciones de la Peroxisomicina A₁. 40
- 11 Exposición a la luz UV de las áreas de aplicación. 41
- 12 Corte de piel control con administración vía tópica
del vehículo. H y E 20 X. 47
-
- 13 Corte de piel con aplicación al 3% de Peroxisomicina A₁
vía tópica. H y E 20 X. 48
- 14 Corte de piel con aplicación de Peroxisomicina A₁ al 9%
vía tópica. H y E 20 X. 49
- 15 Corte de piel con aplicación de Peroxisomicina A₁ al 9%
vía tópica. PAS 40 X. 50

Figura**Página**

16	Corte de piel control con administración subcutánea del vehículo. H y E 20 X.	53
17	Corte de piel con administración subcutánea de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Peroxisomicina A_1 . H y E 20 X.	54
18	Corte de piel con administración subcutánea de 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Peroxisomicina A_1 . H y E 20 X.	55
19	Corte de piel con administración subcutánea de 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Peroxisomicina A_1 . H y E 40 X.	56
20	Fotografía de la piel de conejo con administración ID del vehículo 24 horas después.	59
21	Fotografía de la piel de conejo con administración ID de Peroxisomicina A_1 24 horas después.	60
22	Corte de piel control con administración ID del vehículo. H y E 20 X.	61



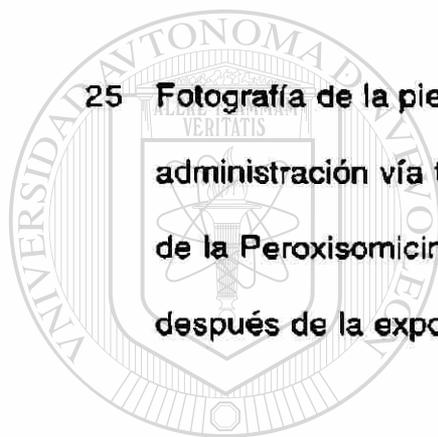
U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Figura	Página
23 Corte de piel control con administración ID de Peroxisomicina A ₁ al 1/1000. H y E 40 X.	62
24 Corte de piel con administración ID de Peroxisomicina A ₁ al 1/1000. H y E 20 X.	63
25 Fotografía de la piel de conejo expuesto a la administración vía tópica de las diferentes soluciones de la Peroxisomicina A ₁ , vehículo y 8-MOP 24 horas después de la exposición a la luz UV.	65
26 Fotografía de la piel de conejo expuesto a la administración vía tópica de la Peroxisomicina A ₁ al 9%, vehículo y 8-MOP 24 horas después de la exposición a la luz UV.	66
27 Corte de piel control sin exposición a luz UV y con administración vía tópica del vehículo. H y E 20 X.	67
28 Corte de piel con aplicación vía tópica de Peroxisomicina A ₁ al 1%. H y E 20 X.	68



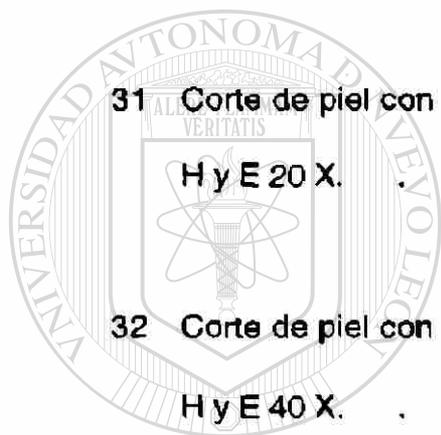
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN CENTRAL DE BIBLIOTECAS



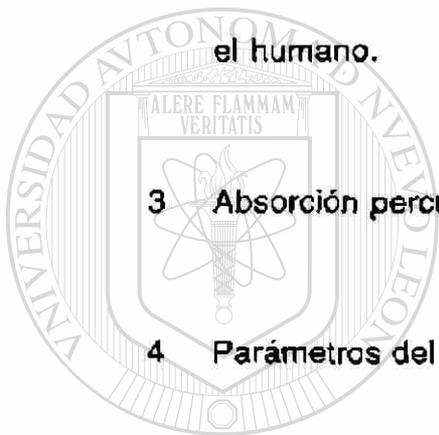
Figura	Página
29 Corte de piel con aplicación vía tópica de 8-MOP al 1%. H y E 20 X.	69
30 Corte de piel control con administración vía tópica de la Peroxisomicina A ₁ al 9%. H y E 20 X.	71
31 Corte de piel con aplicación vía tópica de 8-MOP al 1%. H y E 20 X.	72
32 Corte de piel con aplicación vía tópica de 8-MOP al 1%. H y E 40 X.	73



UANL

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Absorción percutánea <i>in vivo</i> en la rata y el humano.	10
2	Absorción percutánea <i>in vivo</i> en el mono Rhesus y el humano.	10
3	Absorción percutánea <i>in vivo</i> en el conejo y el humano.	11
4	Parámetros del control de calidad de la Peroxisomicina A ₁	26
<hr/>		
5	Evaluación de las reacciones de la piel.	33
6	Evaluación de la fotopigmentación.	42
7	Evaluación histopatológica de los sitios tratados con la Peroxisomicina A ₁ vía tópica.	51
8	Evaluación histopatológica de los sitios tratados con la Peroxisomicina A ₁ vía subcutánea.	57



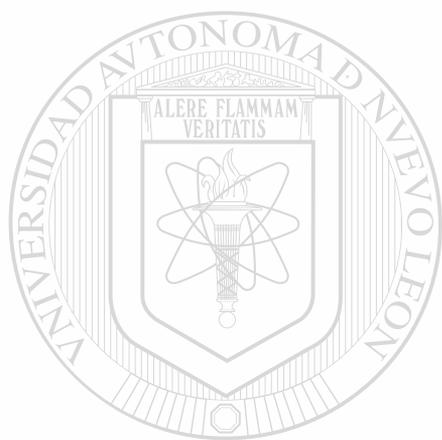
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



9	Comparación del índice de irritación primaria (IIP) de varias sustancias antineoplásicas y la Peroxisomicina A₁.	78
----------	--	-----------



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

NOMENCLATURA

°C	Grados centígrados
CCF	Cromatografía en capa fina
CCF-FN	Cromatografía en capa fina fase normal
CCF-FR	Cromatografía en capa fina fase reversa
CLAR-FR	Cromatografía de líquidos de alta resolución fase

reversa

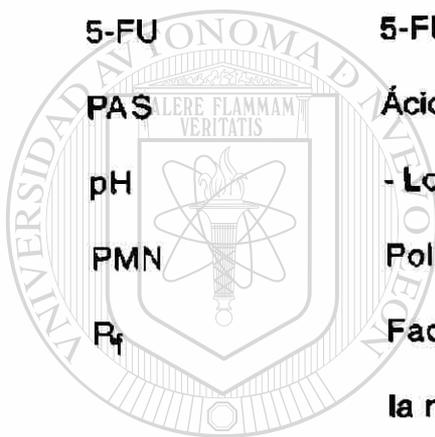
cm	Centímetro
cols	Colaboradores
Conc.	Concentración
CT ₅₀	Concentración citotóxica 50%
DDT	Diclorodifeniltricloroetano

DL ₅₀	Dosis letal media
H y E	Hematoxilina y eosina

ID	Intradérmica
IV	Intravenosa
IIP	Índice de irritación primaria

J	Joules
kg	Kilogramo
µm	Micras
µg	Microgramos
µL	Microlitros

m	Metro
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
nm	Nanómetros
8-MOP	8-Metoxipsoraleno
5-MOP	5-Metoxipsoraleno
5-FU	5-Fluorouracilo
PAS	Ácido peryódico de Schiff
pH	- Log [H]
PMN	Polimorfonucleares
R _f	Factor de retardo (razón de la distancia que recorre la muestra con respecto al eluyente).
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
T	Toxina
t _R	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano de expresión más extenso del cuerpo que envuelve y aísla a los otros órganos del medio ambiente. No sólo es una cubierta de protección externa, sino que también realiza múltiples funciones, algunas de ellas muy complejas, como son la protección, termorregulación, capacidad de respuesta inmunitaria, síntesis bioquímica y excreción de agua y grasas, entre otras. Además, es el órgano sensorial que recibe los estímulos táctiles, térmicos y dolorosos. Así pues, la piel es la frontera entre dos medios,

el interno y el externo, y puede ser considerada como un espejo de la salud, y más aún, de las emociones, ya que puede reflejar el grado de bienestar o malestar del individuo: "La piel habla, hay que saber escucharla" (1).

Por otro lado, son muchos los padecimientos internos que pueden manifestarse a través de la piel: enfermedades del sistema nervioso, del aparato digestivo y respiratorio, endocrinas y metabólicas. Es importante señalar que muchos de los efectos indeseables de los medicamentos se expresan en la piel antes que en otros órganos.

El grosor de la piel varía considerablemente según las regiones del cuerpo. También son variables las proporciones entre la epidermis y la dermis. Sin embargo, la permeabilidad casi siempre guarda proporción inversa al grosor del estrato córneo. En algunas áreas las diferencias de concentración de lípidos afectan la absorción por vía cutánea dependiendo de las propiedades lipofílicas o hidrofóbicas de un medicamento individual. Así pues, la penetración de medicamentos es mayor en la cara, en áreas intertriginosas y especialmente en el perineo. Por consecuencia, la aplicación de medicamentos en estas áreas tiene mayor probabilidad de producir problemas de sensibilización, irritación y atrofia por medicamentos (2, 3).

Antiguamente se creía que la piel era impermeable, pero posteriormente se demostró que es un órgano muy selectivo que permite la absorción y excreción de muchas sustancias, lo que ha sido aprovechado por la industria farmacéutica para elaborar productos dermatológicos y cosméticos (4).

Muchas variables afectan la absorción cutánea y subsecuentemente la toxicidad dérmica. La absorción de medicamentos a través de la piel está en función de la naturaleza del medicamento, el vehículo y el estado de la misma (5). Las tres principales variables que explican las diferencias de la velocidad de absorción o el flujo de diferentes medicamentos por vía tópica o del mismo medicamento en diferentes vehículos son: la concentración del

compuesto en el vehículo, el coeficiente de partición del medicamento entre el estrato córneo y el vehículo, y el coeficiente de difusión del medicamento en el estrato córneo ⁽⁶⁾. La velocidad de difusión es proporcional a la concentración del medicamento en el vehículo. La relación únicamente es lineal a concentraciones farmacológicas bajas y sólo se aplica al medicamento soluble en el vehículo. El coeficiente de partición es una medida de la capacidad del medicamento entre dos medios no miscibles. En el caso que nos ocupa es la solubilidad de equilibrio del medicamento en la superficie del estrato córneo respecto de su solubilidad en el vehículo. El coeficiente de difusión indica la magnitud en la que la matriz de la barrera restringe la movilidad del medicamento. La interrelación de la dosis-respuesta en la absorción dérmica está definida en términos de la concentración, área de superficie, frecuencia de aplicación y tiempo de exposición.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Quando se analizan nuevas sustancias, se utilizan pruebas de experimentación en animales para conocer los efectos primarios y posteriormente realizar la evaluación final en humanos. En el hombre es posible valorar en forma eficaz el grado de daño de una sustancia en la piel, pero tales estudios podrían ser caros o representar algún daño. Además, debido a que la piel tiene una amplia variedad de glándulas y anexos cutáneos, así como a la variabilidad de estos componentes en diferentes

partes del cuerpo y de especie a especie, los estudios *in vivo* son de gran importancia y determinantes para evaluar la toxicidad en piel.

A través de los años, se ha observado la imposibilidad de obtener una medida absoluta de irritabilidad que sea práctica para todas las razas, edades, regiones del cuerpo, climas y temporadas. La literatura reporta que la piel del niño y la mujer es más sensible que la del hombre ⁽⁷⁾ y se cree que la piel de la raza negra es más resistente a los irritantes químicos que los de la raza blanca, además de que la piel es menos reactiva en el verano que en el invierno ⁽⁸⁾.

El porcentaje de prevalencia de reacciones tóxicas en la piel no está bien establecido. No obstante, en los últimos 25 años hay una considerable cantidad de trabajos enfocados hacia este problema ^(9, 10, 11). Desafortunadamente, algunos estudios no son dirigidos al problema completo y en muchos casos fracasan en la definición de la naturaleza y la extensión de lo que están investigando ⁽¹²⁾. De esta manera, algunos de estos estudios se ocupan sólo de las reacciones fototóxicas, cambios indeseables de color, pigmentación e irritación primaria.

Actualmente, se emplea una gran cantidad de nuevos compuestos para aplicación tópica que contienen agentes activos capaces de producir daño a la piel. Todo medicamento, por insignificantes que parezcan sus acciones terapéuticas, posee la capacidad de provocar efectos nocivos. Las reacciones adversas son uno de los costos del tratamiento médico actual. Por esta razón, el beneficio calculado de cualquier decisión terapéutica debe ser ponderado contra sus posibles riesgos. Es muy importante el cuestionamiento del uso de nuevas sustancias que tengan propiedades de sensibilización o de fototoxicidad, especialmente cuando van a ser utilizadas en el hombre. Por ello, la identificación de sustancias tóxicas es esencial para permitir el uso de agentes más seguros y más efectivos en la quimioterapia.

Los estudios en animales son utilizados para medir una variedad de respuestas localizadas en forma tópica como lo son la **Irritación Aguda Primaria**, que se define como la respuesta inflamatoria local reversible de la piel causada por la aplicación de una sustancia química. Esta reacción no incluye una respuesta inmunológica. Un grado mayor de irritación es la **Respuesta de Corrosión**, que se define como una acción química directa sobre la piel que resulta de la alteración en el sitio de contacto. Sus manifestaciones son la ulceración, necrosis y la formación de escaras en los tejidos. Otro tipo de respuesta es la causada por la **Fototoxicidad**,

que se define como la respuesta tóxica obtenida después de la primera exposición de la piel a ciertos químicos y una exposición subsecuente a la luz solar o fuentes de radiación ultravioleta, o que es inducida de manera similar por una irritación en la piel después de una administración sistémica de una sustancia química (13). La fototoxicidad es un problema de importancia médica, ya que muchos medicamentos han mostrado su potencial efecto fototóxico (14).

En el humano, las reacciones fototóxicas se encuentran entre los potenciales efectos adversos de muchas clases de compuestos químicos, naturales y sintéticos. Las pruebas de fototoxicidad para sustancias aromáticas se incluyen en las pruebas de seguridad establecidas por Institutos de Investigación y se han desarrollado diversos métodos para la identificación de estos efectos (15). El modelo animal utilizado para este tipo de pruebas ha sido propuesto por Maibach y Marzulli (16), ellos sugieren que el conejo es el animal más sensible y puede servir como una especie de referencia .

Otro tipo de respuestas es la **Sensibilización Dérmica**, que se define como una respuesta alérgica retardada, mediada por reacciones inmunológicas para una sustancia aplicada a la piel en la cual las manifestaciones clínicas pueden ser similares a aquellas observadas en la

irritación dérmica (17). La prueba de Draize (18) está basada en la técnica clásica de Landsteiner (19). Dicha prueba es fácil de desarrollar, económica y útil como método de rastreo para detectar sustancias que producen sensibilización. Los compuestos que producen una alta incidencia de sensibilización en el humano son actualmente identificables por las técnicas clásicas, como el método de Draize (18) y otras más recientemente desarrolladas (20).

La susceptibilidad a los irritantes varía entre los individuos independientemente de los factores genéticos (21). Estas diferencias individuales son más grandes de lo supuesto y no han sido adecuadamente valoradas (22). Los irritantes fuertes son fácilmente reconocibles, el punto es que todas las sustancias son dañinas bajo ciertas circunstancias. Inclusive el agua, la más inocua de las sustancias, puede generar una inflamación por la retención del sudor, al promover indirectamente el crecimiento bacteriano o incrementar la permeabilidad de la capa externa de la piel. Es importante señalar que todas las sustancias son irritantes potenciales. La pregunta sustancial es "qué tan irritantes son". Esta cuestión incrementa el problema de grados de medición en la irritación y la necesidad de crear métodos de cuantificación. Por esta razón, se han desarrollado estudios estandarizados que se utilizan para definir y establecer el grado de riesgo (23). Los estudios de

toxicidad dérmica se llevan a cabo para evaluar si la aplicación tópica de una sustancia produce efectos desfavorables, tanto locales como sistémicos. El método *in vivo* más empleado para predecir el efecto irritante en la piel del humano fue publicado por Draize (16). Se trata de un método semicuantitativo que asigna medidas numéricas para evaluar la intensidad del edema y el eritema. Sin embargo, ha sido modificado por varios investigadores con el objeto de aumentar su sensibilidad y capacidad predictiva (24, 25). Además, estudios recientes demuestran que el método de Draize puede distinguir las sustancias irritantes de las no irritantes. No obstante, otros autores (26) han encontrado que las altas concentraciones que frecuentemente se utilizan en esta prueba casi siempre eliminan sustancias con un gran potencial las cuales fueron aprobadas para uso humano en menores concentraciones. Es importante mencionar que la exposición a dosis altas del agente tóxico es un método necesario, seguro y válido para identificar posibles riesgos para los seres humanos expuestos a dosis mucho menores (**concepto de dosis - respuesta de todo o nada**) (27). Para evitar este problema, se ha utilizado la determinación de la **"Concentración Umbral de Irritación"** (25), la cual se basa en la evaluación de varias diluciones de una sustancia aplicada a 6 animales y en la posterior rotación de los sitios de aplicación para observar las diferencias de sensibilidad en varias zonas de prueba. Esta determinación puede utilizarse como guía para seleccionar la

concentración umbral que va a emplearse en los estudios clínicos en humanos.

En estudios realizados para evaluar la duración de la exposición y los efectos de la exposición accidental de irritantes de la piel, se ha observado que existe una gran diferencia en los valores de irritación (28). Otros autores han mostrado que la naturaleza fisicoquímica de la sustancia aplicada es más importante que el método de aplicación (29).

La toxicidad dérmica puede ser inducida en una variedad de animales de laboratorio, sin embargo, el conejo Nueva Zelanda es la especie preferida para estos estudios por su tamaño, uniformidad de respuesta y comodidad en el manejo, además, su piel es la más permeable de todas la especies estudiadas (30, 31) y generalmente es más susceptible de irritación que la piel del humano bajo las mismas condiciones (32) (Tablas 1, 2 y 3). ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA 1

Absorción percutánea en la rata y el humano

Compuesto	Dosis absorbida (%)		Diferencia
	Rata	Humanos	
Haloprogina	96 ± 14	11 ± 4	X 9
N-Acetilcisteína	4 ± 4	2 ± 2	X 2
Testosterona	47 ± 3	13 ± 3	X 4
Cortisona	25 ± 4	3 ± 2	X 6
Cafena	53 ± 12	48 ± 21	0
Amarillo mantequilla	48 ± 2	22 ± 5	X 2
Triclorocarbanilida	16 ± 9	7 ± 3	X 2
Lindano	31 ± 10	9 ± 4	X 3
Paratión	95 ± 3	46 ± 5	X 2

Bartek, M.J., y cols., *J. Invest. Dermatol.* 58, 114-123. (1972).⁽³¹⁾

TABLA 2

Absorción percutánea en el mono Rhesus y el humano

Compuesto	Dosis absorbida (%)		Diferencia
	Mono Rhesus	Humanos	
2,4-Dinitroclorobenceno	52 ± 4	54 ± 6	0
Nitrobenceno	4 ± 1	2 ± 1	X 2
Testosterona	18 ± 10	13 ± 3	X 2
Cortisona	5 ± 3	3 ± 2	0
Hidrocortisona	3 ± 1	2 ± 2	0
Ácido benzoico	60 ± 8	43 ± 16	0
DDT	19 ± 9	10 ± 4	0
Maleato dietilo	68 ± 7	54 ± 7	X 2
Ácido retínoico	2 ± 1	1 ± 0.2	X 2

Bartek, M.J., y cols., *J. Invest. Dermatol.* 58, 114-123. (1972).⁽³¹⁾

TABLA 3

Absorción percutánea en el conejo y el humano

Compuesto	Dosis absorbida (%)		Diferencia
	Conejos	Humanos	
Haloprogina	113 ± 16	11 ± 4	X 10
N-Aceticisteina	2 ± 1	2 ± 2	0
Testosterona	70 ± 8	13 ± 3	X 5
Cortisona	30 ± 9	3 ± 2	X 10
Cafeína	69 ± 6	48 ± 21	0
Amarillo mantequilla	100 ± 8	22 ± 5	X 5
DDT	46 ± 1	7 ± 3	X 5
Lindano	51 ± 30	9 ± 4	X 6
Paratión	98 ± 8	46 ± 5	X 10
Malatión	65 ± 11	8 ± 5	X 8

Bartek, M.J., y cols., *J. Invest. Dermatol.* 58, 114-123. (1972).⁽³¹⁾

Actualmente, el uso tópico de agentes antineoplásicos para el tratamiento del cáncer de la piel y otras enfermedades proliferativas se reconoce como un importante avance y en algunos casos puede substituir a las formas clásicas de tratamiento. Las normas que regulan la introducción de nuevos medicamentos han cambiado desde el siglo pasado para asegurar la inocuidad y eficacia de las sustancias para su uso en la población general. No obstante, a pesar de los adelantos técnicos y científicos todavía no existen suficientes medicamentos que proporcionen un tratamiento adecuado para

muchas enfermedades. Este es el caso de la artritis reumatoide, de la esclerosis múltiple, del cáncer, de la enfermedad de Alzheimer y de infecciones virales como el SIDA, entre otras. Así pues, aunque miles de sustancias se estudian cada año, con frecuencia sólo una o dos de ellas son adecuadas para desarrollar un nuevo medicamento.

En el año de 1981 en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León se inició una línea de investigación, con el propósito de aislar productos biológicamente activos a partir del fruto de la *Karwinskia humboldtiana*.

Las plantas del género *Karwinskia* pertenecen a la familia de las *Rhamnaceas*, distribuidas prácticamente en todo el territorio mexicano, sudoeste de los Estados Unidos de Norteamérica, Centroamérica, Norte de Colombia, Cuba, Haití y República Dominicana. Este género incluye aproximadamente unas 15 especies de arbustos, 11 de las cuales se encuentran en México y en su mayoría son consideradas como plantas tóxicas ⁽³³⁾. De todas las especies del género *Karwinskia*, la *humboldtiana* es la más abundante en nuestro país, por lo tanto es también la más estudiada tanto a nivel químico como toxicológico ⁽³⁴⁾. La *K. humboldtiana* es un arbusto venenoso, popularmente conocida como tullidora, coyotillo, capulín tullidor,

cacachila, etc. (35). El arbusto puede medir desde 1 hasta 5 metros de altura, tiene hojas opuestas, simples y con nervaduras de tintes negros (Figura 1). El fruto que produce es de color violeta oscuro cuando está maduro, su endocarpo es leñoso y encierra hasta cuatro semillas, de las cuales frecuentemente dos son fértiles y dos abortadas. Tradicionalmente, el cuadro clínico de la intoxicación con esta planta se describe como una parálisis flácida, simétrica, progresiva y ascendente, que en los casos graves puede causar parálisis bulbar y muerte (36, 37, 38).



Figura 1

Arbusto de la *Karwinskia humboldtiana*.

Los efectos tóxicos de esta planta fueron publicados *post-mortem* por primera vez en el año de 1789 por el historiador jesuita Don Francisco Xavier Clavijero en su libro de Historia de la Antigua o Baja California (39). En dicha obra, se relata el efecto tullidor que causa la ingestión del fruto. Sin embargo, también se menciona que los indios pericúes comen el fruto sin daño alguno, ya que previamente le han extraído la semilla, en la cual radica el tóxico. Otra de las contribuciones clínicas más importantes en este campo es la de Castillo Nájera (40), quién en 1918 describió detalladamente la tragedia que sufrieron 106 soldados de la División del Norte al intoxicarse con el fruto de la *K. humboldtiana* en el desierto de Altar, Sonora, con una mortalidad superior al 20%.

Otros autores han realizado diversas investigaciones para esclarecer el daño causado por el fruto de esta planta y han observado desmielinización segmentaria en el nervio periférico sin tomar en cuenta otros órganos (41, 42). Adicionalmente, otros autores han descrito daño en hígado, pulmón y riñón principalmente (43, 44). Así pues, partiendo de que el principio tóxico se encuentra particularmente en la semilla del fruto, Dreyer y cols. obtuvieron por primera vez cuatro antracenosas diméricas, que denominaron de acuerdo a su peso molecular como: T-496, T-514, T-516 y T-544 (45) (Figura 2). Además, se han aislado compuestos estructuralmente similares en otras plantas del

mismo género: a partir de la *K. parvifolia* un diastereoisómero de la T-514 (Peroxisomicina A₂), a partir de la *K. umbellata* un isómero de la T-514 y de la *K. affin humboldtiana* la T-510 (46). Recientemente, se aisló e identificó un diastereoisómero de la T-514 (Peroxisomicina A₃) y un isómero de posición de la T-514 (Peroxisomicina B₁) (47).

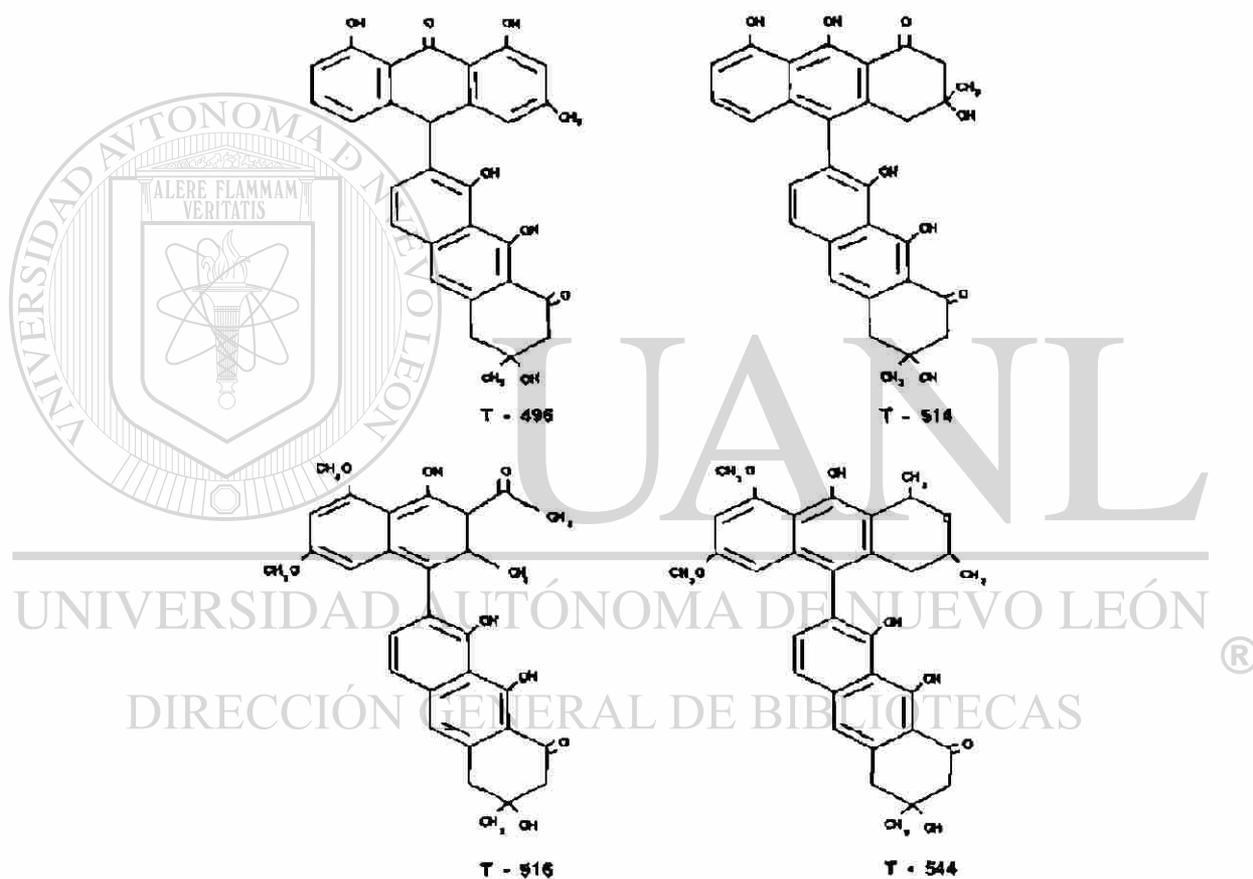


Figura 2

Toxinas aisladas del fruto de la *karwinskia humboldtiana*
 Dreyer D.L. y cols. *J. Am. Soc.* 97: 4985 - 4990. (1975)⁽⁴⁵⁾

La T-514 se conoce como Peroxisomicina A₁, debido a que se ha demostrado en estudios sobre peroxisomas de levaduras de *Candida boidinii* y *Hanselula polymorpha* que produce daño selectivo e irreversible de estos organelos (48).

La Peroxisomicina A₁ es una antracenona dimérica, cuyos monómeros están formados por dos anillos fenólicos y una cetona cíclica de 6 miembros (Figura 3). El nombre IUPAC de esta sustancia es: 3, 3' - dimetil - 3, 3', 8, 8', 9, 9' - hexahidroxi - 3, 3', 4, 4' - tetrahidro (7, 10' - biantracen) - 1, 1' (2H, 2'H) diona (49). Es un ácido débil con un pKa de 7.27 ± 0.09, termolábil a partir de temperaturas superiores de 40 °C, fotosensible, fácilmente oxidable con el oxígeno y degradable a pH básico y poco soluble en agua (50).

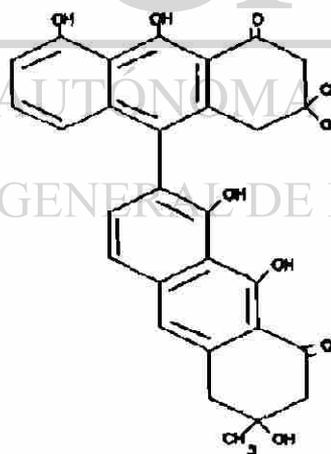


Figura 3

Estructura química de la T-514 (Peroxisomicina A₁)

Estudios experimentales en diferentes especies animales han mostrado que la T-544 es la responsable de la parálisis mientras que la T-496 produce un cuadro diarreico y la T-514 produce un efecto citotóxico marcado principalmente en hígado y pulmón (51).

La determinación de la DL_{50} de la Peroxisomicina A_1 en diversas especies animales mostró una curva dosis-respuesta con una pendiente abrupta (52). Este tipo de curvas indican una pequeña variación biológica (53).

Estas observaciones llevaron a la suposición de que si hubiera toxicidad selectiva entre las células de origen benigno y las células neoplásicas, ésta podría tener un potencial uso terapéutico. Por tal razón se estudiaron *in vitro* los efectos citotóxicos de la Peroxisomicina A_1 en células de origen benigno y maligno, y se comparó la respuesta de esta sustancia con otros

agentes citotóxicos conocidos. Sobre el particular, se encontró una marcada toxicidad selectiva (54). Por tal motivo, se ha investigado su posible uso como agente antineoplásico. Acorde con ello se solicitó y se obtuvo la patente para su uso en la Comunidad Económica Europea, Estados Unidos de Norteamérica, Japón, Corea y Canadá (55). Actualmente, este proyecto se encuentra en Fase Clínica I.

Estudios preliminares tanto *in vivo* como *in vitro* en monos y ratas indicaron que el peroxisoma es uno de los organelos blanco (16). Además, también se ha mostrado que esta sustancia es un inhibidor no competitivo de la actividad de la catalasa peroxisomal. Adicionalmente, se ha encontrado para los otros compuestos antracenónicos un grado variable de inhibición enzimática (56). Por otra parte, se ha comprobado el efecto de la Peroxisomicina A₁ sobre la peroxidación lipídica microsomal hepática (57), así mismo, se ha observado una estrecha relación entre peroxisomas y cáncer (58). También se ha demostrado que los peroxisomas se encuentran en número muy reducido en algunos tumores malignos (59). Considerando lo anterior, se ha comparado el efecto de la Peroxisomicina A₁ con el efecto antineoplásico del Factor de Necrosis Tumoral, que también disminuye la actividad de la catalasa hepática y genera una disminución del número de peroxisomas (60).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

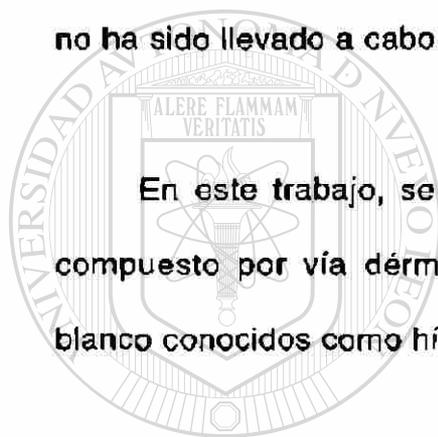
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Estudios de citotoxicidad en cultivo de piel y de hígado con la T-514 y la T-544 demostraron que ambas toxinas son altamente tóxicas; la T-514 lo fue más que la T-544. Cabe mencionar que la toxicidad en el cultivo de células de piel fue menos severa que la observada en cultivo de hepatocitos (61).

Estudios *in vitro* realizados con la Peroxisomicina A₁ mostraron un efecto citotóxico en células de melanoma (54). Lo anterior resulta de interés ya que hasta ahora el tratamiento de este tumor con los agentes antineoplásicos disponibles ha proporcionado resultados muy pobres (62). Por tal razón, y considerando el potencial terapéutico de la Peroxisomicina A₁ se planteó el siguiente protocolo con el propósito de investigar la toxicidad de esta sustancia en la piel, así como su posible absorción ya que hasta el momento no ha sido llevado a cabo dicho estudio.

En este trabajo, se pretende evaluar el potencial de irritación de este compuesto por vía dérmica, e indirectamente su toxicidad en los órganos blanco conocidos como hígado, pulmón y riñón.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

HIPÓTESIS

La T-514 (Peroxisomicina A₁) administrada por vía dérmica produce baja toxicidad tanto a nivel local como sistémico.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

OBJETIVO GENERAL

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Evaluación de la toxicidad dérmica de la T-514 (Peroxisomicina A₁) en conejos

Nueva Zelanda.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Evaluar la toxicidad tóxica de la Peroxisomicina A₁ (respuesta de irritación aguda primaria).
 - 2.- Determinar el índice de irritación primaria.
 - 3.- Evaluar la toxicidad subcutánea.
 - 4.- Evaluar la sensibilización dérmica (respuesta alérgica retardada).
 - 5.- Evaluar la fototoxicidad (respuesta de irritación primaria resultante de los cambios moleculares inducidos por la luz UV en la estructura de la Peroxisomicina A₁ aplicada a la piel de conejos Nueva Zelanda).
 - 6.- Determinar la dosis mínima de radiación requerida para producir fototoxicidad en 24 horas a 365 nm.
-
- 7.- Evaluar la fotopigmentación producida por la Peroxisomicina A₁ mediante la exposición a una fuente de radiación UV.
 - 8.- Determinar las concentraciones sanguíneas de la Peroxisomicina A₁ en conejos Nueva Zelanda a diferentes tiempos después de su aplicación.
 - 9.- Evaluar la toxicidad sistémica producida por la Peroxisomicina A₁ mediante microscopía de luz en órganos blanco, como hígado, pulmón y riñón.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Material biológico

Se trabajó con 30 conejos Nueva Zelanda de ambos sexos. El peso promedio fue de 2.9 ± 0.3 kg. Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de laboratorio, ciclo luz-obscuridad de 12 horas, temperatura 22 °C, con agua y alimentación *ad libitum* completa, balanceada y libre de antibióticos.

2.1.2 Material y equipo general

Cortadora de pelo

Marca Oster® modelo Golden A5.

Cortadora de tejidos

Microtomo Leica® RM 2025.

Cromatografía en capa fina (CCF)

Cromatofolios Al de Sílica Gel 60 F₂₅₄ con espesor de capa de 0.2 mm marca Merck. Eluentes: Benceno-Acetona 3:1 grado analítico más 0.005 mL de ácido acético. Revelador: Solución de KOH al 5% en etanol.

Desecador de muestras

Pistola desecadora Desaga®.

Incluidor de tejidos

Histoembedder Leica® R134.

Lámpara de luz ultravioleta

Modelo UVGL-25 Mineralight® de 60 Hz, 0.16 Amps.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Microscopio

Microscopio Carl Zeiss® de luz transmitida de campo claro modelo K-7D con cámara de video acoplada a una computadora con tarjeta de video para captura y análisis de imágenes.

Procesador de tejidos

Histoquinette Leica® TP 1010.

Puntos de fusión

Se determinaron en un aparato Electrothermal® 9100.

Radiómetro

Radiómetro LI-COR 189.

Rotavapor

Rotavapor Büchi 461.

T-514 (Peroxisomicina A₁)

La Peroxisomicina A₁ fue proporcionada por el Laboratorio de

Producción del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Se utilizó el lote #74 que se obtuvo el 01 de febrero de

1996 el cual fue sometido a monitoreo de pruebas de control de calidad basándose en dos parámetros como lo son la pureza química y la pureza biológica (Tabla 4). La pureza química se evaluó mediante la medición del punto de fusión inicial y final; otra prueba utilizada fue la pureza espectroscópica, ésta se realizó al monitorear las absorbancias a varias longitudes de onda de 430 nm/415 nm, 270 nm /415 nm y 270 nm /222 nm.

La pureza cromatográfica se evaluó utilizando el análisis por CCF-FN y CCF-FR mediante la observación de una sola mancha de R_f establecido bajo la lámpara de luz UV a 254 nm y 369 nm y en el visible por observación directa, para lo cual se aplicó la Peroxisomicina A_1 en placas de Sílica Gel 60 F₂₅₄ con espesor de capa de 0.2 mm marca Merck. Eluentes Benceno-Acetona 3:1 más 0.005 ml de ácido acético en una cuba de 1000 mL. Así también, se utilizó CLAR-FR para observar la aparición de un solo pico de t_R establecido. Se evaluó la pureza espectroscópica de dicho pico empleando un detector de arreglo de fotodiodos, por medio del cual se generó el espectro de absorción completo.

La pureza biológica incluyó la valoración del grado de inhibición de la catalasa *in vitro* según el método de Aebi y cols.⁽⁶³⁾ y la evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* empleando el método desarrollado por Ekwall y cols.⁽⁶⁴⁾ que utilizó la línea de células benignas de hígado de Chang y la línea maligna de hepatoma HEPLC/PRF/5, a las cuales se les determinó la CT_{50} .

Es importante mencionar, que durante el desarrollo experimental de esta tesis se determinaron algunos de los patrones de calidad para corroborar la pureza de la Peroxisomicina A_1 a través del punto de fusión inicial y final, además de la cromatografía en capa fina fase normal (CCF-FN) para detectar

cualquier posible degradación y/o contaminación que hubiera sufrido con el tiempo.

Tabla 4

Parámetros del control de calidad de la Peroxisomicina A₁

Físico-Químico	Punto de fusión inicial	179.24 ± 1.54 °C
	Punto de fusión final	181.37 ± 1.26 °C
	CCF - FN	Observación visual
	CCF - FR	Observación visual
	Pureza espectroscópica	Relación de absorbancias 430 nm/415 nm = 1.003 ± 0.003
Biológico	CLAR - FR	Registro de un solo pico y evaluación de la pureza espectroscópica
	Inhibición de la catalasa	46.58 ± 1.33
	Citotoxicidad selectiva	CT ₅₀ Chang 56 - 80 µg/mL
	CT ₅₀ HEPLC/PRF/5	2.5 - 10 µg/mL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Pruebas de toxicidad dérmica

Para cada una de las pruebas de toxicidad dérmica realizadas se utilizaron 6 conejos Nueva Zelanda de ambos sexos, con un peso promedio de 2.9 ± 0.3 kg. Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de

laboratorio ciclo luz-obscuridad de 12 horas, temperatura 22 °C, con agua y alimentación *ad libitum* completa, balanceada y libre de antibióticos. Los animales fueron aclimatados durante 7 días previos a su utilización. Todo el pelo del dorso de cada conejo fue rasurado 48 horas antes de la aplicación empleando una cortadora Oster® (modelo Golden A5) (Figura 4). Por otra parte, se tomaron muestras de sangre en la vena marginal externa izquierda mediante cateterización de la vena con un cateter IV 22 GA 2.5 cm Insyte® a los siguientes tiempos: 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 36, 48, 60 y 72 horas.



Figura 4

Región dorsal del conejo rasurada.

2.2.1.1 Determinación de la Peroxisomicina A₁ en sangre

La determinación de la Peroxisomicina A₁ en sangre se realizó mediante el método modificado de Guerrero y cols. ⁽⁶⁵⁾ La sangre total con anticoagulante se sometió a tres extracciones con 5 mL de acetato de etilo, después se evaporó el solvente en un rotavapor Büchi 461 a 40 °C. El residuo se disolvió en el mínimo volumen de cloroforno. Los extractos obtenidos se aplicaron en placas de Sílica Gel 60 F ₂₅₄ Merck (espesor 0.2 mm), junto con un estándar de la T-514. La placa se eluyó primero con éter de petróleo, se secó y luego se eluyó con benceno:acetona 3:1, 0.1% en ácido acético. Las manchas se revelaron con una solución de KOH al 5% en etanol y se observaron en el visible y en el UV (375 nm y 253.7 nm).

2.2.1.2 Evaluación de la toxicidad tóxica

Esta prueba se realizó con base en el método modificado de Draize, desarrollado por Murphy y cols ⁽²⁵⁾, que consiste en aplicar la sustancia vía tóxica en el dorso del conejo a 3 diferentes concentraciones, al 1, 3 y 9%, consideradas como baja, media y alta respectivamente. Dichos autores realizaron evaluaciones histopatológicas y determinaron el Índice de Irritación Primaria (IIP) de cada concentración después de 24 horas de exposición.

Cabe mencionar que las sustancias con IIP de 2 ó menos se consideran irritantes ligeros, mientras que las sustancias con IIP de 2 a 5 se denominan irritantes moderados y aquellas con IIP mayor de 6 irritantes severos. Finalmente, por medio de evaluaciones histopatológicas de los órganos internos se estudian los efectos tóxicos sistémicos, ya que a veces ocurre, como en este caso, que las concentraciones plasmáticas no son detectadas.

Para la evaluación de esta prueba se trabajó con 6 conejos Nueva Zelanda de ambos sexos y con las características anteriormente señaladas. Con un marcador no tóxico se delimitaron 4 cuadrantes, 2 a cada lado de la línea media dorsal (Figura 5). Así pues, las áreas de prueba del cuadrante izquierdo superior y cuadrante derecho inferior fueron raspadas con una aguja hipodérmica estéril calibre 27 G para retirar el estrato córneo, mientras que los otros 2 cuadrantes se mantuvieron intactos sin ninguna abrasión.

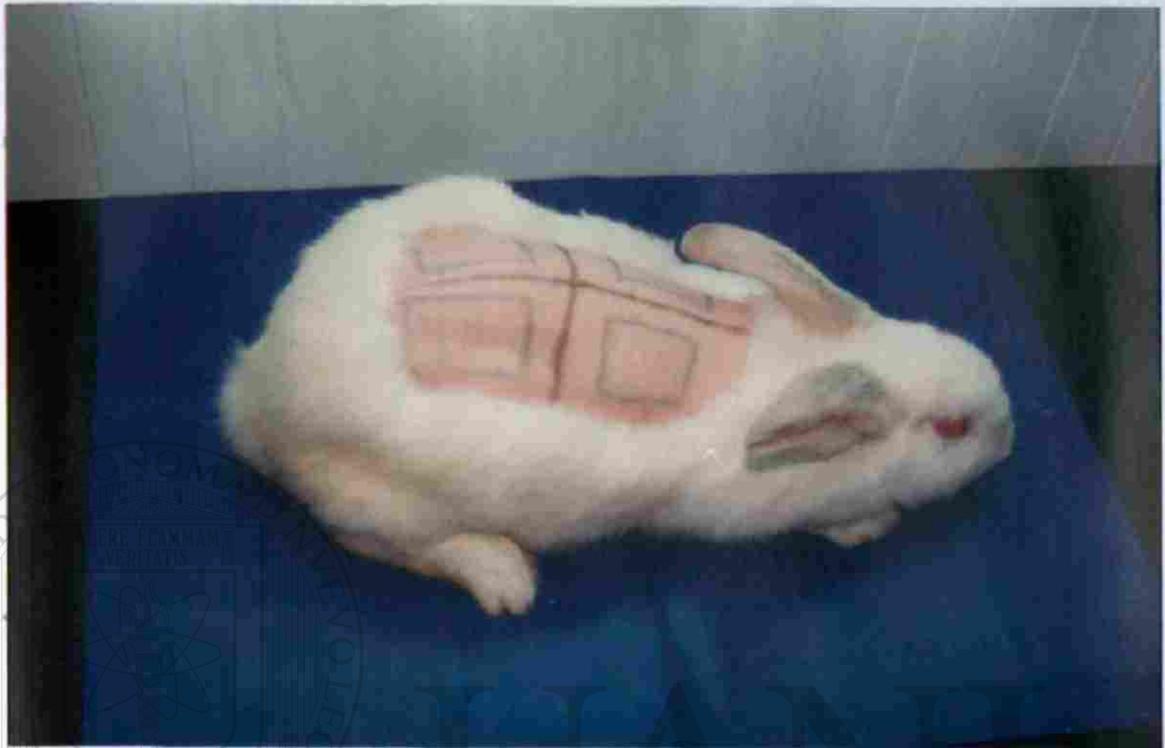


Figura 5

Áreas de aplicación de la Peroxisomicina A_1 .

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Posteriormente, la Peroxisomicina A_1 se disolvió en etanol al 96% y se aplicó vía tópica 0.5 mL a las concentraciones ya mencionadas (1, 3 y 9%), además de un área control que solo recibió el vehículo. El área de prueba fue de 25 cm². Estas soluciones fueron rotadas (con arreglo de bloques latinos) por las 4 áreas de prueba, con el fin de que cada solución fuera examinada tanto en sitios de abrasión como sin abrasión (Figura 6). Después de la

aplicación se colocaron gasas sobre las áreas de prueba y fueron aseguradas sobre el dorso del conejo mediante unas vendas. En seguida, los animales fueron colocados en jaulas que no permitían su movimiento (Figura 7). Las gasas fueron removidas 24 horas después de su aplicación y finalmente los animales fueron colocados en jaulas individuales.

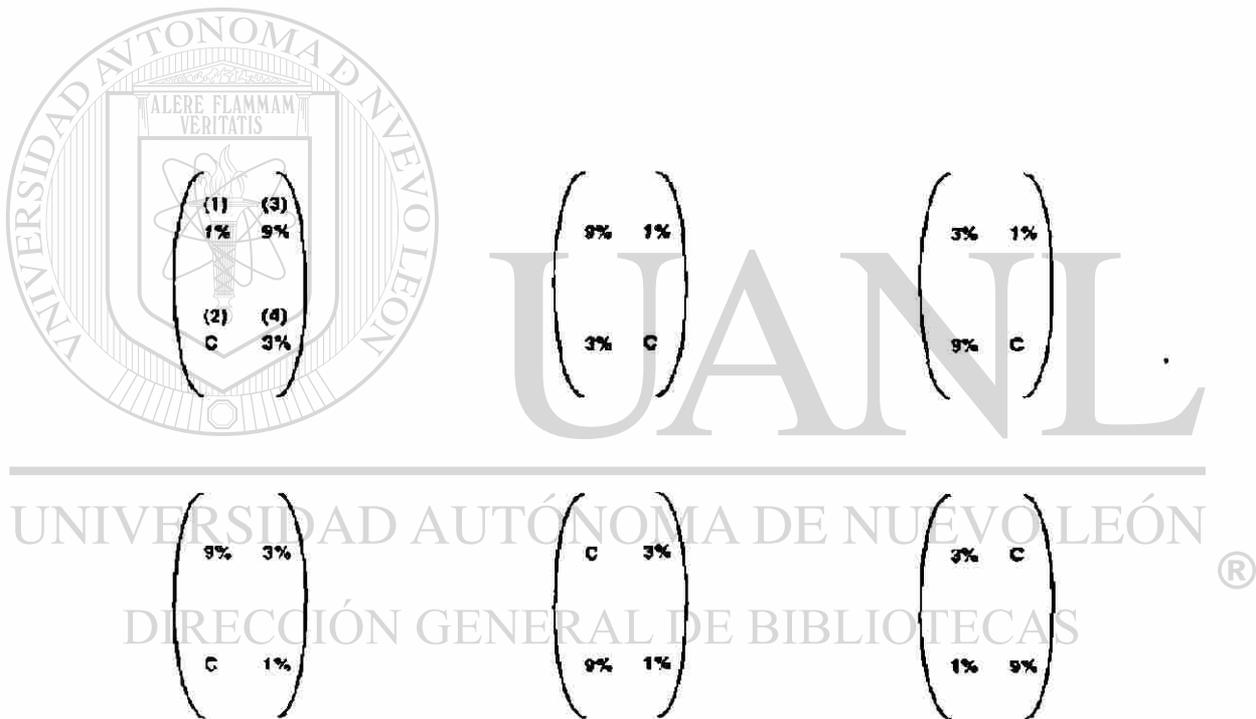


Figura 6

Secuencia de aplicación en la región dorsal del conejo. Cuatro preparaciones 1%, 3%, 9% y C son asignadas a las cuatro áreas (1), (2), (3) y (4). Áreas (2) y (3) son de piel intacta. Áreas (1) y (4) tienen abrasiones epidérmicas.



Figura 7

Jaulas especiales para la restricción de los conejos

La reacciones de la piel se midieron a las 24, 48 y 72 horas de acuerdo al sistema de medida de Draize⁽¹⁸⁾ (Tabla 5). La evaluación se realizó colocando los animales bajo una fuente de luz blanca fluorescente de 160 watts, a una distancia de 90 cm y sobre un fondo negro plano. Cabe mencionar que con el fin de evitar un sesgo ocasionado por el previo conocimiento de la concentración de la sustancia colocada en cada uno de los cuadrantes, participaron 2 lectores adicionales, que contaban con un entrenamiento sobre

las escalas de medición utilizada y que no conocían las concentraciones utilizadas (Tabla 5).

Tabla 5

Evaluación de las reacciones de la piel

A. Eritema y formación de escara	
Muy escaso eritema (apenas perceptible)	1
Bien delimitado el eritema	2
Moderado a severo el eritema	3
Eritema severo (remolacha) y escasa formación de escara	4
Total posible de medidas del eritema	4
B. Formación de edema	
Muy escaso edema (poco perceptible)	1
Escaso edema (corte de área bien definida por definido relieve)	2
Moderado edema (el relieve del área de aproximadamente 1 mm)	3
Edema severo (el relieve de más de 1 mm con extensión más allá del área de exposición)	4
Total posible edema	4
Posibles medidas totales para irritación primaria	8

Draize, J.H., y cols., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 82, 377-390. (1944)(18)

El índice de irritación primaria (IIP) se calculó de la siguiente manera: los valores numéricos obtenidos para el eritema y edema a las 24, 48 y 72 horas fueron sumados a cada concentración individual en cada animal. El valor obtenido se dividió entre el número de observaciones (3) para dar el promedio para cada sitio de prueba. Este promedio fue dividido por el número total de animales estudiados (6), y de esta forma se obtuvo un promedio para cada concentración (1%, 3%, 9% y vehículo) del compuesto examinado en los 6 animales.

Al término del experimento los animales fueron sacrificados con pentobarbital sódico a una dosis de 60 mg/kg vía IV en la vena marginal externa izquierda. Posteriormente se tomaron fragmentos de los sitios de prueba y control de la piel, además de los órganos blanco como hígado, pulmón y riñón para su evaluación histopatológica por microscopía de luz.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.2.1.3 Evaluación de la toxicidad subcutánea

Esta prueba se realizó con base en el método modificado de Feldman y Maibach ⁽⁶⁶⁾ desarrollado por Bartek y cols ⁽³¹⁾. Dicho método consiste en la administración de la sustancia a diferentes dosis vía subcutánea, en el dorso del conejo. Así pues, al transcurrir 72 horas después de la administración,

se realizan evaluaciones histopatológicas de cada uno de ellos. Por otra parte, los efectos tóxicos sistémicos se estudian por medio de evaluaciones histopatológicas de los órganos internos.

Para la evaluación de esta prueba se trabajó con 6 conejos Nueva Zelanda de ambos sexos y con las características anteriormente señaladas. Con un marcador no tóxico se delinearon 12 cuadrantes, 6 a cada lado de la línea media dorsal. Posteriormente, la Peroxisomicina A₁ disuelta en etanol-Haemaccel[®] 1:10 se aplicó en la piel de cada conejo por vía subcutánea mediante una jeringa de tuberculina, con aguja hipodérmica calibre 27 G. Las dosis administradas fueron las siguientes: 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µg/cm² en un volumen de 0.2 mL. El área de prueba fue de 4 cm².

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Al término del experimento los animales fueron sacrificados con pentobarbital sódico a una dosis de 60 mg/kg vía IV en la vena marginal externa izquierda. Finalmente se tomaron fragmentos de los sitios de prueba y control de la piel, además de los órganos blanco hígado, pulmón y riñón, para su evaluación histopatológica por microscopía de luz.

2.2.1.4 Evaluación de la sensibilización

Esta prueba se realizó según el método estándar de Draize ⁽¹⁸⁾, que consiste en la administración de la sustancia en cuestión, por vía intradérmica, en el dorso del conejo. La primera dosis requiere un volumen de 0.05 mL mientras que 72 horas después se aplican 0.1 mL de la solución al 1/1000 en el mismo sitio. Las administraciones de 0.1 mL se repiten tres veces por semana hasta un total de diez. Así pues, las reacciones de la piel se miden 24 horas después de cada aplicación de acuerdo al sistema de medida de Draize (Tabla 5). Dos semanas después de la última administración se aplica una dosis única de 0.05 mL de la solución en el mismo sitio y por la misma vía con una aguja calibre 27 G. Después de 24 horas se observan las reacciones de la piel y se comparan con las otras observaciones efectuadas en las inyecciones anteriores. De tal forma, que existe sensibilización cuando los valores de la última administración son mayores que los obtenidos en las precedentes.

Para la evaluación de esta prueba se trabajó con 6 conejos Nueva Zelanda de ambos sexos y con las características anteriormente señaladas. Se aplicó, por vía ID, una cantidad de 0.05 mL de Peroxisomicina A₁ al 1/1000 disuelta en etanol-Haemaccel[®] al 1:10 (Figura 8). Al cabo de 72 horas se administró 0.1 mL de la misma solución recientemente preparada, con una

frecuencia de tres veces por semana durante 3 semanas, hasta completar un total de 10 inyecciones (Figura 9). Las reacciones de la piel se midieron 24 horas después de cada aplicación, de acuerdo al sistema de medida de Draize⁽¹⁸⁾. La evaluación se realizó colocando los animales bajo una fuente de luz blanca fluorescente de 160 watts, a una distancia de 90 cm y sobre un fondo negro plano. Dos semanas después de la décima inyección se administró otra dosis de 0.05 mL de la solución, y posteriormente se midieron las reacciones a las 24, 48 y 72 horas de acuerdo al sistema de medida de Draize (Tabla 5).

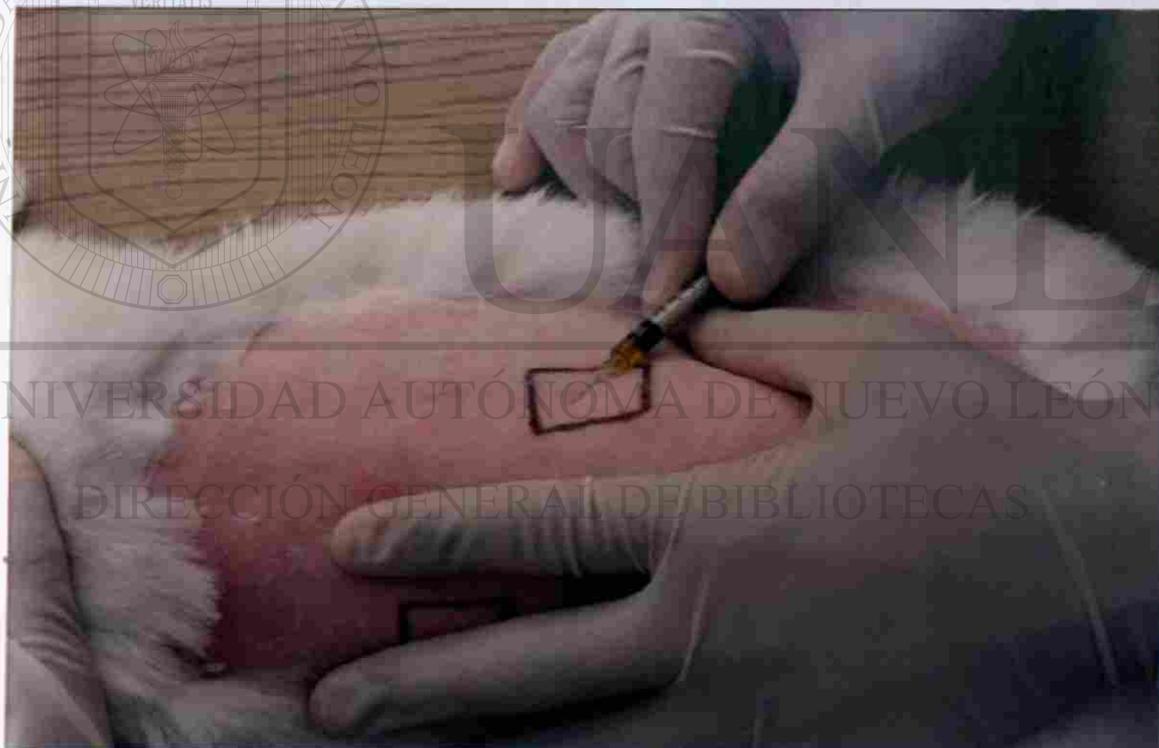


Figura 8

Fotografía de la piel del conejo expuesta a la administración vía ID de 0.1 mL de la Peroxisomicina A₁ al 1/1000.



Figura 9
Fotografía a mayor aumento de la piel de conejo expuesta a la administración
vía ID de 0.1 mL del vehículo.

Al término del experimento los animales fueron sacrificados de la misma manera que en la prueba anterior, y se tomaron fragmentos de los mismos tipos de tejidos para su evaluación histopatológica.

2.2.1.5 Evaluación de la fototoxicidad

Esta prueba se realizó según el método de Baccichetti y cols.⁽⁶⁷⁾, que consiste en aplicar tópicamente la sustancia en cuestión a concentraciones al 1, 3 y 9% en solución etanólica al 96% en el dorso del conejo. Los animales son colocados durante 45 minutos en un cuarto oscuro para evitar la exposición de la sustancia a otras fuentes de radiación. Posteriormente la piel es irradiada con una lámpara de luz UV modelo UVGL-25 Mineralight® con filtro integrado, con una intensidad de 180 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, a una longitud de onda de 365 nm y a una distancia de 15 cm (la intensidad de la radiación es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia). Se determina la intensidad de la radiación y la dosis mínima para el eritema (definida como la mínima cantidad de luz ultravioleta requerida para producir un eritema clínicamente detectable en la piel no tratada, expuesta a una fuente de luz UV de características apropiadas). Después de la exposición a la luz UV se miden las reacciones de la piel a las 24, 48 y 72 horas de acuerdo al sistema de medida de Draize (Tabla 5).

Para la evaluación de esta prueba se utilizaron primero 3 conejos en los cuales se calculó la dosis mínima requerida para producir un eritema clínicamente detectable en una piel no tratada por ninguna sustancia.

Por medio de un radiómetro LI-COR 189, se obtuvo el resultado de $8.424 \times 10^4 \text{ J/m}^2$ a los 540 minutos. Una vez estandarizada la dosis, se trabajó con otros 6 conejos en los que se delinearon 10 cuadrantes, 5 a cada lado de la línea media dorsal. La Peroxisomicina A_1 se disolvió en etanol al 96% y se aplicaron $20 \mu\text{l/cm}^2$ de las 3 soluciones utilizadas, hasta completar 4 cm^2 (Figura 10). Además de la Peroxisomicina A_1 , se utilizó el 8-metoxipsoraleno al 1% p/v disuelto en etanol al 96% como control positivo, y un control negativo que solo recibió el vehículo.

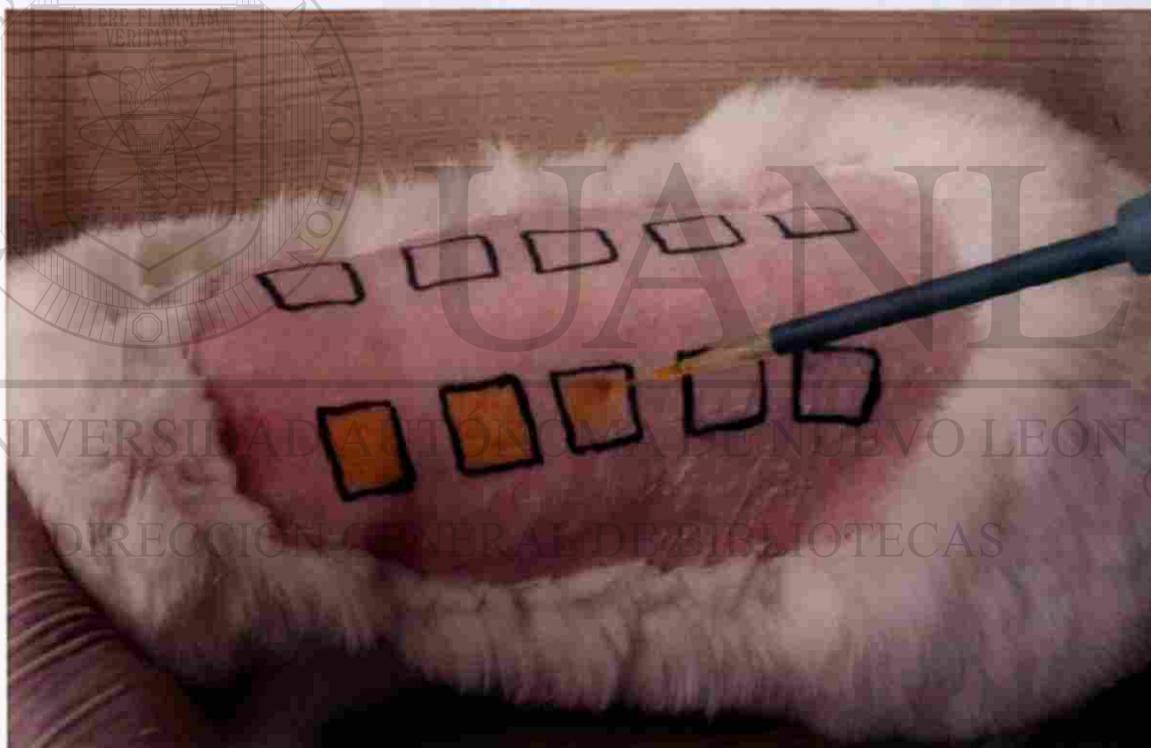


Figura 10

Fotografía de la piel de conejo con administración vía tópica de las diferentes soluciones de la Peroxisomicina A_1

Al transcurrir 45 minutos después de la aplicación, la piel fue expuesta por 540 minutos a la luz ultravioleta de la lámpara anteriormente mencionada (Figura 11). Finalmente se midieron las reacciones de la piel a las 24, 48 y 72 horas de acuerdo al sistema de medida de Draize (Tabla 5). La evaluación se realizó colocando los animales bajo una fuente de luz blanca fluorescente de 160 watts, a una distancia de 90 cm y sobre un fondo negro plano.

Al término del experimento los animales fueron sacrificados de la misma manera que en las pruebas anteriores.



Figura 11

Exposición a la luz UV de las áreas de aplicación.

2.2.1.6 Evaluación de la fotopigmentación

Esta prueba también diseñada por Baccichetti y cols.⁽⁶⁷⁾, es casi idéntica a la fototoxicidad, la única diferencia radica en que las reacciones se miden dos semanas después, para dar tiempo a que se lleve a cabo la fotopigmentación. El criterio utilizado para la evaluación de la pigmentación se muestra en la tabla 6.

Tabla 6

Evaluación de la fotopigmentación

Pigmentación no perceptible	0
Pigmentación definida (café claro) con bordes definidos	1
Pigmentación moderada (café)	2
Pigmentación intensa, (café fuerte)	3
Pigmentación intensa (intensamente pigmentado ó negro)	4

(15)
Nilsson, R., y cols., *Contact Dermatitis*. 28, 285-290. (1993).

2.2.2 Estudio histológico

En todas las pruebas de toxicidad dérmica se tomaron fragmentos de los sitios de prueba y control de la piel, además de muestras de hígado, pulmón y riñón. Posteriormente fueron fijados en formalina al 10%, amortiguados con

sales de fosfatos, deshidratados con alcohol y aclarados con xileno para ser incluidos en parafina. Se realizaron cortes de 6 μm y fueron teñidos con hematoxilina y eosina, así como con ácido peryódico de Schiff (Reacción de PAS: oxidación de grupos hidroxilos libres por el ácido peryódico en la cual la intensidad de la reacción es directamente proporcional al contenido de glucógeno) (68).

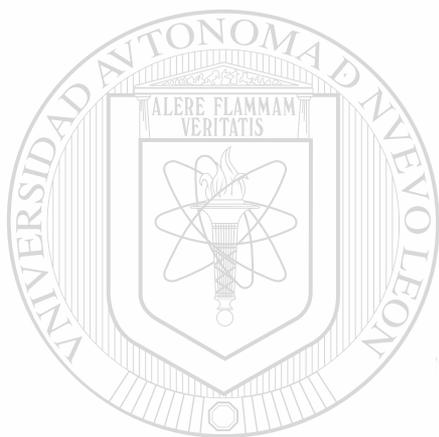
La daños fueron evaluados de acuerdo al grado de severidad y extensión de las lesiones en una escala semicuantitativa desarrollada por Murphy y cols. (25) Dicha escala otorga valores del 1 al 4 para la ulceración y la inflamación de las secciones, proporcionando así una medida de la intensidad de los mismos. Una reacción con valor de 1 se considera leve mientras que una reacción de 4 es catalogada como severa.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

El criterio utilizado para determinar la inflamación aguda en la piel fue el incremento de los neutrófilos polimorfonucleares con o sin edema. En la inflamación subaguda se consideró la presencia de células plasmáticas, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos. En la inflamación crónica se consideró un predominio de linfocitos y formación de escaras. Todas las observaciones se realizaron a un aumento de 20 y 40X de la lente objetivo, con microscopio Carl Zeiss® de luz transmitida de campo claro modelo K-7D.

2.2.3 Análisis estadístico

La prueba estadística utilizada para el análisis de los resultados fue la prueba exacta de Fisher (69, 70).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 DETERMINACIÓN DE LA PEROXISOMICINA A₁ EN SANGRE

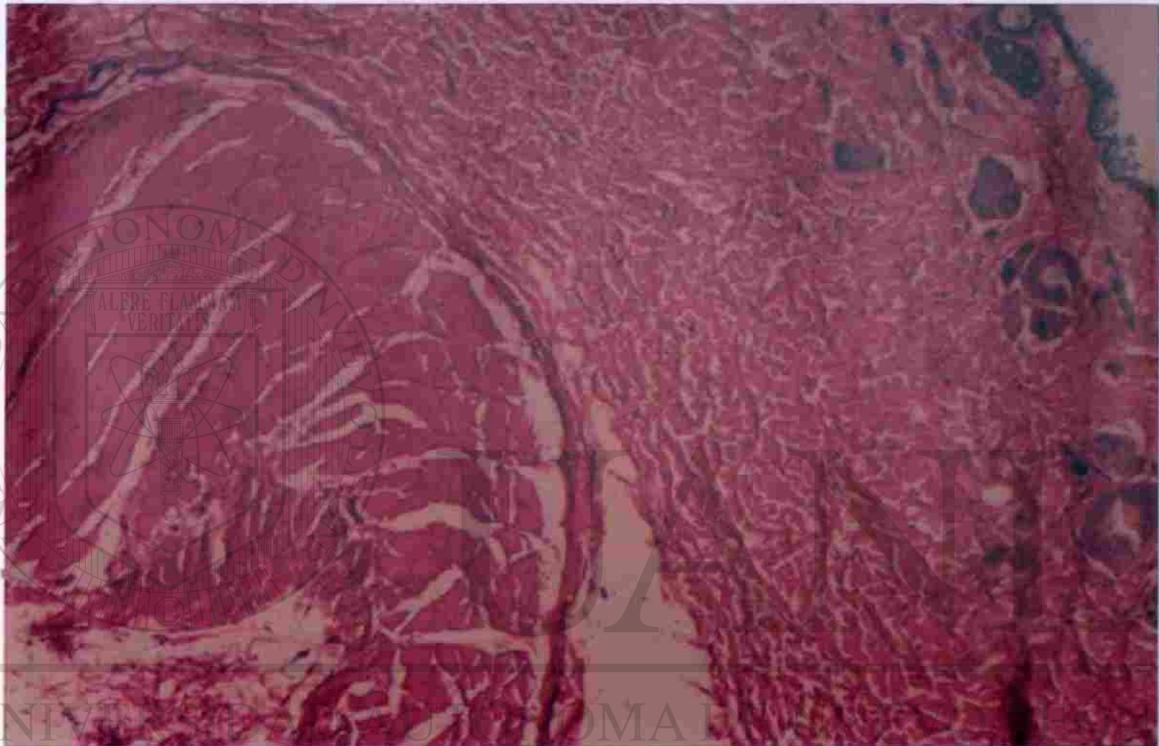
A las dosis administradas en todos los estudios de toxicidad dérmica, no se detectó la Peroxisomicina A₁ en sangre.

3.2 TOXICIDAD TÓPICA

A nivel macroscópico, la administración de la Peroxisomicina A₁ no produjo eritema en la piel en ninguno de los tiempos considerados para su evaluación. Con la concentración del 9% se observó un discreto edema que se resolvió 24 horas después de la aplicación. También se obtuvo un índice de irritación primaria de 0.33 ± 0.15 . Las áreas de piel control no mostraron ningún cambio. El área del control positivo (lauril sulfato de sodio al 100%) mostró ulceración difusa y necrosis epidérmica y se obtuvo un índice de irritación primaria de 6.5 ± 0.7 .

A nivel microscópico, no se observaron alteraciones en las secciones de la piel control (Figura 12). Con las soluciones al 1 y 3% sólo se observó un discreto edema en la dermis superficial. Mientras tanto, en la dermis papilar y media se observaron núcleos reactivos, fibras de colágeno alargadas y separadas entre sí por edema y vasos congestivos (Figura 13). Los anexos epidérmicos no mostraron alteraciones. Tampoco se observó infiltrado inflamatorio agudo ni crónico en ninguno de los cortes revisados. Los hallazgos mencionados se clasificaron como ausencia de daño epidérmico y discreto edema de la capa dérmica.

Con la solución al 9% los hallazgos fueron similares, observándose además un moderado infiltrado mononuclear perivascular e incremento de la congestión vascular y edema de la dermis superficial y media (Figura 14), así como la activación de fibroblastos y fibras musculares con palidez a nivel citoplasmático. Con la tinción de PAS se identificó una disminución importante del glucógeno en las fibras musculares (Figura 15). Mientras tanto, los anexos epidérmicos no mostraron alteraciones. En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos con la administración tópica de la Peroxisomicina A₁. No se manifestó daño epidérmico ni ulceración o inflamación. Igualmente, tampoco se presentaron alteraciones macroscópicas ni microscópicas en los órganos blanco.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS **Figura 12**

Corte de piel control con administración vía tópica del vehículo. H y E 20X.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS **Figura 13**

Corte de piel con aplicación al 3% de la Peroxisomicina A₁ vía tópica.

Se observa discreto edema. H y E 20X.

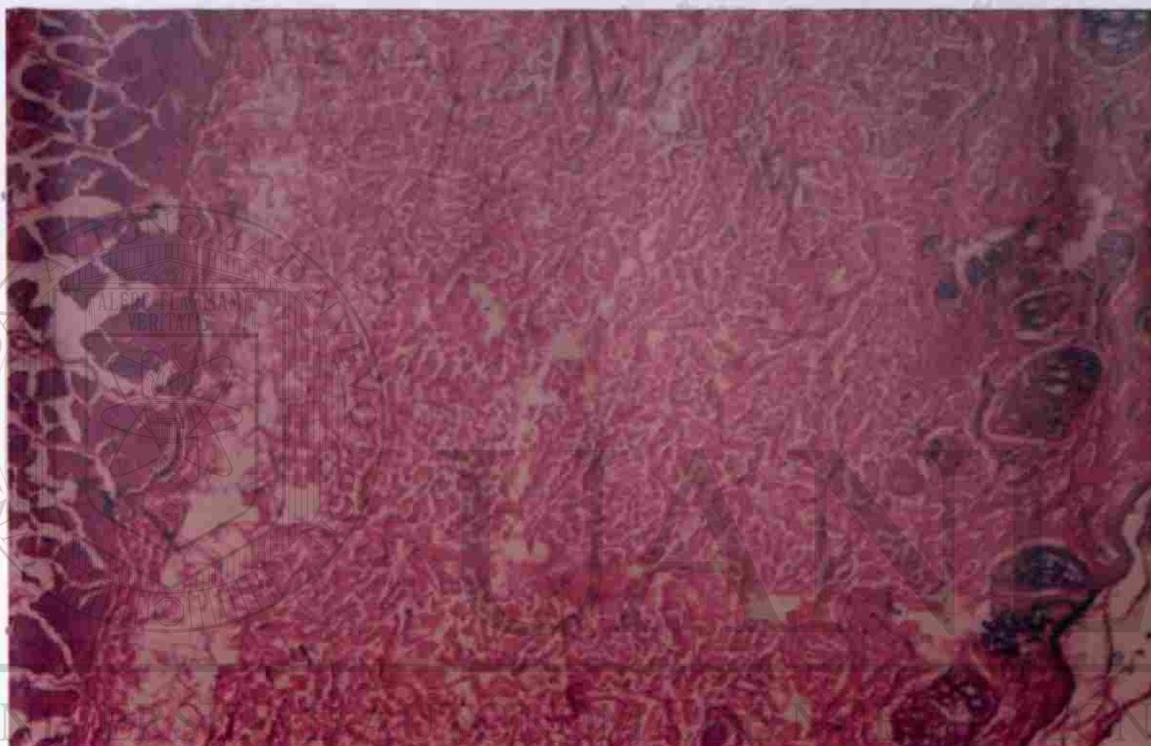


Figura 14

Corte de piel con aplicación de la Peroxisomicina A₁ al 9% vía tópica.

Se observa edema, congestión e inflamación. H y E 20X.



Figura 15

Corte de piel con aplicación de Peroxisomicina A₁ al 9% vía tópica.

Se observa disminución del glucógeno en las fibras musculares. PAS 40 X.

Tabla 7

Evaluación histopatológica de los sitios tratados con la Peroxisomicina A₁ vía tópica.

Conc.	IP	Ulceración	Inflamación			Epidermis
			Aguda	Subaguda	Crónica	Daño
1%	0.2	0	0	0	0	0
3%	0.3	0	0	0	0	0
9%	0.5	0	0	0	0	0
X	0.33 ± 0.15	0	0	0	0	0
* Control Positivo	6.5 ± 0.7					

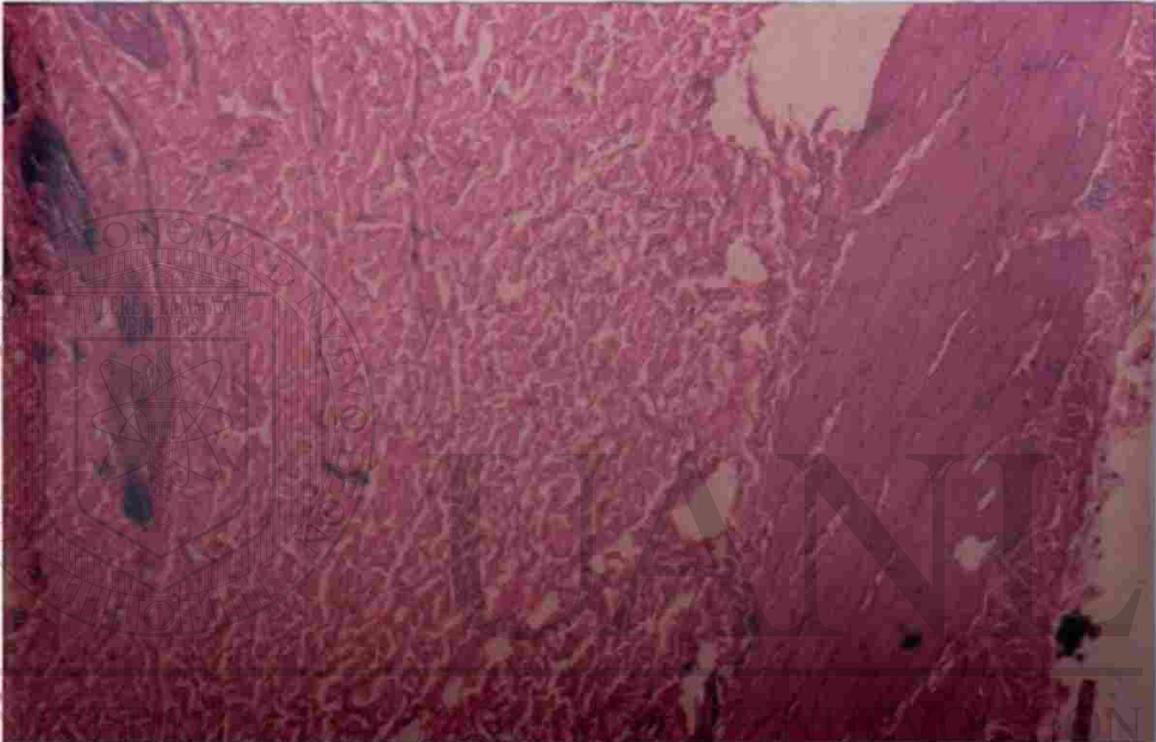
* Lauril Sulfato de Sodio 100%

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
3.3 TOXICIDAD SUBCUTÁNEA
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A nivel macroscópico no se observó eritema en la piel del conejo 72 horas después de la aplicación, y las manifestaciones fueron similares a las encontradas con la vía tópica, a excepción de la dosis de 100 µg/cm², en la cual la epidermis mostró un color violáceo acompañada de una discreta hemorragia.

A nivel microscópico no se observaron alteraciones en las secciones de la piel control (Figura 16). Con las dosis de 5 a 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ se manifestó un discreto edema intercelular a nivel epidérmico. Mientras tanto, en la dermis superficial y en la profunda se identificaron fibroblastos con reactividad nuclear, edema y vasos reactivos con engrosamiento de la pared endotelial (Figura 17).

Con la dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ se encontraron fibras musculares con disminución importante del glucógeno, vasos reactivos engrosados de la pared y edema con extensión a las fibras musculares, así como un moderado infiltrado mononuclear (Figura 18). Con la dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ se observó un marcado edema, una necrosis predominantemente a nivel dérmico, un infiltrado inflamatorio y una congestión vascular (Figura 19).



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS **Figura 16**

Corte de piel control con administración subcutánea del vehículo.

Se observa discreto edema. H y E 20X.



Figura 17

Corte de piel con administración subcutánea de $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Peroxisomicina

A₁. Se observa discreto edema y congestión vascular. H y E 20 X.

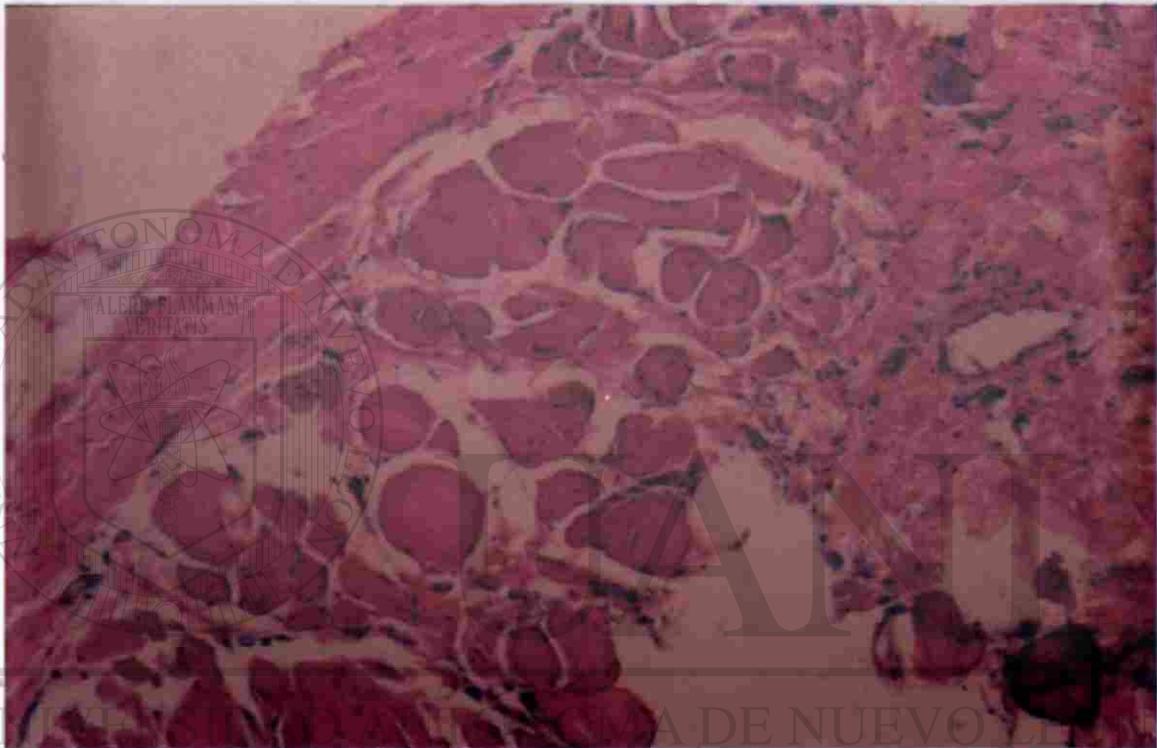
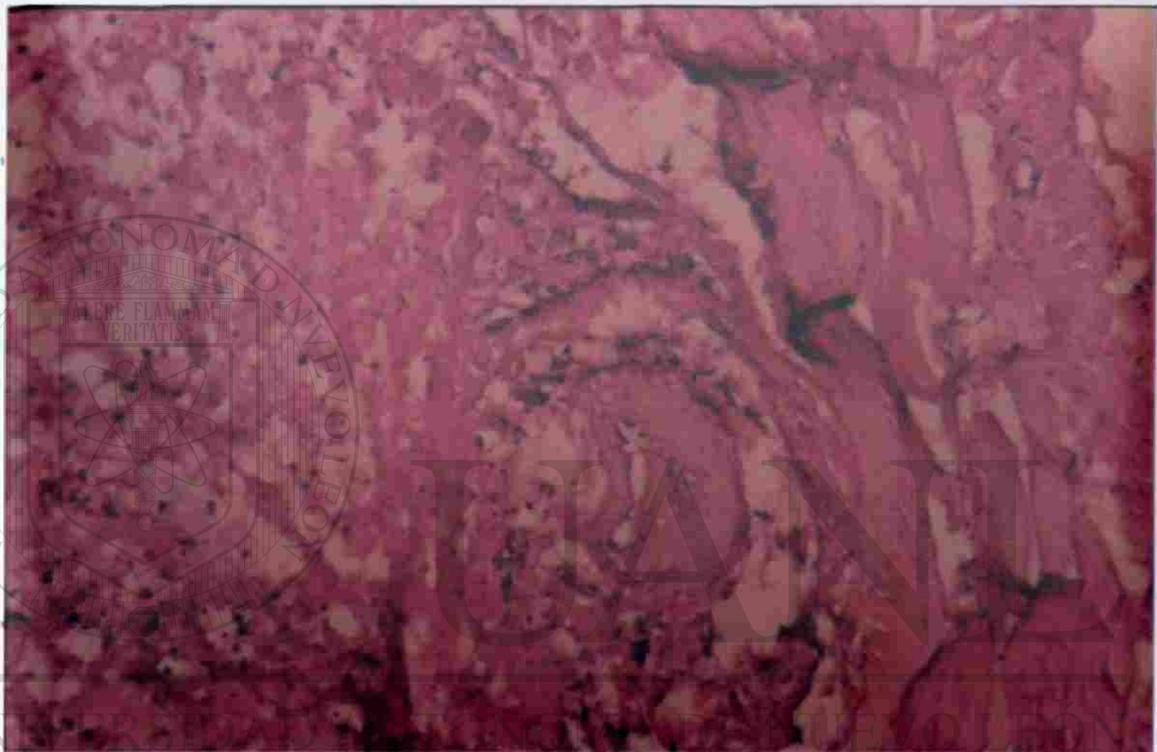


Figura 18 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Corte de piel con administración subcutánea de 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Peroxisomicina

A₁. Se observa discreto edema y congestión vascular. H y E 20X.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 19

Corte de piel con administración subcutánea de $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Peroxisomicina

A_1 . Se observa edema, necrosis, vasos engrosados y severa inflamación.

H y E 40 X.

En la tabla 8 se muestra el daño epidérmico que se observó a partir de la dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, mientras que la inflamación aguda y subaguda se presentó a partir de 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. No se observaron alteraciones macroscópicas ni microscópicas en los órganos blanco.

TABLA 8

Evaluación histopatológica de los sitios tratados con la Peroxisomicina A₁ vía subcutánea

Dosis $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Ulceración	Inflamación			Epidermis
		Aguda	Subaguda	Crónica	Daño
5	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0.1	0
60	0	0	0	0.2	0.5
70	0	0	0	0.3	0.8
80	0	0.1	0.1	0.4	1.1
90	0	0.2	0.1	0.6	1.4
100	0	0.2	0.1	0.6	1.9
CONTROL	0	0	0	0	0

3.4 SENSIBILIZACIÓN

A nivel macroscópico se observó un moderado eritema y edema. Las lecturas obtenidas con la última administración de la sustancia fueron mayores comparadas con aquellas de las primeras administraciones (Figuras 20 y 21).

A nivel histopatológico las áreas control no mostraron cambios en la epidermis. En cambio, en la dermis se identificó un infiltrado de predominio perivascular compuesto de eosinófilos y linfocitos. Además, se manifestó edema y dilatación vascular (Figura 22).

Las áreas tratadas con la Peroxisomicina A₁ presentaron espongiosis a nivel de la epidermis, mientras que en la dermis superficial media se observó necrosis, así como formación de microabscesos compuestos de eosinófilos, polimorfonucleares y escasas células plasmáticas (Figura 23). El infiltrado se dispuso alrededor de arteriolas de pequeño calibre y anexos cutáneos (Figura 24). Además, se denotó una disminución importante del glucógeno en las fibras musculares de la piel. Por otra parte, no se observaron alteraciones macroscópicas ni microscópicas en los órganos blanco.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 20

Fotografía de la piel de conejo con administración ID del vehículo 24 horas después.

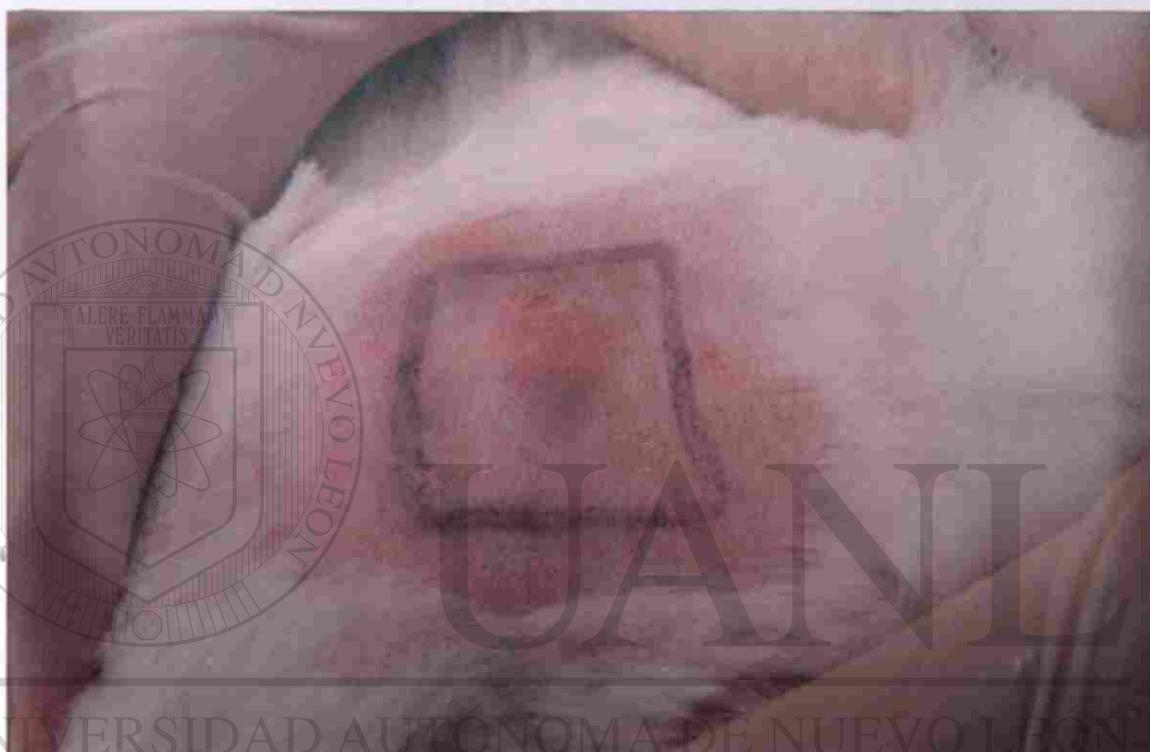
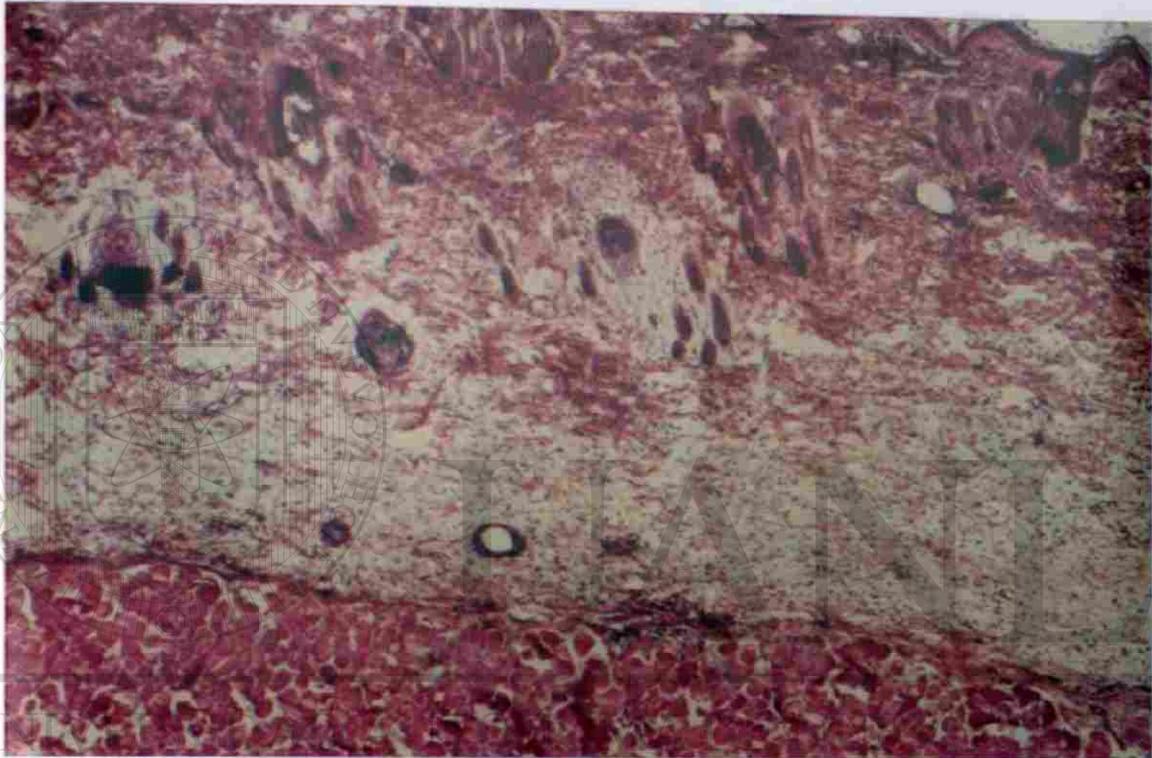


Figura 21

Fotografía de la piel de conejo con administración ID de Peroxisomicina A₁

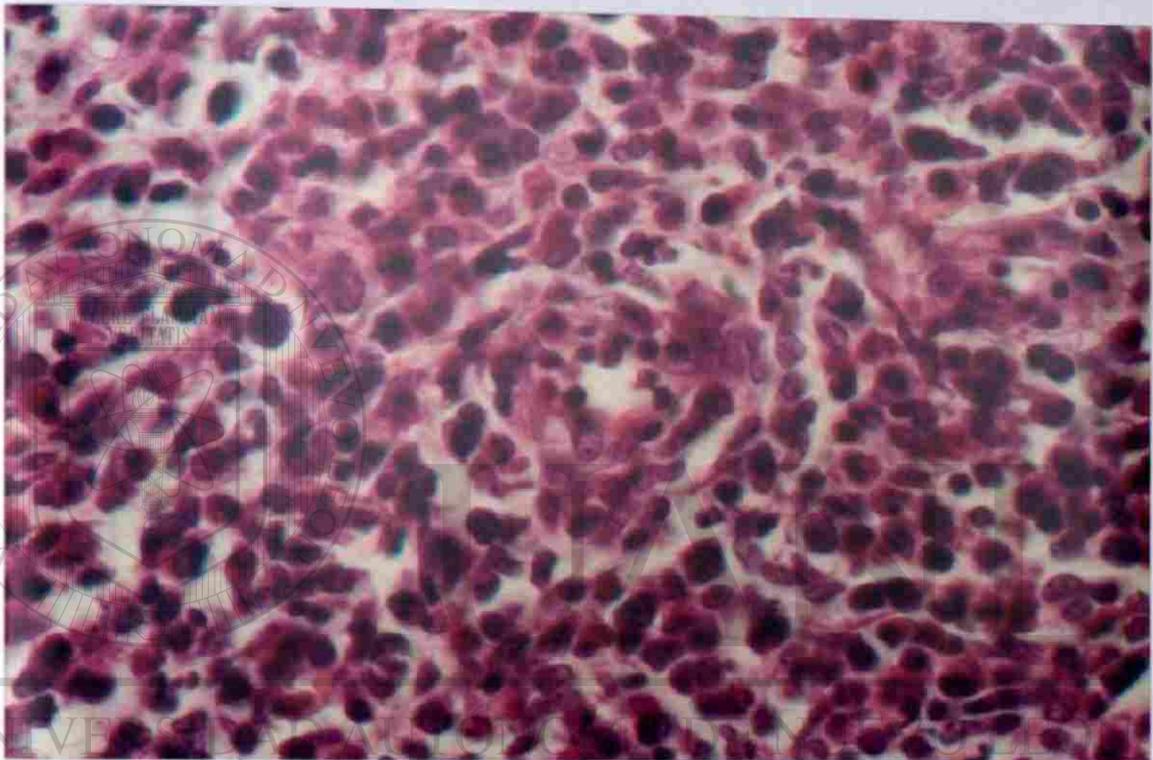
24 horas después.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS **Figura 22**

Corte de piel control con administración ID del vehículo.

Se observa un discreto edema. H y E 20X.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
Figura 23

Corte de piel con administración ID de Peroxisomicina A₁ al 1/1000. Se observa formación de microabscesos con PMN, eosinófilos y daño vascular.

H y E 40 X.

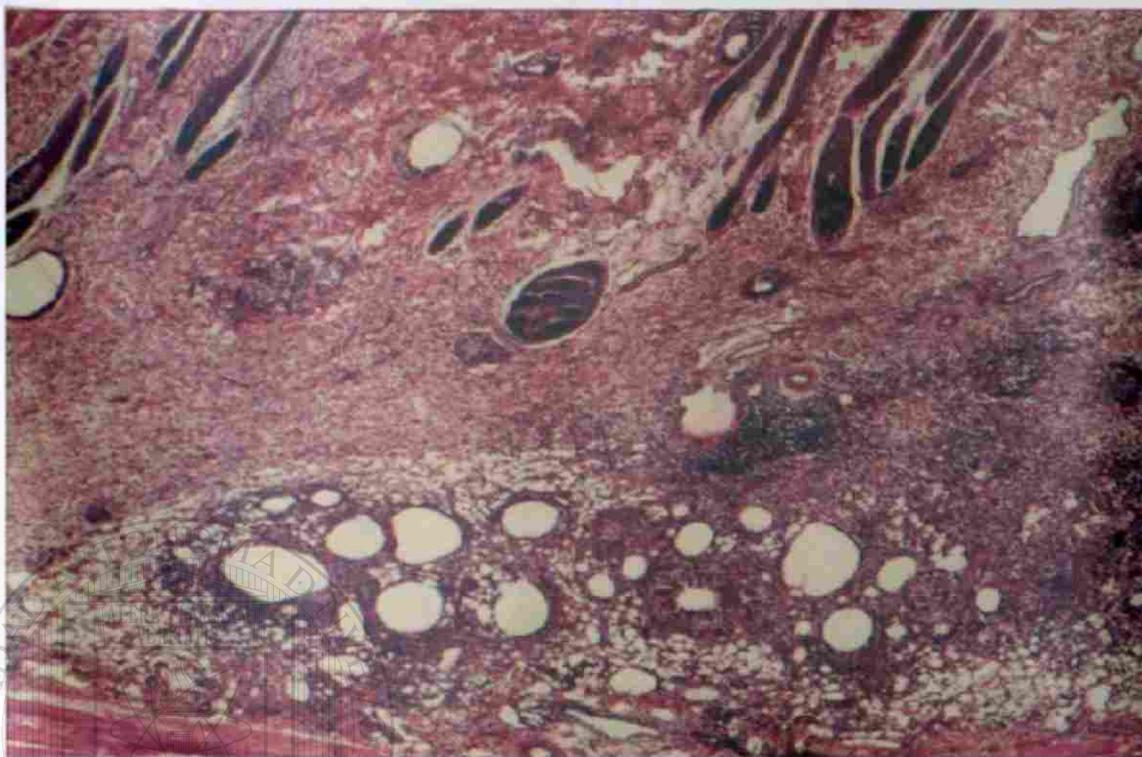


Figura 24

Corte de piel con administración ID de Peroxisomicina A₁ al 1/1000.

Se observa infiltrado inflamatorio agudo perivascular y perianexial. H y E 20X.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.5 FOTOTOXICIDAD

A nivel macroscópico, la exposición a luz ultravioleta no ocasionó eritema en la piel no tratada del conejo, 24 horas después de la irradiación. Las áreas de la piel tratadas con las soluciones de la Peroxisomicina A₁ expuestas o no a la radiación no desarrollaron reacciones de irritación,

y fueron cualitativamente similares a las áreas control, tanto en el área radiada como en la no radiada que sólo recibieron el vehículo. En las áreas tratadas con 8-MOP con exposición a la luz ultravioleta se manifestó un intenso eritema y edema (Figuras 25 y 26).

Los hallazgos histopatológicos en las áreas de piel tratadas con la Peroxisomicina A₁ al 1 y 3%, tanto radiadas como no radiadas, mostraron cambios similares a los controles negativos, caracterizados por una discreta espongiosis y edema de la dermis superficial y media (Figuras 27 y 28).

Con la solución al 9%, tanto radiada como no radiada, se observó un moderado infiltrado mononuclear perivascular, activación de fibroblastos y fibras musculares con disminución importante del glucógeno. Por otro lado, las áreas tratadas con 8-MOP con exposición a luz ultravioleta mostraron

cambios significativos a las 72 horas, caracterizados por espongiosis, eritema, exfoliación de la capa superficial de la epidermis, regeneración en el epitelio con pseudoestratificación e infiltrado inflamatorio agudo (Figura 29).

No se observaron alteraciones macroscópicas ni microscópicas en los órganos blanco.



®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS **Figura 25**

Fotografía de la piel de conejo expuesto a la administración vía tópica de las diferentes soluciones de la Peroxisomicina A₁, vehículo y 8-MOP 24 horas después de la exposición a la luz UV.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS **Figura 26**

Fotografía de la piel de conejo expuesto a la administración vía tópica de la Peroxisomicina A₁ al 9%, vehículo y 8-MOP 24 horas después de la exposición a la luz UV.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS **Figura 27**

Corte de piel control sin exposición a la luz UV y con administración vía tópica del vehículo. Se observa discreto edema y espongiosis. H y E 20X.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 28

Corte de piel con aplicación vía tópica de Peroxisomicina A₁ al 1%.

Se observa discreto edema y espongiosis. H y E 20 X.

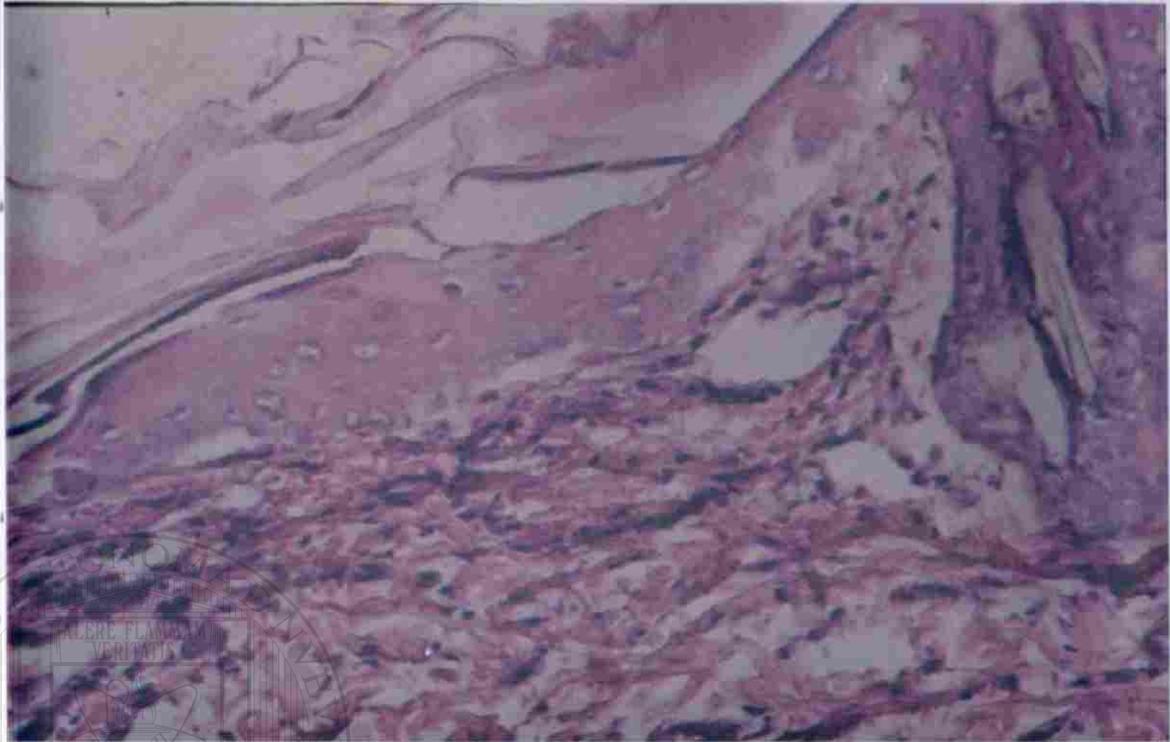


Figura 29

Corte de piel con aplicación vía tópica de 8-MOP al 1%. Se observa reactividad del epitelio con espongiosis, infiltrado inflamatorio agudo y edema de la capa basal. H y E 20X.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.6 FOTOPIGMENTACIÓN

A nivel macroscópico, las áreas de piel tratadas con las soluciones de la Peroxisomicina A₁ expuestas o no a la radiación no desarrollaron reacciones de fotopigmentación y fueron cualitativamente similares a las áreas control

tanto en el área radiada como en la no radiada, que sólo recibieron el vehículo. En las áreas tratadas con 8-MOP (control positivo) con exposición a la luz UV, se observó un intenso eritema, edema y pigmentación. La reacción de fotopigmentación fue precedida de eritema.

A nivel histopatológico se llevaron a cabo cambios escasos y similares a los controles, caracterizados por discreta espongirosis y edema de la dermis (Figura 30). Con la solución al 9% tanto radiada como no radiada, se manifestó un moderado infiltrado mononuclear perivascular, activación de fibroblastos y fibras musculares con disminución importante del glucógeno.

Las áreas con 8-MOP mostraron daño en la epidermis caracterizado por edema, fibrosis perianexial y necrosis individual de células. Además, se observó un incremento en la capa granular, hiperplasia discreta de melanocitos, detritus celulares subcorneales y fibrosis (Figuras 31 y 32). Tampoco se produjeron alteraciones macroscópicas ni microscópicas en los órganos blanco.

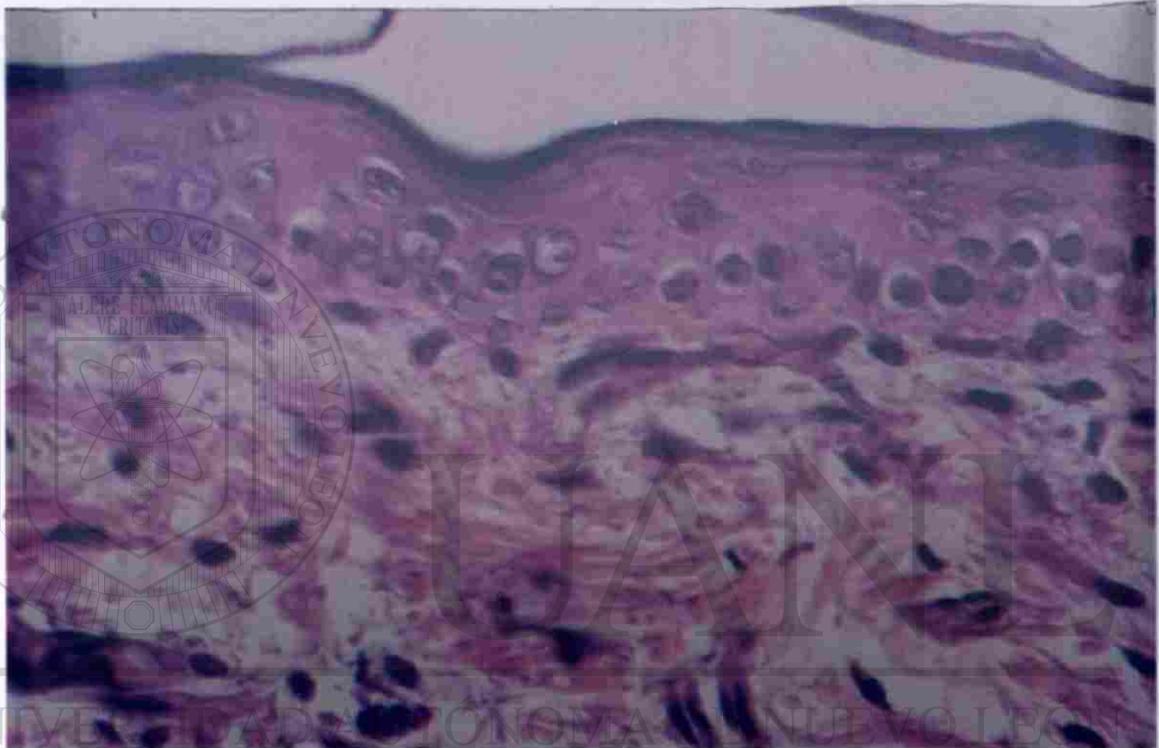


Figura 30

Corte de piel control con administración vía tópica de la Peroxisomicina A₁ al 9%. Se observa discreto edema y espongiosis. H y E 20X.

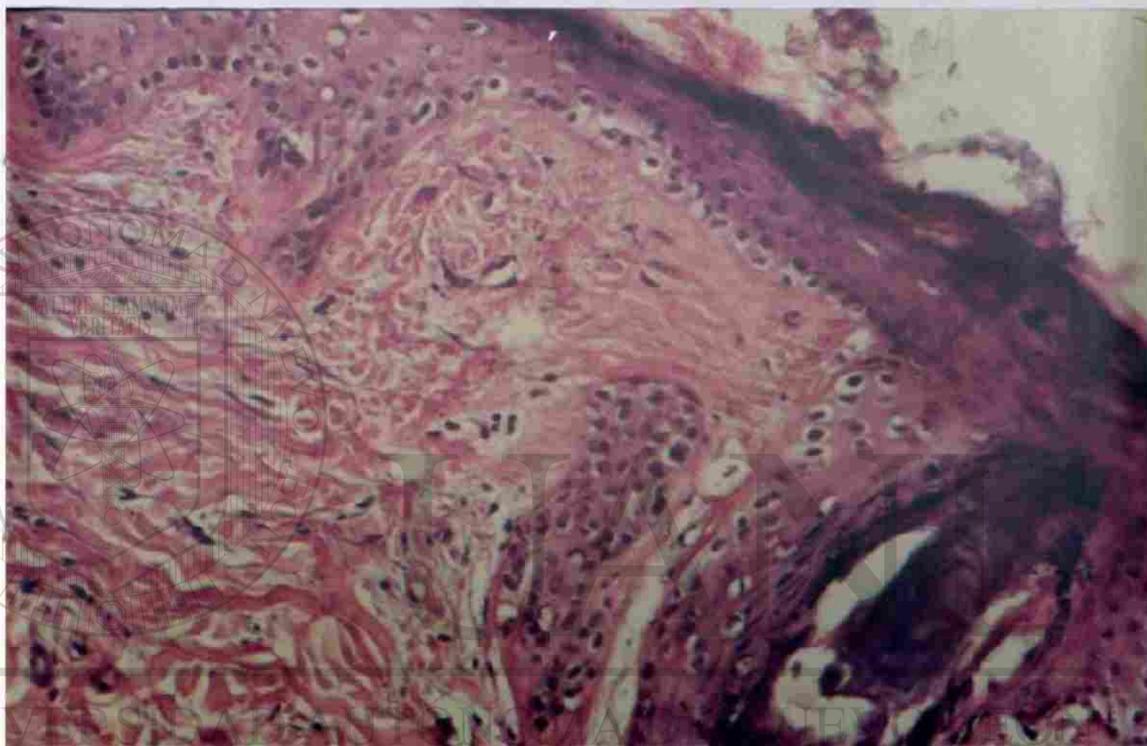


Figura 31

Corte de piel con aplicación vía tópica de 8-MOP al 1%. Se observa hiperplasia melanocítica. H y E 20 X.

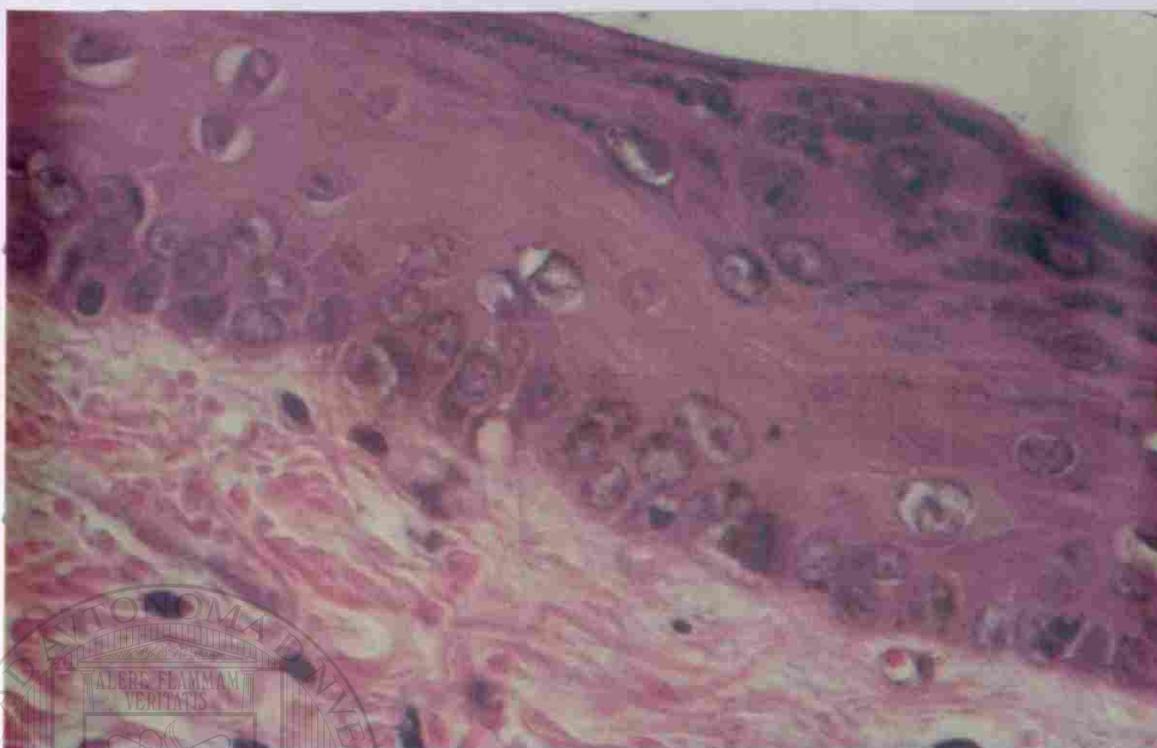


Figura 32

Corte de piel con aplicación vía tópica de 8-MOP al 1%. Se observa incremento en la producción de melanina y queratinocitos pigmentados.

H y E 40X.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En todos los estudios de toxicidad dérmica no se encontró diferencia significativa entre el área control con administración del vehículo y las áreas de aplicación de la Peroxisomicina A₁ con una $p > 0.001$.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

El presente trabajo representa una investigación sistemática *in vivo* de la irritación en la piel y del potencial tóxico de la Peroxisomicina A₁ administrado por vía tópica.

En los últimos 20 años, se han empleado diversos agentes quimioterapéuticos aplicados tópicamente en la piel, ya sea sólo o en combinación con otras formas de terapia. Por ejemplo, la mostaza nitrogenada se utilizó tópicamente en el tratamiento de la micosis fungoide por Haserick y cols⁽⁷¹⁾. Así mismo, el 5-Fluorouracilo (5-FU) ha demostrado su efectividad administrado vía tópica en pacientes con lesiones precancerosas ⁽⁷²⁾. Este hecho ha sido confirmado por Dillaña y cols.⁽⁷³⁾. Además, la aplicación tópica de agentes antineoplásicos como la Lomustina ⁽⁷⁴⁾, Mecloretamina ⁽⁷⁵⁾ y 5-FU ⁽⁷²⁾ han sido empleados satisfactoriamente en el tratamiento de la psoriasis.

Por tal razón, nos pareció importante conocer la respuesta tóxica cutánea en piel por aplicación tópica de la Peroxisomicina A₁ y se utilizó para ello pruebas convencionales de toxicidad cutánea.

En este trabajo se utilizó la Peroxisomicina A₁ que cumplió con los parámetros de calidad establecidos por el Departamento de Farmacología y Toxicología (Tabla 4) que consideran el valor de la pureza química y la actividad biológica.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.1 TOXICIDAD TÓPICA

El método modificado de Draize⁽²⁵⁾ que se utilizó en este trabajo es útil gracias a que permite distinguir entre sustancias químicas que son consideradas irritantes severos o moderados de aquellas que representan poco o ningún potencial irritante para el hombre. Así mismo, la técnica de dilución que se empleó, resultó adecuada para determinar la concentración no irritante de la Peroxisomicina A₁ y de esta manera reducir el riesgo de irritación de futuros estudios en el humano.

En relación al valor encontrado del Índice de Irritación Primaria (IIP) de 0.3 ± 0.1 , la Peroxisomicina A₁ resultó ser una sustancia no irritante. En la Tabla 9 se muestra el Índice de Irritación Primaria de la sustancia en cuestión y de otras sustancias antineoplásicas que han sido estudiadas por diversos autores bajo este mismo método ⁽²⁵⁾. Así mismo, la Ley Federal de Sustancias Peligrosas de los Estados Unidos de Norteamérica (FHSA) especifica que un compuesto es considerado no irritante peligroso si su IIP en el conejo es menor de 5 y potencialmente irritante peligroso si su IIP es mayor de 5. Por lo tanto, de acuerdo a este criterio la Peroxisomicina A₁ sería considerada una sustancia no irritante. Pero cabe destacar que otras sustancias, como los blanqueadores a base de hipoclorito de calcio,

que podría juzgarse como seguras a los ojos de varios autores (3,4), resultan como irritantes severos al observar los resultados en el hombre. Por otra parte, la FHSA define a una sustancia como corrosiva si causa una destrucción visible o irreversible en el tejido en el sitio de contacto. Aunque el significado del término "destrucción visible" no esté claro, en términos generales, la destrucción visible podría significar la muerte de células que se traducen en un esfacelamiento de la superficie de la epidermis.

Una de las diferencias más importantes en los estudios de irritación es que en las pruebas realizadas en animales se utilizan sitios con abrasión, lo cual no pueden ser realizados en el hombre. El uso de los sitios de abrasión se basa en el procedimiento original del método de Draize (18), que fue diseñado originalmente para evaluar medicamentos de uso tópico y cosméticos sobre piel dañada.

En este trabajo no se observó irritación en las áreas control de la piel del conejo con la aplicación del vehículo, lo que nos indica una adecuada técnica y rotación de los sitios de aplicación. A nivel histopatológico el daño epidérmico y dérmico se clasificó como leve a las concentraciones de 1 y 3% y como moderado al 9%. Por otra parte, en estudios realizados por Bermúdez y cols (76) en monos *Cynomolgus (Macaca fascicularis)* encontraron depleción

del glucógeno en las fibras musculares del corazón. Es importante mencionar, que esta depleción del glucógeno también fue observada en las fibras musculares de la fascia superficial de la piel en todas las pruebas realizadas en este estudio.

TABLA 9

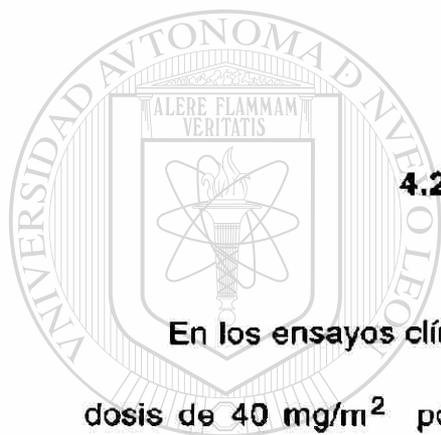
Comparación del índice de irritación primaria (IIP) de varias sustancias antineoplásicas y la Peroxisomicina A₁

Compuesto	Conc.	IIP	Compuesto	Conc.	IIP
Cicloheximida	9%	4.1	Vincristina	9%	3.1
	3%	3.8		3%	1.9
	1%	4.3		1%	0.7
	0a	0.0		0b	0.2
	$X = 4.1 \pm 0.2$			$X = 1.9 \pm 1.2$	
Adriamicina	9%	1.5	5 - Fluorouracilo	9%	0.7
	3%	1.2		3%	0.9
	1%	0.9		1%	0.5
	0b	0.0		0a	0.1
	$X = 1.2 \pm 0.3$			$X = 0.7 \pm 0.2$	
Ciclofosfamida	9%	0.7	Peroxisomicina A ₁	9%	0.5
	3%	0.2		3%	0.3
	1%	0.4		1%	0.2
	0a	0.2		0c	0.0
	$X = 0.4 \pm 0.2$			$X = 0.3 \pm 0.1$	
6 - Tioguanina	9%	0.3	6 - Mercaptopurina	9%	0.0
	3%	0.2		3%	0.0
	1%	0.2		1%	0.0
	0d	0.1		0a	0.0
	$X = 0.3 \pm 0.1$			$X = 0.0$	

- a: Metil celulosa al 2%
 b: Agua destilada
 c: Etanol 96%
 d: Metil celulosa al 1%

Phillips, L., y cols., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 21, 369-382. (1972).⁽²⁴⁾

Con la Peroxisomicina A₁ el infiltrado inflamatorio sólo se observó con la concentración del 9% y fue de predominio mononuclear. Murphy y cols (25) han observado alteraciones macroscópicas y microscópicas en órganos potencialmente considerados como órganos blanco como el hígado, las que han sido atribuidas a la presencia de agentes patógenos como *Coccidia* hepática (*Ermeria stiedae*) y/o a céstodos (*Taenia sp.*). En este estudio no se encontró alteración de ninguna especie.



4.2 TOXICIDAD SUBCUTÁNEA

En los ensayos clínicos en el momento actual, se han llevado a cabo con dosis de 40 mg/m² por vía IV, lo cual nos da una dosis de 4 µg/cm² de superficie corporal. Sin embargo, en esta prueba se aplicaron dosis desde 5 hasta 100 µg/cm² y no se observó toxicidad sistémica. ®

Con la administración subcutánea el daño fue proporcional a la dosis. Con dosis superiores a 50 µg/cm², se observaron alteraciones en los vasos sanguíneos los que presentaron trombosis y necrosis de los anexos epidérmicos, seguido de una reactividad vascular con lesión a la musculatura y anexos. Con las concentraciones de 80 a 100 µg/cm² se observó trombosis

vascular en la dermis superficial, media y profunda, con moderado daño muscular y necrosis epidérmica de tipo isquémico. Así pues, los daños se clasificaron como leves con la dosis de 5 a 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, como moderados con la dosis de 60 a 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y como severos con la dosis de 80 a 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

4.3 SENSIBILIZACIÓN

La mayoría de las sustancias químicas de uso común tienen la capacidad de causar sensibilización en la piel. Consecuentemente, es importante conducir una evaluación completa y precisa del riesgo cuando se anticipa que alguna sustancia química entrará en contacto con la piel humana. Tal evaluación de riesgo debe relacionar la naturaleza y el grado de la exposición dérmica con la potencia sensibilizante de la sustancia química.

Los resultados en esta prueba mostraron un infiltrado alrededor de arteriolas de pequeño calibre y anexos cutáneos, compuesto por eosinófilos, polimorfonucleares y escasas células plasmáticas. Por otro lado, no se encontraron macrófagos dérmicos, que comunmente se manifiestan durante la sensibilización tipo retardada (77, 78, 79).

Hasta el momento, no existen reportes en la literatura acerca de la presencia de mastocitos y linfocitos con la administración de la Peroxisomicina A₁, y sólo hay algunos donde se menciona la presencia de infiltrado linfocitario y fagocitos en nervios periféricos y músculo esquelético de cabras (41).

4.4 FOTOTOXICIDAD Y FOTOPIGMENTACIÓN

La interacción de la luz y sustancias químicas para provocar reacciones en la piel, es un proceso muy complejo que da como resultado cambios fisiológicos tanto en la capa dérmica como la epidérmica. Así pues, la radiación ultravioleta es conocida por ser el agente causal que genera la mayor parte de los cambios crónicos en la piel, sin embargo, el grado y naturaleza de las reacciones fototóxicas que contribuyen en este proceso no están totalmente dilucidadas.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El procedimiento descrito en este trabajo fue empleado satisfactoriamente para la detección de fototoxicidad de la Peroxisomicina A₁ en conejos Nueva Zelanda.

Con la administración de la Peroxisomicina A₁ a concentraciones al 1, 3 y 9% no se observaron efectos de fototoxicidad ni de fotopigmentación. En esta prueba se utilizó el 8-MOP en uno de los lugares de prueba disponibles, ya que prácticamente todas las investigaciones biológicas de este tipo lo utilizan como control positivo (13,14, 15, 16). Este produjo una evidente reacción fototóxica que nos sirvió para establecer la capacidad de la fuente luminosa de generar respuestas fototóxicas.

Por otra parte, el vehículo puede influenciar de alguna forma la intensidad de la reacción, como ha sido demostrado por Marzully y Maibach (80), y por Kaidbey y Kligman (81) en el caso del 5-metoxipsoraleno. Cabe mencionar que el vehículo que se usó en este trabajo no ocasionó problemas en la diferenciación entre un compuesto fototóxico y no fototóxico.

Así mismo, el método que se utilizó para remover el pelo (rebajar y después rasurar) de la región dorsal de los conejos, no afectó los resultados. Además, no se emplearon cremas depiladoras o algún otro producto que pudiera interferir con la evaluación de éstas.

Con el fin de asegurar la reproducibilidad de este estudio, se tomó en cuenta las características completas de la luz con las que se trabajó, así como también las condiciones de irradiación, entre ellas la duración de la

exposición, la distancia entre la lámpara y la piel y la energía liberada. En este punto cabe destacar la importancia del tiempo de irradiación, ya que existe una estrecha correlación entre la severidad de la fototoxicidad y el incremento de la duración de la irradiación ultravioleta (82, 83).

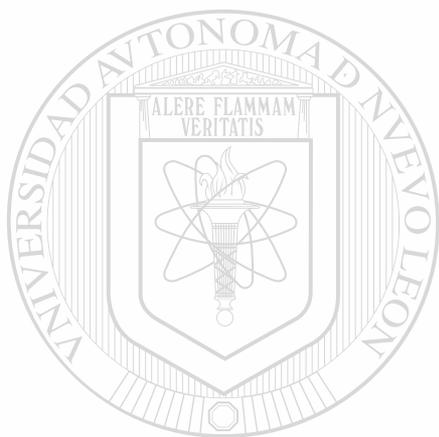
Los resultados obtenidos en este estudio con el 8-MOP a nivel histopatológico fueron similares a aquellos previamente reportados por Weil y cols (12) y Forbes y cols (13) los que consistieron en eritema, exfoliación de la capa superficial de la epidermis e infiltración de neutrófilos.

Por otro lado, resulta interesante mencionar que no se detectó la Peroxisomicina A_1 en la sangre de los conejos en ninguna de las pruebas realizadas. Además, debido a que no se encontraron alteraciones hepáticas,

pulmonares y renales, considerados como órganos blanco, se puede afirmar que por esta vía y a las dosis administradas no se produce daño sistémico.

Cabe mencionar que si bien la Peroxisomicina A_1 es una sustancia fotosensible, la ausencia de actividad fototóxica no puede explicarse aún hasta el momento de la elaboración de este trabajo, debido a que todavía no se han identificado los posibles metabolitos o fotoproductos de dicha sustancia. Sin embargo, la seguridad de que el fotoproducto se encuentre libre de características fototóxicas en la piel, será una importante consideración en el

total de las evaluaciones de la seguridad de esta sustancia en particular.
El esclarecimiento de este problema, pudiera ser la base de estudios
subsecuentes en la terapia fotodinámica del cáncer de la piel.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

En todas las pruebas realizadas de toxicidad dérmica con la Peroxisomicina A₁, se observó que la respuesta fue dosis-dependiente.

En todas las pruebas realizadas a nivel histológico se demostró una disminución importante del glucógeno en las fibras musculares de la piel.

La Peroxisomicina A₁ no produjo daño sistémico en los órganos blanco como hígado, pulmón y riñón tanto a nivel macroscópico como microscópico.

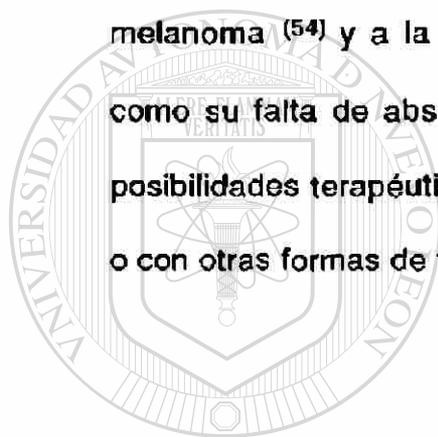
En todas las pruebas realizadas no se detectó la Peroxisomicina A₁ en sangre. Esto podría indicar que esta sustancia no se absorbe por piel a las dosis administradas.

La Peroxisomicina A₁ administrada vía tópica no produjo efectos de fototoxicidad ni de fotopigmentación.

De acuerdo al Índice de Irritación Primaria (IIP) que se obtuvo, se consideró a la Peroxisomicina A₁ como una sustancia no irritante.

La Peroxisomicina A₁ administrada vía intradérmica produjo ligera sensibilización.

Debido a la alta toxicidad selectiva encontrada en el cultivo de células de melanoma ⁽⁵⁴⁾ y a la baja toxicidad que mostró en su aplicación tópica, así como su falta de absorción por piel, ha despertado un gran interés por sus posibilidades terapéuticas en el tratamiento del cáncer de piel al utilizarse sólo o con otras formas de tratamiento.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

REFERENCIAS

- 1.- Abreu, L.M. Introducción a la medicina interna. 1a. Edición. Ed. Méndez Cervantes. 151-158. (1989).
- 2.- Brown, V.K.H. A comparison of predictive irritation tests with surfactants on human and animal skin. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 22, 411-420. (1971).
- 3.- Rieger, M.M. and Batista, G.W. Some experiences in the safety testing of cosmetics. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 15, 161-172. (1964).
- 4.- Kligman, A.M. and Wooding, W.M. A method for the measurement and evaluation of irritants on human skin. *J. Invest. dermatol.* 49, 78-80. (1967).
- 5.- Clark, W.G., Brater, D.C. and Johnson, A.R. Farmacología clínica. 6a. Edición. Ed. Médica Panamericana. 22 - 33. (1991).
- 6.- Goodman Gilman, A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9a. Edición. Ed. Interamericana. 1697 - 1702. (1996).

- 7.- Weil, C.S. Guidelines for experiments to predict the degree of safety of a material for man. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 21, 194 - 199. (1972).
- 8.- Weil, C.S. Abnormal values in control groups during repeated-dose toxicologic studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 14, 335 - 339. (1969).
- 9.- Kinmont, P.C. Skin reactions to cosmetics preparations. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 15, 3-32. (1964).
- 10.- Skog, E. Incidence of cosmetic dermatitis. *Contact Dermatitis.* 6, 449-451. (1980).
- 11.- Menkart, J. An analysis of adverse reactions to cosmetics. *Cutis.* 24, 599-662. (1979).
- 12.- Weil, C.S. and Scala, R.A. Study of intra and interlaboratory variability in the results of rabbit eye and skin irritation tests. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 19, 276 - 360. (1971).

- 13- Forbes, P.D., Davies, R.E. and Urbach, F. Phototoxicity and photocarcinogenesis: comparative effects of anthracene and 8-methoxypsoralen in the skin of mice. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 1,: 303-306. (1976).
- 14.- Katzung, B.G. *Farmacología básica y clínica*. 5a. Edición. Ed. Manual modemo. 1095-1114. (1994).
- 15.- Nilsson, R., Maurer, T. and Redmond, N. A standard protocol for phototoxicity testing. Results from an interlaboratory study. *Contact dermatitis.* 28, 285-290. (1993).
- 16.- Marzulli, F.N. and Maibach, H.I. Phototoxicity (photoirritation) of topical and systemic agents. *Dermatotoxicology.* 1, 431-440. (1987).
- 17.- Maguire, H.C. The bioassay of contact allergens in the guinea pig. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 24, 151-162. (1973).
- 18- Draize, J.H., Woodard, G. and Calvery, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 82, 377-390. (1944).

- 19 Landsteiner, K. and Jacobs, J. Studies on sensitization of animals with simple chemical compounds. *J. Exp. Med.* 61, 643-656. (1935).
- 20.- Buehler, E.U. A new method for detecting potential sensitizers using the guinea pig. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 6, 341 - 352. (1964).
- 21.- Carter, R.O. and Griffith, J.F. Experimental bases for the realistic assessment of safety of topical agents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2, 60-73. (1965).
- 22.- Davies, R.E., Harper, K.H. and Kynoch, S.R. Interspecies variation in dermal reactivity. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 23, 371 - 381. (1972).
- 23- Marzulli, F. and Maguire, H.C. Usefulness and limitations of various guinea pig test methods in detecting human skin sensitizers - validation of guinea pig tests for skin hypersensitivity. *Fd. Chem. Toxic.* 20, 67-74. (1982).
- 24- Philips, L., Steinberg, M., Maibach, H.I. and Akers, W.A. A comparison of rabbit and human skin response to certain irritants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 21, 369-382. (1972).

25- Murphy, J.C., Watson, E.S., Wirth, P.W., Skierkowski, P., Folk, R.M. and Peck, G. Cutaneous irritation in the topical application of 30 antineoplastic agents to new zealand white rabbits. *Toxicology*. 14, 117-130. (1979).

26.- Wolven, A. and Levenstein, I. Techniques for evaluating dermal irritation. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 18, 199 - 203. (1967).

27.- Csaky T.Z. Introducción a la farmacología general. 1a. Edición. Ed. Salvat. 205 - 212. (1969).

28.- Gilman, M.R., Evans, R.A. and DeSalva, S.J. The influence of concentration, exposure, duration and patch occlusivity upon rabbit primary dermal irritation indices. *Drug Chem. Toxicity*. 1, 391 - 400. (1978).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

29.- Roudabush, R.A., Terhaar, C.J., Fassett, D.W. and Dziuba, S.P. Comparative acute effects of some chemicals on the skin of rabbits and guinea pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 7, 559 - 565. (1965).

30- Shah, V.P. and Maibach, H.I. Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration. Plenum Press New York and London 333-349. (1993).

31- Bartek, M.J., La Budde, J.A. and Maibach, H.I. Skin permeability *in vivo*: Comparison in rat, rabbit, guinea pig and man. *J. Invest. Dermatol.* 58, 114-123. (1972).

32.- Nixon, G.A., Tyson, C.A. and Wertz, W.C. Interspecies comparisons of skin irritancy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31, 481 - 490. (1975).

33- Fernández Nava, R. Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* (*Rhamnaceae*) en México. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Ser. Bot.* 63, 1-23. (1992).

34- Arrellano, E., Mendoza, J.F. y Domínguez, F.J. Intoxicación por *Karwinskia johnstonii* Fernández: Estudio de 12 pacientes. *Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx.* 51, 105-112. (1994).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



35- Martínez, M. Tullidora. In: *Las plantas medicinales de México*. 1a. Edición. Ed. Botas. 501-504. (1944).

36- Del Pozo, E.C. Los efectos paralizantes de la tullidora. Estudios clínicos y experimentales. *Gac. Méd. Méx.* 95, 179-182. (1965).

- 37- Escobar, A. y Nieto, D. Aspectos neuropatológicos de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Estudio experimental. *Gac. Méd. Méx.* 95, 163-177. (1965).
- 38- Puértolas, M.A., Nava, O., Medina, H.A., López, F.X. y Oyervides, J.F. Polirradiculoneuritis por *Karwinskia humboldtiana*. Informe de seis casos. *Rev. Méd. I.M.S.S.* 22, 25-27. (1984).
- 39- Clavijero, F.X. Historia de la Antigua o Baja California. 1a. Edición. Ed. Porrúa México. 31-36. (1982).
- 40- Castillo-Nájera, F. Contribución al estudio de la parálisis tóxica. Un envenamamiento colectivo con tullidora. Memoria del V Congreso Médico Mexicano, México, D.F. Dirección de Talleres Gráficos. 1, 240-244. (1920).
- 41- Charlton, K. and Pierce, K.A. Neuropathy in goats caused by experimental coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*) poisoning. *Path. Vet.* 7, 435-447. (1970).

42- Escobar, A. y Nieto, D. Aspectos neuropatológicos de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Estudio experimental. *Gac. Méd. Méx.* 95, 163-177. (1965).

43- Bustamente, J., Olvera, J. y Nieto, L. Intoxicación fatal por tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). Comunicación de un caso. *Gac. Méd. Méx.* 114, 241-244. (1978).

44- Weller, R., Mitchel, J. and Daves, D. Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*) toxins. En: Spencer P. Schaumburg H. Ed. Experimental and clinical neurotoxicology. Baltimore: Williams and Wilkins, 336-340. (1980).

45- Dreyer, D.L., Arai, I., Bashman, C.D., Anderson, W.R., Smith, R.G. and Daves, G.O. Toxins causing non inflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation. *J. Am. Chem. Soc.* 97, 4985-4990. (1975).

46- Waksman, N. and Ramírez, R. Isolation of a new dimeric anthracenone from *Karwinskia parvifolia*. *Rev. Latinoam. Quím.* 23/1 and 22/4, 25-27. (1992).

- 47- Rivas G., Verónica. Estudio químico de los extractos semipolares de frutos de *K. parvifolia* y *K. johnstonii*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, U.A.N.L. Monterrey N.L. (1995).
- 48- Sepúlveda, J., Van Der Klei, I., Kaiser, I., Piñeyro, A., Harder, W. and Veenhuis, M. Studies on the effect of T-514 on the integrity of peroxisomes in methyltrophic yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* 91, 207-212. (1992).
- 49- Salazar, M.L., Piñeyro, A. and Waksman, N. A reverse phase HPLC method for quantification of peroxisomicine and other anthracenonic compounds. *J. Liq. Chrom. and Rel. Technol.* 19, 1391-1403. (1996).
- 50- Martínez V., Laura. Estudio de las propiedades físico-químicas de toxinas aisladas de *Karwinskia humboldtiana*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, U.A.N.L. Monterrey N.L. (1990).
- 51- Bermúdez, M.V., Martínez, F.J., Salazar, M.E., Waksman, N. and Piñeyro, A. Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) in rat, guinea pig, hamster and dog. *Toxicon.* 30, 1493-1496. (1992).

- 52- Bermúdez, M.V. Comunicación Personal.
- 53- Loomis, T. Numbers in Toxicology. In: T. Loomis, Essentials of Toxicology, Lea and Febiger, Philadelphia. 2, 13-28. (1978).
- 54- Piñeyro, A., Martínez, L.E. and González, R. *In vitro* selective toxicity of toxin T-514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumor cell lines. *Toxicology*. 92, 217-227. (1994).
- 55- Piñeyro López, A. Pharmazeutisch brauchbare Naphthalin und Anthracenderivate. Pharmaceutically applicable naphthaline and anthracene derivatives. Derivés de naphthaline et d'anthracene utiles comme medicamenta. *Europäisches Patenblatt*. 48/1995, 29.11. (1995).
-
- 56- Moreno, M., Vargas, R., Esquivel, D., Waksman, N. and Piñeyro, A. Effect of peroxisomicine and related anthracenones on catalase activity. *Planta Med.* 61, 337-340. (1995).
- 57- Garza, L., Torres, O. and Piñeyro, A. Effect of toxin 514 of *Karwinskia humboldtiana* on liver microsomal lipid peroxidation stimulated by Fe²⁺-ADP complexes and NADPH *in vitro*. *European Journal of Pharmacology*. 183, 1550-1551. (1990).

58- Kampschmidt, R.F. Mechanism of liver catalase depression in tumor bearing animals. *A Review. Cancer Res.* 25, 34-45. (1965).

59- Ohnuma, T., Mardia, G. and Holland, J.F. Hepatic catalase activity in advanced human cancer. *Cancer Research.* 26, 1806-1818. (1991).

60- Yasmineh, W., Parkin, J.L., Casper, J.I. and Theologides, A. Tumor necrosis factor/cachectin decreases catalase activity of rat liver. *Cancer Research.* 51, 3990-3995. (1991).

61- Garza, L., Gin, H., Acosta, D., Torres, O. and Piñeyro, A. Toxicity assessment of toxins T-514 and T-544 of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*) in primary skin and liver cell cultures. *Toxicology.* 73, 191-201. (1992).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

62- Clark, W.H. Current concepts of the biology of human cutaneous malignant melanoma. *Adv. Cancer Res.* 24, 267-275. (1977).

63- Aebi, H., Bergmeyer, U. In methods of enzymatic analysis. Academic Press, London, New York. 673-678. (1974).

- 64- Ekwall, B. and Johanson, A. Preliminary studies on the validity of *in vitro* measurement of drug toxicity using hela cells. Comparative *in vitro* cytotoxicity of 27 drugs. *Toxicology Letters*. 5, 199-210. (1980).
- 65- Guerrero, M., Piñeyro, A. and Waksman, N. Extraction and quantification of toxins from *Karwinskia humboldtiana* (tullidora). *Toxicon* 25, 565-568. (1987).
- 66.- Feldman, R. and Maibach, H.I. Percutaneous penetration of ¹⁴C hydrocortisone in man. *Arch. Dermatol.* 94, 649-651. (1966).
- 67- Baccichetti, F., Rodighiero, P., Vedaldi, D., Tamaro, M., Guiotto, A., Capozzi, A., Conconi, M.T. and Bordin, F. Photobiological activity of certain pyranocoumarin derivatives: Potential agents for the photochemotherapy of psoriasis. *Photodermatology*. 3, 261-270. (1986).
- 68.- Lynch, M.J., Raphael S.S., Mellor, L.D., Spare, P.D. and Inwood, M.J. *Métodos de laboratorio*. 2a. Edición. Ed. Interamericana. México. 1145-1167. (1984).

- 69- Spiegel, M.R. Teoría y problemas de bioestadística. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 188-198. (1989).
- 70- Leach, C. Introduction to statistics. A nonparametric approach for the social sciences. Ed. John Wiley & Sons. New York. 77-125. (1979).
- 71- Haserick, J.R., Richardson, J.H. and Grant, D.J. Percutaneous absorption of nicotinic acid and derivates. *J. Invest. Dermatol.* 35, 337-341. (1960).
- 72- Faulkson, G. and Schulz E.J. Evaluation of the toxicity of 5-fluorouracile. *Br. J. Dermatol.* 74, 229-235. (1962).
- 73- Dillaha, C.J., Jensen, G.T. and Honeycutt, W.M. Skin reactions to cosmetics preparations. *J. Dermatol.* 1, 1-10. (1966).
- 74- Peck, G.L., Guss, S.B. and Douglas, J.K. Lomustine in dermatology. *Arch. Dermatol.* 106, 106-114. (1972).
- 75- Epstein, E. and Ugel, A.R. Response of the skin to mechlorethamine. *Arch. Dermatol.* 102, 504-512. (1970).

76- Bermúdez, M.V., Tamez, V.A., Lozano, F.E., Salazar, M.E., Ancer, J., Waksman, N. and Piñeyro, A. Acute, subacute and chronic toxicity of T-514 (peroxisomycin) isolated from *Karwinskia humboldtiana* in different animal species. 34th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. San Diego, California. Julio (1993).

77- Laskin, J.D. Cellular and molecular mechanisms in photochemical sensitization: studies on the mechanism of action of psoralens.

Food Chem. Toxicol. 32, 119-127. (1994).

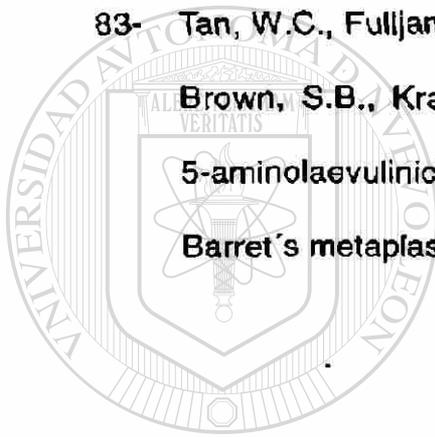
78- Cumberbatch, M. and Kimber, I. Dermal tumour necrosis factor-alpha induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans cell migration. *Immunology.*

75, 257-263. (1992).

79- Yoshida, H. and Take, M. Kinetics of eosinophils and basophils in the allergic reactions. *J. Dermatol.* 36, 496-502. (1974).

80- Marzulli, F.N. and Maibach, H.I. Perfume phototoxicity. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 21, 685-715. (1970).

- 81- Kaidbey, K. and Kligman, A. Topical photosensitizers: Influence of vehicles on penetration. *Arch. Dermatol.* 110, 868-870. (1974).
- 82- Allman, R., Cowburn, P. and Mason, M. Effect of photodynamic therapy in combination with ionizing radiation on human squamous cell carcinoma cell lines of the head and neck. *Br. J. Cancer* 83, 655-661. (2000).
- 83- Tan, W.C., Fulljames, C., Stone, N., Dix, A.J., Sheperd, N., Roberts, D.J., Brown, S.B., Krasner, N. and Barr, H. Photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid for oesophageal adenocarcinoma associated with Barret's metaplasia. *J. Photochem. Photobiol.* 53, 75-80. (1999).

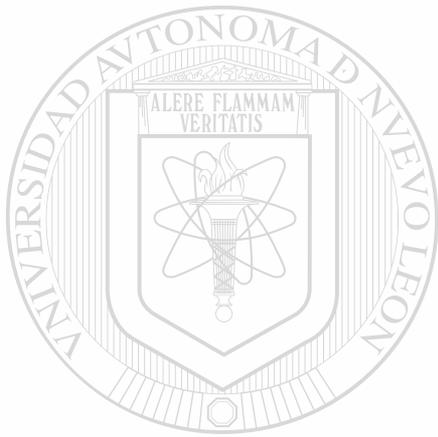


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



