

16

709



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EVALUACION DE LA CREMA DE
BENZOATO DE BENCILO EN CONEJO
(ESTUDIOS PRECLINICOS).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

LUIS ALBERTO CRUZ CASILLAS

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUBIERO LAS
DE NUESTRA SELECCION

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PRESIDENTE: M. EN C. BENITA MENDIOLA GARCIA.
VOCAL: Q.F.B. MA. ANGELICA PEREZ MORA.
SECRETARIO: M.V.Z. HECTOR A. MALAGON RIVERO.
SUPLENTE: Q.F.I. ESTELA VALENCIA PLATA.
SUPLENTE: M.C. JUAN M. GALLARDO MONTOLLA.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:
BIOTERIO DEL INSTITUTO DE FISIOLOGIA CELULAR DE LA
U.N.A.M..

SUSTENTANTE: LUIS ALBERTO CRUZ CASILLAS.
ASESOR INTERNO: Q.F.B. MA. ANGELICA PEREZ MORA.
ASESOR EXTERNO: M.V.Z. HECTOR A. MALAGON RIVERO.

A LA MEMORIA DE MI
MADRE BEDA Y MI
HERMANO GABRIEL.

A MI PAPÁ GABRIEL,
MI ABUELA ANGELINA Y
EL HERMANITO FERNANDO,
POR GUIARME CON SABIDURÍA,
AMOR Y RESPETO.

A MIS HERMANOS VICTOR
HUGO, MIGUEL ANGEL,
DULCE MARÍA, JOSE JUAN,
CARLOS ALFREDO, JAVIER
EDUARDO, Y ALMA AZUCENA
POR QUE SIEMPRE SIGAMOS
JUNTOS COMO HASTA AHORA.

**QUIERO AGRADECER EL GRAN APOYO
INCONDICIONAL Y AMISTAD DE MIS COMPAÑEROS
DE PARASITOLOGÍA (HOSPITAL GENERAL DE
MÉXICO DE LA SECRETARÍA DE SALUBRIDAD), A
QUIENES TAMBIÉN DEDICO ESTE TRABAJO: JOSÉ,
ISSAC, ARTURO, BETY Y EDGAR.**

**AGRADEZCO LA COLABORACIÓN DE LOS
DRS. BLANCA Y HÉCTOR, ASÍ COMO EL
APOYO DEL LIC. D. MATAMOROS.**

CONTENIDO

	PAGINA
INTRODUCCION.....	1
I GENERALIDADES	2
A. La Sarna	2
A.1. Tipos de sarna.....	3
A.2. Diagnóstico y tratamiento	4
B. Benzoato de bencilo	5
B.1. Propiedades físicas y químicas.....	5
B.2. Propiedades toxicológicas.....	6
C. Desarrollo de un medicamento.....	7
C.1. Farmacología preclínica	9
C.2. Farmacología clínica	11
D. Cremas	14
D.1. Definición de crema	14
D.2. Clasificación de las cremas	15
E. La piel humana.....	16
E.1. Funciones de la piel.....	16
E.2. Absorción a través de la piel y su relación con las cremas	17
F. El conejo	18
F.1. Principales usos del conejo	19
F.2. Sarna del conejo	22
G. Inmunodepresión.....	23
H. Toxicología del lindano	25
II FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	26

III	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
IV	OBJETIVOS	29
	Objetivo general	29
	Objetivos particulares.....	29
V	HIPOTESIS.....	30
VI	METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	31
	A) Material, equipo y reactivos.....	31
	B) Métodos.....	33
VII	RESULTADOS.....	39
VIII	ANALISIS DE RESULTADOS	45
IX	CONCLUSIONES	47
X	BIBLIOGRAFIA.....	48
	ANEXO 1	51
	ANEXO 2.....	53
	GLOSARIO.....	54

INTRODUCCION

Las enfermedades, nuevas o ya presentes, siempre llevan consigo la necesidad del hombre para desarrollar alguna cura, la cual es en nuestros días principalmente a base de medicamentos.

El desarrollo de un medicamento consiste en una serie de pasos, muy complejos algunos, conforme a las regulaciones de los organismos responsables del control de los medicamentos de cada país. Estas organizaciones piden que el medicamento sea eficaz y seguro, para poder ser usado por el hombre; por tanto se ha de probar previamente en modelos "in vitro" o en animales que se acerquen al comportamiento que pudiera existir en el hombre.

Es así el caso de la crema de Benzoato de Bencilo, que se desarrolla en la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", cuyo propósito clínico es para emplearse en el tratamiento de la sarna, que es una enfermedad parasitaria que afecta a la piel.

Por tanto, el presente trabajo se encamina a los estudios preclínicos de dicha crema, sobre el modelo animal (conejos), para probar su eficacia y seguridad comparándola con muestras comerciales.

I. GENERALIDADES.

A. La Sarna.

Una enfermedad parasitaria que aparece unicamente en la piel es la sarna o escabiasis, que también es definida como dermatosis puriginosa, que tiende a diseminarse por todo el cuerpo con predominio en pliegues y genitales; se caracteriza por pápulas, costras hemáticas, pequeñas vesículas y túneles, es causada, en el hombre, por el ácaro *Sarcoptes scabiei* var *hominis*, que es un parásito obligado en el hombre.

Una vez que el parásito se deposita en la capa córnea de la piel humana, después de un período de incubación de 2 a 6 semanas, aunque algunos autores afirman que solamente se necesitan de 1 a 2 semanas para desarrollar el ciclo vital por completo (1), se presenta una erupción generalizada por un fenómeno de sensibilidad que estimula la formación de anticuerpos IgE. En la sarna de Noruega se encuentran muchísimos ácaros y cifras reducidas de vitamina A, principalmente(2).

Esta enfermedad se presenta ciclicamente, originando pequeñas o grandes epidemias, se dice que suele aparecer cada 10 a 12 años y sin saberse porque declina y casi desaparece otros tantos años.

Por su alta transmisibilidad se considera una enfermedad familiar, de asilos, escuelas, cuarteles y cárceles, y ha llegado a afectar el 90% de la población de pequeños pueblos; así mismo, se ha visto que la extensión de la sarna en el cuerpo depende de la situación inmunitaria, cuando esta declina la sarna aumenta(3).

A.1 Tipos de sarna.

Arenas (2) en su Atlas de Dermatología da una clasificación de la escabiasis:

- Sarna de niños
- Sarna de adultos
- Sarna de limpios
- Sarna noruega.

En lactantes y niños la dermatosis es generalizada, en adultos casi nunca afecta a la cabeza, piernas ni pies. la dermatosis está limitada por unas líneas imaginarias que pasan por hombros y rodillas (líneas de Hebra).

En niños las lesiones predominan en la piel cabelluda, palmas, plantas y pliegues; en adultos, en cara anterior de muñecas, antebrazos y muslos, ombligo, pliegue interglúteo, axilas, escroto y pene; en la mujer, en pliegues submamaros y pezones. La evolución es aguda, subaguda o crónica; el prurito es muy intenso, sobre todo el nocturno.

En personas con buenos hábitos de higiene las lesiones son muy escasas, predominando en axilas, pliegues interdigitales y genitales, a veces sólo hay prurito, y pueden aparecer ronchas o dermatografismo. También se puede observar en pacientes que se lavan la cara con jabón para cuidar la piel(2).

La sarna de noruega o costrosa, es provocada por el mismo parásito de la sarna común, es poco frecuente y se observa en personas inmunosuprimidas donde se da la reproducción masiva del parásito.

En pacientes con síndrome de Down, trastornos mentales o que usan glucocorticoides locales. Las lesiones son muy extensas, no respetan la líneas Hebra y predominan en ellas las escamas, las costras melicéricas y la hiperqueratosis, los ácaros penetran incluso en las uñas y ocasionan una distrofia del tipo de la onicogriposis(4).

En animales y en algunos alimentos se han identificado otros tipos de ácaros que también afectan al ser humano, sin embargo, estos no llegan a afectar plenamente la piel, por ejemplo la variedad canis que es procedente del perro no vive mucho tiempo en la piel humana. excepto en los casos de sarna de noruega, donde si ha llegado a dar afecciones severas(4).

A.2. Diagnóstico y tratamiento.

Un paciente habitualmente no tiene en su cuerpo más de 10 parásitos y sin embargo el número de lesiones dermatológicas es muy grande. Las complicaciones modifican el cuadro, el rascado produce impetiginización, y cuando esta es más intensa o abarca a casi todo el cuerpo, puede causar glomerulonefritis principalmente en los niños.

El diagnóstico se realiza por observación, sin embargo, otros métodos consisten en poner un poco de tinta china en la piel dañada la cual penetra através de los túneles formados por el parásito ó por un raspado de piel de la zona afectada y observar las escamas al microscopio(5).

El tratamiento suele ser tópico y los medicamentos más usados son: el benzoato de bencilo al 20%, crotamitón al 10%, lindano al 1%, azufre y el disulfuro de dimetildefenileno del 10 al 20%.(6,29)

Al momento de su aplicación, la piel no debe contener disolventes y el paciente, no debe bañarse antes de su aplicación, ya que la humedad activa la absorción del fármaco por la piel. Generalmente se usa durante 5 a 7 días frotando la superficie del cuerpo, aunque aparentemente no existan lesiones, especialmente en pliegues, el frote debe durar unos 10 minutos y al día siguiente tomar un baño caliente aplicando después talco.

En general el tratamiento no debe repetirse antes de un mes, ya que puede irritar la piel; durante los días de la terapéutica o al finalizar las aplicaciones se recomienda aplicar "cold cream" o linimento oleocalcáreo.

Debe advertirse a los pacientes que al término del tratamiento, puede sentir prurito por unos días más y que las lesiones no van a desaparecer en su totalidad debido a que los sarcóptes muertos serán eliminados al caer la capa córnea, por tanto no se debe prolongar el tratamiento más allá de los días indicados(5).

B. Benzoato de bencilo.

El benzoato de bencilo tiene propiedades escabícidas y pediculicidas, además se usa como solvente para el acetato de celulosa, y fijador de perfumes, en confitería y en gomas de mascar.

B.1. Propiedades físicas y químicas.

Nombres químicos:	a) ácido benzoico fenilmetil ester b) ácido benzoico bencil ester c) bencilbencencarboxilato.
Nombre genérico:	benzoato de bencilo
Nombres comerciales:	ascarbin, ascabiol, benilato, vanzoate, venzonate.
Fórmula empírica:	C ₁₄ H ₁₂ O ₂
Peso molecular:	212.25 g/mol

Descripción: hojuelas o líquido aceitoso incoloro, pálido, olor ligeramente aromático, sabor picante con ardor.

Rango de ebullición:	323 a 324°C
Punto de fusión:	21°C
Densidad:	d(25/4) 1.118, d(25/4) 1.1121
Índice de refracción:	n(21/D) 1.5681, n(20/D) 1.568

Solubilidad: insoluble en agua o glicerol, miscible con alcohol, cloroformo, aceites, acetona, benceno, metanol, éter de petróleo(7,8).

El benzoato de bencilo se encuentra actualmente en el mercado como emulsión al 25% combinada con lindano, o como loción de ésta.

B.2. Propiedades toxicológicas.

Generalmente es inocua a concentraciones menores del gramo pero a altas concentraciones es tóxica para el ácaro del *Sarcoptes scabiei*. La dosis letal (LD50) para ratas, ratones, conejos y puercos de guinea, es de 1.7, 1.4, 1.8 y 1.0 (g/Kg) respectivamente. Cuando es absorbida ligeramente, es rápidamente hidrolizada a ácido benzoico y alcohol bencilico.

El alcohol bencilico es biooxidado a ácido benzoico el cual se conjuga con el aminoácido glicina, para formar el ácido hipúrico, el cual, es finalmente desechado a través de la orina (ver figura 1), además tiene el inconveniente de provocar espasmo intestinal(7,8).

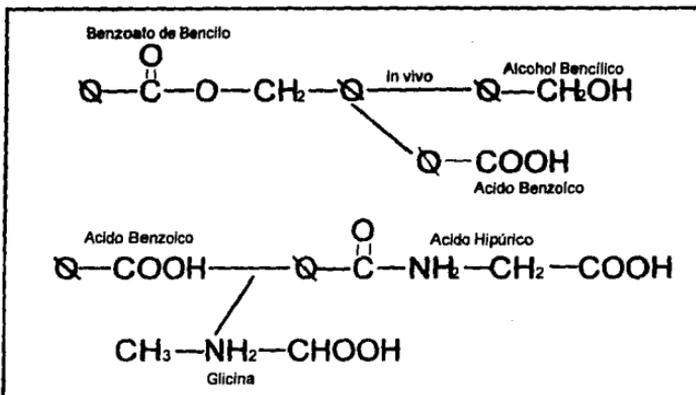


Figura 1. Biotransformación del Benzoato de Bencilo en hígado para su eliminación en orina.

C. Desarrollo de un medicamento.

La investigación y el desarrollo de un medicamento no se compara con la de ningún otro tipo de producto, no sólo por su especial importancia social, sino por ser un proceso en el que deben de intervenir de manera totalmente integrada numerosos profesionales con diversas especializaciones muy similares entre sí (químicos, biólogos, médicos, patólogos, farmacéuticos.), tanto de empresas multinacionales, como de instituciones académicas, de investigación, hospitales y autoridades gubernamentales. La posibilidad de conseguir resultados de eficacia y seguridad y el riesgo de no tener éxito en el mercado es elevado, aun cuando la inversión realizada alcance valores estratosféricos y el tiempo sea muy prolongado(9).

En la figura 2 se muestra de manera muy esquematizada las etapas que se involucran en el desarrollo de un medicamento (9,10,11,12):

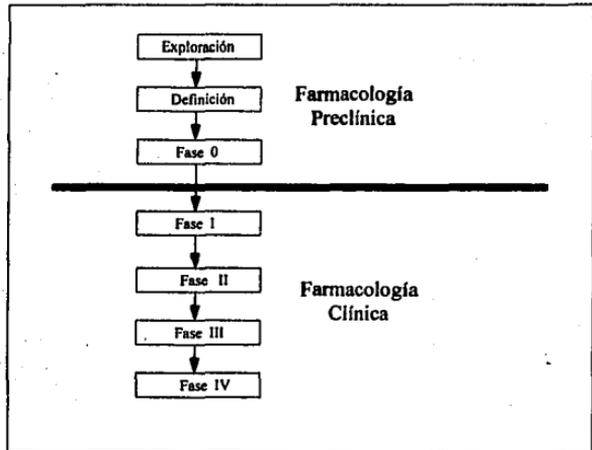


Figura 2. Etapa del desarrollo de un medicamento

La Secretaría de Salud de México indica de manera más global los requisitos que debe cubrir el desarrollo de un medicamento:

- 1) Parte Farmacéutica
- 2) Parte Farmacológica
- 3) Parte Biofarmacéutica.

Este último enfoque da de manera conjugada todos los pasos a seguir que se muestran en la figura anterior(13).

C.1. Farmacología preclínica.

En esta parte se puede ver la etapa de exploración, la cual está predeterminada normalmente por una planeación estratégico/administrativa, en la cual se evalúan aspectos del mercado, necesidades terapéuticas y capacidades internas de la compañía, con el objetivo de establecer las áreas de interés primario para investigar.

Cualquiera que sea el origen del descubrimiento del compuesto químico, el siguiente paso será confirmar su estructura y proceder a caracterizarlo por medio de técnicas analíticas adecuadas. El químico responsable deberá asegurar que se cuenten con cantidades suficientes del compuesto puro para poder efectuar la evaluación biológica(9).

Aunado a esto, hay que observar, reportar y analizar los efectos primarios y secundarios que podría tener la sustancia en el hombre, los cuales van desde el tratamiento "in vitro" de partículas subcelulares, uso de cultivos, tejidos u órganos aislados, hasta la administración en animales intactos; con lo que se dará el cenimiento farmacológico que buscará demostrar que la hipótesis de que el nuevo compuesto tiene o no utilidad en determinado padecimiento del hombre, además se establecen las propiedades farmacocinéticas y farmacológicas. Continuando los estudios de toxicología y eficacia, en los de mayor interés(9,12,15).

Los estudios preclínicos se realizan principalmente en animales, donde encuentra su aporte farmacológico y toxicológico, ya que sería poco ético y demasiado riesgoso realizar estos estudios directamente en el hombre. Dichos modelos animales son a menudo empleados para dar soporte al desarrollo de nuevas formas y formulaciones farmacéuticas. Este tipo de estudio puede reducir el costo y el tiempo necesario para desarrollar un nuevo medicamento, además de evitar la exposición innecesaria en el hombre(14).

Estos estudios pueden ser organoorientados o enfermedadorientados. Siendo su objetivo principal el definir la eficacia y la seguridad del fármaco. Además para el segundo, se realizan estudios de toxicidad aguda, subaguda y crónica, en diversas especies animales.

La medida común de la toxicidad aguda es la dosis media letal (LD50). Esta es usualmente determinada por dosis únicas en animales, algunas de las cuales son letales. Se observan los síntomas de toxicidad desarrollados y el tiempo en que comienzan a mostrarse. Se usan por lo menos en más de una ruta de administración.

La toxicidad subaguda debe ser en, por lo menos, dos especies animales, siendo uno de ellos un no roedor. Su duración de tratamiento usualmente es de 30 a 40 semanas. En cada especie se usan por lo menos tres niveles de dosis, variándolas en concentraciones cercanas a la dosis terapéutica y elevandolas lo suficiente como para producir una toxicidad aguda. El fármaco se administrará en una ó más rutas, dependiendo de la que se vaya a usar en el hombre, por una ó más veces al día.

Los estudios de toxicidad crónica deben ser en por lo menos tres especies, solamente una de ellas deberá ser roedor. Su duración es de 6 meses, a 2 años, dependiendo de la duración intencionada del fármaco para uso humano. Se usan tres niveles de dosis, variando la dosis no tóxica pero más grande que la terapéutica, necesaria para producir una respuesta tóxica. Con este tipo de estudios se pueden observar efectos que no se pudieran ver en estudios de corto tiempo.(15)

Sin embargo, en los Requisitos para el Trámite de Registro Sanitario de Medicamentos en México, publicada en 1990 por la Secretaría de Salud, pide las siguientes especificaciones para los estudios de toxicidad, en farmacología preclínica:

Toxicidad: Aguda	Realizar en tres especies animales, dosis únicas.
Subcrónica	Realizar en dos especies animales durante 3 a 6 semanas.
Crónica	Realizar en dos especies animales con 3 niveles de dosis,

durante 6 meses a 2 años(13).

En general, para los estudios preclínicos, de acuerdo a su valoración, pueden dividirse en:

- 1) Aquellos en los cuales se mide la respuesta en cada animal.
- 2) En aquellas en las cuales es medido el porcentaje de efectos positivos (una valoración cuántica), y.
- 3) Aquellos en los cuales se mide el umbral o dosis eficaz mínima en cada animal(16).

Después de terminada la investigación de la sustancia farmacéutica y comprobada su utilidad, eficacia y toxicología y comprobado el medicamento ya hecho, se dará paso a la última etapa de la farmacología preclínica, que es la Fase 0. Esta fase abarca el tiempo que toma la autoridad gubernamental correspondiente en dar la aprobación para realizar estudios en humanos, pues en ella se realizan diversas actividades que tendrán por objeto proveer los recursos y la estructura necesaria para realizar la investigación posterior, que es la Farmacología clínica(9).

C.2. Farmacología clínica.-

La farmacología clínica se ocupa de los problemas y el proceso de valoración de fármacos y de la terapéutica en el hombre. En comparación con otras disciplinas de la medicina, la farmacología clínica es relativamente reciente. Aunque sus raíces en E.U.A. es la American Therapeutics Society fundada en 1900, lo que se conoce ahora como farmacología clínica al parecer tiene su verdadero principio a fines de 1930 y comienzos de 1940.

El doctor Walter Modell fundó la primera publicación dedicada a esta disciplina, Clinical Pharmacological and Therapeutics en 1960(15). En 1962, la aprobación de la

Enmienda de Kefauver-Harris para la ley de Alimentos y Medicamentos de los E.U.A. tuvo gran impacto en las responsabilidades de la farmacología clínica. Por ese mismo tiempo se comenzó a prestar atención a los efectos de los fármacos en el hombre incluyendo reacciones adversas y respuestas individuales(9,15).

En literatura hay dos definiciones generales de reacciones farmacológicas adversas (RFA). La primera, que es amplia, establece que: "es cualquiera de la consecuencias indeseables del uso de medicamentos". Por tanto esta definición incluye sobredosis y abuso de medicamentos, errores en la medicación o problemas en la biodisponibilidad del fármaco.

Sin embargo, debido a la naturaleza extremadamente amplia de esta definición, no es útil para operar con ella. Una segunda definición mejor y más comprensiva, es la dada por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Una RFA es aquella que es "nociva y no intencional y ocurre en dosis usadas en el hombre para la profilaxis, diagnóstico, terapéutica o modificación de las funciones fisiológicas". Esta definición excluye a numerosos tipos de reacciones indeseables, como los errores de medicación y sobredosis intencionales.

La clasificación considerada para los mecanismos generales de toxicidad, es el siguiente:

- farmacológicas (o toxicas)
- idiosincráticas
- alérgicas
- interacciones de fármacos
- diversas(15).

En la figura 2 se observan las etapas de la farmacología clínica, que indica los estudios en humanos, de manera que tenemos:

Fase I: Estudios en voluntarios.

La farmacología humana se evalúa en un pequeño número de voluntarios sanos (frecuentemente varones, estudiantes). En ensayos donde la dosis del fármaco se incrementa gradualmente hasta que el efecto pueda ser medido. O bien dosis única, ambos estudios requieren de la aprobación del Comité Ético, los cuales valoran las respuestas inmediatas del fármaco, ya que normalmente no es posible llevar a cabo estudios a largo plazo en estos voluntarios(12,15).

Fase II: Estudios en pacientes.

Unos pocos pacientes, estudiados intensamente de manera abierta e incontrolada, son utilizados para observar si los efectos farmacológicos deseados son conseguidos en los estados patológicos, por ejemplo ¿el fármaco disminuye la presión arterial en pacientes con hipertensión?. La disposición del paciente para el fármaco es ensayada normalmente dentro de un ambiente hospitalario(12,15).

Fase III: Ensayos clínicos.

La mayor parte de los pacientes son evaluados de manera menos intensa que en la fase anterior. Los ensayos clínicos controlados comparan los nuevos fármacos con el placebo y con otras drogas terapéuticas establecidas (si existen). Las indicaciones para el fármaco y su lugar en la terapéutica de un cuadro son identificadas conforme son dosados y establecidos los métodos de administración(9,12,15).

Fase IV: Vigilancia postmercado.

Después de que se ha conseguido una licencia para el mercado, continúa la evaluación de su valor a largo plazo procurando responder ¿Altera los procesos subyacentes de la enfermedad? ¿Por qué no responden algunos pacientes? ¿Cuál es el potencial del fármaco por mal uso o abuso? ¿Existen interacciones del fármaco clínicamente relevantes? ¿Existen importantes efectos secundarios, poco

frecuentes? ¿Hay alguna interacción nueva?. En cierto sentido, esta última fase cubre toda la vida del fármaco(9,12,15).

D. Cremas.

Las cremas son una formulación farmacéutica pueden aplicarse en la piel, el cuero cabelludo o ciertas membranas externas, con el fin de conseguir un efecto local o sistémico, ya sea que la meta final sea actuar en el estrato córneo u obtener una respuesta en el tejido de la epidermis, o bien cuando se persigue conseguir una acción sistémica, la terapia por la vía cutánea es difícil de controlar, ya que para alcanzar dosis terapéuticas en el sitio de acción son necesarias grandes cantidades.

La mayor parte de las preparaciones farmacéuticas aplicadas a la piel tienen por objeto conseguir un efecto local, de tal forma que se formulan para permitir un contacto prolongado con la superficie cutánea y conseguir o no algún grado de absorción percutánea para ejercer su efecto. Sin embargo, buena parte de los desórdenes dermatológicos de diferente tipo pueden controlarse, en mayor o menor grado, sólo cuando se logra su adecuada absorción percutánea y se concentran cantidades terapéuticas del fármaco en el tejido afectado.

Con este propósito se fabrican formas farmacéuticas tales como: cremas, ungüentos, pastas, lociones, emulsiones, polvos y aerosoles(9).

D.1. Definición de crema

Las cremas son una forma farmacéutica, que tradicionalmente se han definido como emulsiones, son dispersiones de gotas microscópicas de un líquido en otro con un diámetro

aproximado que varía entre 0.5 y 100 micras, la mayoría consiste generalmente de la mezcla de 2 líquidos.

La IUPAC formula la siguiente definición: "en una emulsión las gotas de un líquido y/o cristales líquidos están dispersos en otro líquido", el primero es la fase dispersa y el segundo es la fase dispersante o continua. Generalmente se conforman de agua, aceite y un tensioactivo(17,18,19).

Desde un punto de vista dermatológico son productos farmacéuticos que sólo afectan el tejido blanco de la piel, y no se desea la absorción sistémica de estos, su acción debe ser local, lo cual da algunas ventajas frente a otras formas farmacéuticas que pueden provocar efectos tóxicos o desagradables al momento de ser absorbidos y pasar a la circulación sanguínea sistemáticamente(17).

D.2. Clasificación de las cremas.

Las cremas se han clasificado principalmente de acuerdo a su composición y proporción, en:

- Ac/Ag: indica que la fase dispersa es el aceite y el agua es la fase continua.
- Ag/Ac: ahora la fase dispersa es el agua y el aceite es la fase continua(18).

Aunque algunos autores han considerado un tercer tipo de cremas que no contienen agua, las cremas fundentes, están hechas principalmente con aceites grasos, ceras y alcoholes grasos, etc. pero en su mayoría son considerados como ungüentos(19).

También por un criterio utilitario, se tiene la siguiente clasificación:

de limpieza

- emolientes (evitan deshidratación)
- bases y/o evanescentes
- protectoras
- nutritivas
- especiales (depiladoras, de afeitarse, de maquillaje, desodorantes, dentales)(19).

E. La piel humana.

La piel humana consiste en 3 paredes distintas, la epidermis, la dermis y el tejido subcutáneo. La epidermis es la región que está fuera de la piel y no está vascularizada, está formada por varias capas. La capa más superficial de la epidermis es el estrato córneo, el cual está compuesto de células muertas queratinizadas.

El estrato córneo es generalmente reconocido como la principal barrera para la pérdida de agua y entrada de cuerpos extraños. La dermis o piel verdadera está altamente vascularizada. Los fármacos que penetran hasta esta región son igualmente pasados a la circulación sistémica(20,21).

E.1. Funciones de la piel.

En general las funciones de la piel son:

Cubierta de fluidos y tejidos del cuerpo.

Protección de estímulo externo dañino (función de barrera)

barrera microbiológica

barrera química

barrera a la radiación

barrera térmica

barrera eléctrica.

Recepción de estímulos externos: táctil, dolor y térmico.

Regulación de la temperatura corporal.

Síntesis y metabolismo.

Disposición de desechos bioquímicos (en secreción glandular).

Identificación intraespecie y/o atracción sexual.

Regulación de la presión sanguínea(20).

E.2. Absorción a través de la piel y su relación con las cremas.

La absorción percutánea es básicamente un fenómeno de difusión pasiva del fármaco, desde la base o vehículo que lo contiene hasta los tejidos superficiales de la piel, en especial aquellos pertenecientes al estrato córneo y a los conductos de las glándulas sebáceas(9).

Existen dos rutas principales de absorción percutánea: la transepidermal (correspondiente a la difusión directa a través del estrato córneo) y la transfolicular (relativa a la difusión en los folículos pilosos). Sin embargo, si el área de aplicación es pequeña (menos de 10% de la superficie total corporal) y la piel está intacta, aun cuando el metabolismo y la eliminación del fármaco sean normales, resulta verdaderamente complicado alcanzar los niveles sanguíneos significativos(9).

La absorción de fármacos es rápida en regiones con alto número de folículos pilosos, y disminuye en regiones con capas gruesas de estrato córneo(22). El estrato córneo presenta una barrera que dificulta la difusión en gran medida para muchos compuestos interesantes y sólo cuando es dañada por medios físicos o químicos es posible penetrar las capas restantes con facilidad.

Además las cortaduras, raspones, inflamaciones, bordes medios, o cualquier otra condición en el estrato córneo que este dañado o destruido, promueve la absorción de fármacos a través de la piel; de igual manera, algunos agentes oclusivos o que promueven la hidratación ayudan a generar la absorción del fármaco(21,22).

Las cremas son productos, que son aplicados a la piel, pueden provocar graves efectos dañinos, siendo los más frecuentes la irritación y la sensibilidad alérgica; respuestas que se encuentran menos frecuentes son la urticaria de contacto resultante de la liberación citotóxica de histamina, picor, fototoxicidad y fotoalergia.

Es necesario tener mucho cuidado al evaluar los posibles efectos adversos de estas sustancias, donde es necesario que se realicen ensayos biológicos(22).

El ensayo utilizado con más frecuencia para detectar los posibles irritantes primarios es el de Draize o modificaciones ligeras a este(23); actualmente en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, en su quinta edición, se publica la prueba de irritabilidad, la cual permite hacer de un procedimiento cualitativo a uno cuantitativo(24).

F. El conejo.

Como se mencionó en la parte del desarrollo de un medicamento, en la parte preclínica, es importante desarrollar métodos que ayuden a evaluar la eficacia y toxicidad del fármaco, para el caso de las cremas la posible toxicidad se da en la piel. Estos estudios preclínicos se realizan principalmente en animales.

Para desarrollar estos estudios preclínicos, en animales, hay que observar las características comparables a la piel humana con ésté, que afecten la absorción cutánea, el grosor y la naturaleza de la piel (estrato córneo), la densidad de los folículos pilosos y

glandulas sudoriparas, la naturaleza del pellejo, el suministro de sangre papilar, y aspectos sutiles bioquimicos(25).

En la actualidad, se ha visto que la piel de conejo es más sensible a la irritación que la humana, de manera que es posible identificar cualquier sustancia con posibilidad de tener un efecto nocivo en la piel humana. El conejo es un animal fácil de obtener. Sin embargo, presenta la desventaja de que puede ser más propenso a contaminarse con alguna enfermedad infecciosa que pudieran tener las otras especies que se encuentran en el laboratorio(26).

F.1. Principales usos del conejo.

A pesar de que probablemente la función más importante perseguida durante la producción de conejos sea la obtención de carne de excelente calidad, existen otros usos y destinos importantes potenciales que pueden aportar dividendos sustanciales al cunicultor. Por esta razón se pueden mencionar hasta cinco diferentes propósitos para la Cunicultura:

1. Producción de carne.
2. Producción de piel.
3. Producción de pelo.
4. Producción de animales reproductores.
5. Producción para laboratorios.

1. Producción de carne.

La carne del conejo es blanca y de grano fino. Desde el punto de vista nutricional es una de las mejores, por su alta calidad y proporción de proteínas y por su escasa cantidad de grasa, por lo que el contenido de colesterol es bajísimo, lo cual constituye

una propiedad dietética muy importante pues disminuye las posibilidades de promover la aterosclerosis. Así mismo, la producción de ácido úrico tras su ingestión es menor que cuando se consumen otros tipos de carnes; esta característica metabólica le permite ser una carne recomendable para individuos seniles, convalecientes o artríticos, sobre todo si estos últimos deben sus trastornos a la enfermedad de la gota(27).

2. Producción de piel.

Cuando la piel del conejo es de buena calidad y es obtenida en forma adecuada, se utiliza para la confección de diversas prendas que pueden cotizarse muy alto sobre todo si el teñido y el acabado son esmerados. Cuando la piel es de menor calidad es utilizada para la elaboración de bolsos, carteras, guantes o forros de otras prendas. Cuando la piel es de mínima calidad, su pelo es utilizado para la preparación del fieltro de los sombreros, y el cuero sirve para la fabricación de pegamentos y gelatinas.

Las razas más apreciadas dentro de los demandantes de pieles son: Rex Castor, Chinchilla, Nueva Zelanda Blanco, California, Gigante Blanco de Bouscat, Gigante de Flandes Blanco, Azul de Beveren y Habana(27).

3. Producción de pelo.

Característicamente la raza explotada para la producción de pelo es la Angora, en sus diferentes variedades. La producción se inicia cuando el conejo alcanza tres meses de edad, y se prolonga hasta los 6 años con un buen rendimiento trimestral. La longitud del pelo oscila entre 15 y 25 cm. A pesar de que existen muchas variedades (negros, azules, habanos, chinchillas, etc.), el color blanco es el que mayor demanda tiene por la industria textil y por ello es el más empleado(27).

4. Producción de animales reproductores.

El contar con reproductores sanos, fuertes y de alta calidad genética es una necesidad impostergable de toda granja cunícula pues tiene un gran impacto económico. Se logra con la adquisición de ejemplares de raza pura, no consanguíneos, los cuales se aparean y crían bajo condiciones ambientales favorables que impidan infecciones o infestaciones. Son pocos los proveedores de animales considerados confiables, y eso tiene un precio.

5. Producción para laboratorio.

El conejo es el animal de laboratorio más utilizado después del ratón, la rata, el hamster y el cobayo. De los 100 millones de animales de laboratorio producidos y utilizados anualmente en todo el mundo, 2.2 millones están constituidos por conejos y liebres. El conejo de laboratorio se utiliza básicamente a tres niveles: docencia, investigación y pruebas de constatación de calidad de productos farmacéuticos.

Enfocándose al tercer punto, se tiene que se requieren grandes cantidades de conejos para realizar pruebas de Pirógenos y de sensibilidad dérmica.

La prueba de pirógenos necesita de conejos clínicamente sanos, de la raza Nueva Zelanda de variedad blanca, genéticamente puros. Los animales deben pesar entre 1.5 y 1.8 Kg, machos.

Las pruebas de sensibilidad dérmica son realizables en conejos de la raza Nueva Zelanda, ya que éstos poseen una epidermis extremadamente sensible y fina, además de buena visibilidad de las reacciones que se esperan ver con esta prueba. A través de estas pruebas se evidencia el poder irritante de diversas sustancias farmacéuticas aplicadas en forma tópica: cosméticos, cremas, lociones, etc.(27).

Por todo lo ya expuesto, el conejo producido para el laboratorio debe ser ajeno a cualquier aplicación de sustancias farmacológicas pues sólo así, y estando clínicamente sano, se puede garantizar que la respuesta ante la prueba experimental o de control es imputable sólo a su biología. Esto demanda un control estricto de los factores ambientales para evitar estrés y enfermedades, así como rigurosa higiene; por esta razón, los conejos empleados en el laboratorio cuadruplican su valor en relación a los destinados al consumo como alimento(27).

F.2. Sarna del conejo.

Es el padecimiento más común de la piel de los conejos es la sarna la cual afecta principalmente la superficie interna de la oreja. También se le conoce como "sarna de la oreja, sarna gangrenosa de las orejas u oreja calda", y es provocada por el *Psoroptes cuniculi*; cuya distribución es mundial.

El conejo continuamente sacude la cabeza y se rasca las orejas con los miembros posteriores; se produce una dermatitis fibrocóstrosa progresiva, con pérdida de pelo. Al rascarse el animal se lesiona y hay hemorragia. Por el peso de las costras la oreja deja de estar erecta y "se cae". La infestación avanza tanto hacia afuera sobre el pabellón de la oreja, como hacia adentro, internándose al oído y causando tortícolis. Los animales dejan de comer, pierden peso, dejan de reproducirse y experimentan infecciones secundarias.

La observación directa al microscopio de pequeñas costras en solución pueden mostrar al parásito, dichas costras pueden ser obtenidas por raspado de las zonas más irritadas del pabellón auricular. El retiramiento físico de las costras junto con el lavado de jabón a base de hexaclorofeno o por aplicación de benzoato de bencilo diariamente, ayudan a la erradicación del parásito(27).

Este parásito no constituye una zoonosis. Aunque, por otro lado, se ha reportada hasta la fecha que el parásito de sarna del hombre, *Sarcoptes scabiei*, presenta zoonosis con algunos animales. El Psoroptediae es 5 veces más grande (500micras) que el Sarcoptediae, se diferencian principalmente por la forma y por que el primero tiene tres pares de patas más grandes que el segundo(28).

G. Inmunodepresión.

El control de la enfermedad por medios inmunológicos tiene dos objetivos: producción de la inmunidad deseada y la eliminación de las reacciones inmunes no deseadas. El primero de estos objetivos se consigue mediante métodos de inmunización en vez de fármacos. Mientras que el otro objetivo, generalmente, se consigue con fármacos. Dichos fármacos son llamados "inmunosupresivos" o inmunosupresores, que son drogas capaces de inhibir los procesos de inmunidad; aunque algunos de estos también tienen propiedades antiinflamatorias(30,31).

En la clínica se han usado varios grupos de fármacos para suprimir la respuesta inmune. Los más importantes son:

1. Corticoides.
2. Fármacos citotóxicos.
3. Globulinas antilinfocíticas.
4. Metabolitos fúngicos.
5. Inmunosueros(32).

Siendo el primer grupo el más usado, a los que se les reconocieron propiedades linfocíticas. En todos estos se puede realizar una evaluación clínica mediante la observación médica, la biometría hemática o por la disminución de la inmunoglobulinas gama(33).

El análisis electroforético se utiliza para determinar la pureza de proteínas individuales y para realizar el análisis cuantitativo de una mezcla compleja(38). Esta técnica se ha utilizado muy comúnmente en la clínica, para la evaluación de proteínas séricas. Se observa principalmente la separación de la albúmina y algunas globulinas, por tanto, ayuda al seguimiento de una inmunosupresión.

La muestra es aplicada en solución en un campo eléctrico para hacerla emigrar, de acuerdo a su punto isoeléctrico y el pH será su capacidad de emigrar en un soporte, por ejemplo, almidón, acetato de celulosa, papel, geles. La dirección del desplazamiento es de derecha a izquierda con el ánodo (+) a la izquierda, en un pH de 8.6 (39). Estos soportes permiten, mediante el uso de algunas técnicas de tinción y de un densitómetro cuantificar, las diferentes proteínas(34,36).

La mayor parte de las moléculas de la albúmina emigran a la misma velocidad simulando una sola fracción(37), mientras que las globulinas que se pueden observar son los siguientes:

- alfa: se encuentra aumentada, en general, en procesos inflamatorios agudos, en las neoplasias y en otros síndromes con destrucción tisular (infartos, necrosis, caseosis); disminuye inconstantemente en inflamaciones crónicas con reacción mesenquimatosa por ejemplo cirrosis hepática, poliartritis crónica, etc..
- beta: aumenta especialmente en todos los procesos que cursan con hiperlipemia (síndrome nefrótico, mixedema, ictericia obstructiva, ciertas cirrosis, arteriosclerosis marcada, etc.), no disminuye nunca.
- gamma: aumenta en inflamaciones crónicas con reacción mesenquimatosa (cirrosis hepática, hepatitis crónica, brucelosis, lepra, kala-azar, histoplasmosis, etc.); disminuye por defecto de síntesis por pérdidas exageradas, en las grandes

pérdidas de resistencia por infecciones repetidas, especialmente en niños, y en los carenciales avanzados, en mielomas (35).

La proporción que se obtiene de cada fracción se muestra en la figura 3(39).

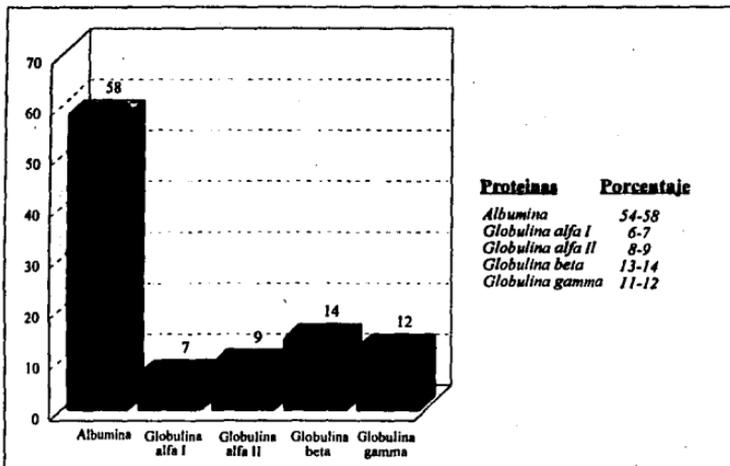


Figura 3. Proporción de Proteínas séricas en hombre.

H. Toxicología del lindano.

El lindano es un insecticida que se absorbe a través de la quitina en los insectos y produce convulsiones en los animales pues se absorbe fácilmente por la piel (vía tópica y vía bucal). Cuando se aplica excesivamente se puede presentar irritabilidad, insomnio, vértigo, ambliopía, estupor y coma. Es irritante para piel, ojos y mucosas. Puede provocar anemia aplásica. En orina (para adultos) se elimina el 10%(6,15,29).

II. FUNDAMENTACION DEL TEMA.

La sarna es una enfermedad que ataca principalmente a las personas de escasos recursos, a las que viven en zonas marginadas y a aquellas que carecen de los servicios necesarios, como son el agua, drenaje, y en personas con malos hábitos de higiene.

Esta enfermedad suele aparecer cada 10 o 12 años, como pequeña o gran epidemia. Se presenta únicamente en la piel, originando desde una pequeña irritación hasta graves escaras y otro daño dérmico importante; se transmite por el contacto directo o el uso de las ropas de personas enfermas. Por estas razones se debe tener un adecuado cuidado de la salud ambiental y estar preparados con una terapéutica eficaz y segura, para controlar, y si es posible erradicarla.

La terapéutica de cualquier enfermedad se basa principalmente en el empleo de medicamentos, ya sea para controlar, prevenir o aliviarla. Por tanto, es de suma importancia conocer los mecanismos en el desarrollo de un medicamento.

La sustancia que será proyectada como un principio activo deberá ser identificada en su inicio, dentro del desarrollo de un medicamento, conocer su procedencia, caracterización física, química y biológica, para pasar posteriormente a la formulación del medicamento en la presentación farmacéutica que usará el hombre, y con esto la vía de administración.

Una vez realizada la formulación se tendrá que seguir el paso previo, pero muy importante, a la administración al hombre, que es el estudio en animales. Los estudios dan una visión muy cercana a lo que pasará al ser administrado al hombre; principalmente se evalúa la toxicología y la eficacia del medicamento, esta es la etapa preclínica.

La siguiente etapa es la clínica, en la que ya se administra en el hombre: primero en voluntarios sanos y luego en enfermos, en ambos casos la evaluación debe ser rigurosa, el tercer paso es otra evaluación menos rigurosa pero más amplia, finalmente una evaluación constante del medicamento (post-mercado), en la que se buscan algunos efectos otros efectos terapéuticos o evaluar posibles efectos colaterales.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El registro de un medicamento o insumo para la salud, es el punto crucial y clave para el que se autoriza la comercialización. Para tal efecto, todas las agencias reguladoras de los países y las industrias farmacéuticas productoras de estos insumos se han preocupado, con especial énfasis, en atender desde ambos puntos de vista, las convergencias necesarias significativas de que todo medicamento o insumo, al ser autorizado su registro sanitario, haya sido analizado y dictaminado como eficaz y seguro. Uno de tales análisis es el estudio preclínico, el cual se desarrolla en animales, de acuerdo a las especificaciones de cada país.

Este es el caso de la crema de Benzoato de bencilo, que se desarrolla en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, de la UNAM. Aunque en el mercado ya existe una presentación farmacéutica, como emulsión, y debido a que presentará una nueva formulación, como crema semisólida, es necesario realizar estudios para comprobar su seguridad y eficacia para evitar posibles daños en el hombre.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general:

Realizar la evaluación preclínica de la crema de Benzoato de bencilo, en forma semisólida, que se desarrolla en el laboratorio de la Planta Piloto de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES-Zaragoza).

Objetivos particulares:

1. Evaluar el efecto de la crema de benzoato de bencilo, que se desarrolla en la FES-Zaragoza, sobre la irritabilidad en la piel de conejo, comparandola con el placebo y muestras comerciales.
2. Producir sarna en el lomo de conejo por inoculación de *Sarcoptes scabiei* con el propósito de estudiar el efecto terapéutico de las cremas a probar.
3. Compara la crema que se desarrolla en la FES-Z contra muestras comerciales y placebo, evaluando la eficacia y/o equivalencia terapéutica, en animales previamente infestados con:
 - a) *Sarcoptes scabiei*
 - b) *Psoroptes cuniculli*.

V. HIPOTESIS

1. Debido a que la crema que se desarrolla en la FES-Zaragoza no contiene en su formulación al lindano, es menos toxica (irritante), y por su propiedad farmacéutica oclusiva impide la evaporación del benzoato de bencilo lo que permite que la terapéutica sea más eficaz que las muestras comerciales, que si contienen lindano.

VI. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.

A. Material, Equipo y reactivos.

a) Material biológico:

- 18 conejos albinos Nueva Zelanda, machos sanos de 3-3.5Kg de peso
- 12 conejos albinos Nueva Zelanda, machos, infestados con *Psoroptes cuniculi*, de 3-3.5Kg de peso

b) Material no biológico:

- 1 espátula
- 2 pipetas biológicas 1.0mL (Pirex)
- 4 jabones neutros (Grisi)
- 12 jaulas para conejo
- 8 rastrillos (Gillet)
- 50 parches tipo Draize
- 6 vendas elásticas (Le Roy, Laboratorios)
- 1 tijeras (Barrilito)
- 72 jeringas insulínicas (Plastipak)
- 3 agujas estériles
- 1 mesa de curación veterinaria
- 1 vaso precipitados 1000mL (Pirex)
- 1 vaso precipitados 250mL (Pirex)
- 300g de algodón
- 1 brocha chica
- 1 pinza quirúrgica

- 100 isopos estériles
- 1 membrana para electroforesis de proteínas (Titan III, Helena laboratories)

c) **Equipo:**

- Centrifuga (Centrifuge CU-500, DAMON/IEC División)
- Microscopio (Winkel, Carl Zeiss)
- Control de voltaje para electroforesis de proteínas (Titan III, Helena laboratories)
- Cámara de electroforesis (Titan III, Helena laboratories)
- Integrador de electroforesis (Titan III, Helena laboratories)
- Porta muestras para electroforesis (Titan III, Helena laboratories)
- Placa de muestreo para electroforesis (Titan III, Helena laboratories)
- Aplicador de muestras de electroforesis (Titan III, Helena laboratories)
- Otoscopio (Welch Allyn)
- Balanza analítica (1206FP, Sartorius)

d) **Reactivos:**

- Comercial 1 (Scabisan plus, emulsión; bencilbenzoato25%-lindano1% Chinoin, México)
- Comercial 2 (Scabisan, crema; lindano1%, Chinoin , México)
- Problema (Crema de Benzoato de bencilo 25% elaborada en la FES-Zaragoza)
- Placebo (Crema de la formulación de Benzoato de bencilo-crema elaborada en la FES-Zaragoza)
- 1 litro de solución salina isotónica (0.9%)
- Kit de buffer de pH 8.5 para electroforesis de proteínas (Titan III, Helena laboratories)
- Kit de solución Ponceus (Titan III, Helena laboratories)
- 5 litros de agua desionizada
- 200 mL metanol absoluto (grado reactivo, Merck)
- 50 mL ácido acético glacial (grado reactivo, Merck)

B. Métodos.

I. Prueba de irritabilidad.

Se realizó el rasurado del lomo de 12 conejos y fue dividido en 4 cuadrantes, 6 de los conejos fueron escoriados y los otros no lo fueron, posteriormente se les aplicaron las muestras (placebo, comercial 1, problema, y comercial 2) de manera aleatoria y se procedió a realizar la lectura (de acuerdo al cuadro de Draize) a las 24 hrs. y a las 72 hrs., de los valores obtenidos se realizó una última evaluación según el método de Draize*. El método fue el de Draize con algunas modificaciones, consistió en lo siguiente:

1. Realizar el rasurado del lomo de 12 conejos, procurando no irritar ni causar escoriaciones, en un área de 15x15cm, preferentemente.
2. Hacer las escoriaciones con una aguja estéril procurando no sangrar o llegar más allá del estrato córneo, en forma de gato, a 6 de los conejos, los otros 6 conejos restantes quedan sin escoriar.
3. Aplicar de manera aleatoria a cada conejo, escoriado y control (no escoriado), 0.5g en caso de sólido o 0.5 mL en caso de líquido de las cuatro muestras.
4. Colocar un parche Draize sobre la aplicación de cada muestra.
5. Cubrir con una venda elástica el lomo de cada conejo.
6. Tomar la lectura a las 24 hrs. de aplicadas las muestras de acuerdo al cuadro Draize.
7. Sin lavar volver a aplicar de nuevo las muestras en el sitio previamente empleado y repetir pasos 4 y 5.
8. A las 48 hrs. de la segunda aplicación (72 hrs. de la primera aplicación), realizar la segunda lectura de cada muestra.
9. Obtener la evaluación de las lecturas de cada muestra, de acuerdo a Draize, analizar y concluir.

*Ver anexo I.

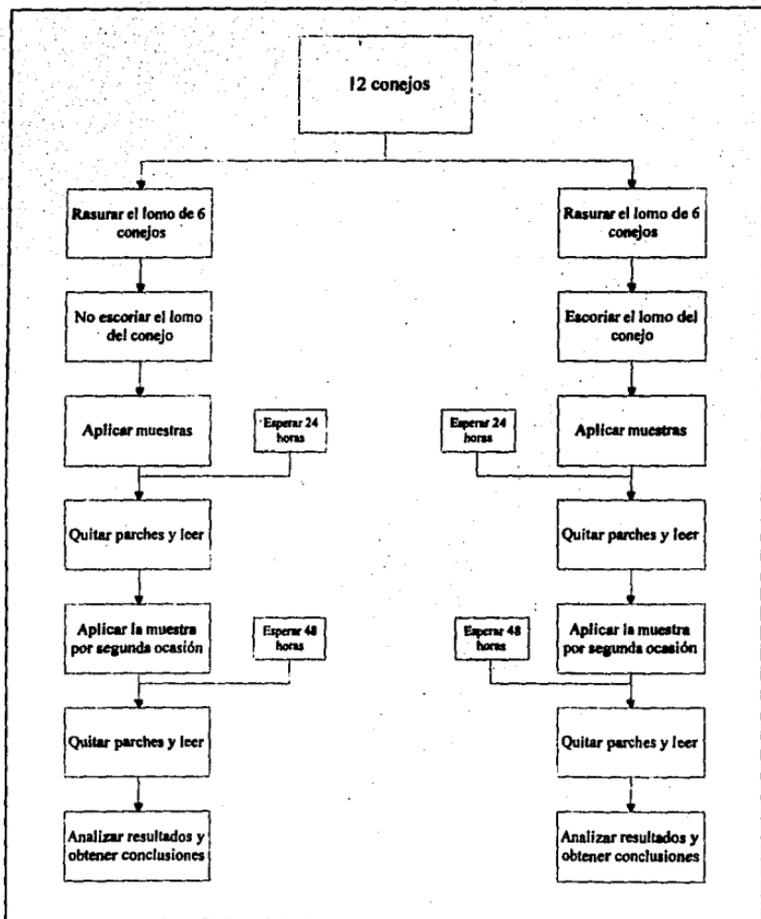


Figura 4. Diagrama de flujo de la Prueba de Irritabilidad.

II. Infestación de los conejos con *Sarcoptes scabiei*.

A seis conejos sanos se les inmunodeprimió con la aplicación de dexametazona (1mg/Kg peso/día) durante 12 días, lo cual se comprobó al realizarles un estudio electroforético de proteínas a los sueros antes y después de aplicado el fármaco.

El *Sarcoptes scabiei* se obtuvo de un paciente mediante un raspado, media hora antes de aplicarlos a los conejos, usando algodón y comprobando la extracción del parásito en un microscopio. La aplicación del parásito al lomo los conejos se hizo con una brocha, 21 días después se realizó el diagnóstico de infestación de sarna por *Sarcoptes scabiei* en los conejos; el método se realizó de la siguiente manera:

1. Extraer 1mL de sangre a cada uno de seis conejos, de la vena marginal con una jeringa insulínica, vaciar en tubos de ensaye.
2. Esperar a que coagulen las sangres y centrifugar hasta que se separen el suero y el coagulo.
3. Separar suero y realizar electroforesis.
4. A los seis conejos aplicar 1mg/Kg peso/día de dexametazona por vía intraperitoneal, durante 12 días.
5. Extraer 1mL de sangre a cada conejo, de la oreja y vaciar en tubos de ensaye.
6. Separa sueros y realizar electroforesis.
7. Realizar el raspado de un paciente con sarna, de 30 min. a 1 hr. antes de aplicar el parásito a los conejos.
8. Suspender el raspado en 500mL de solución salina isotónica. Verificar la presencia del parásito al microscopio.
9. Aplicar la solución con el parásito sobre el lomo de los conejos, usando una brocha.
10. Dejar que el parásito se desarrolle en los conejos durante 21 días. Las jaulas se lavan cada 4 días.

11. Terminados los 21 días (período de incubación), realizar el diagnóstico.

III. Prueba de eficacia y/o equivalencia para conejos infestados con *Sarcoptes scabiei*.

1. Verificar que todo el lomo del conejo se encuentre infestado.
2. Aplicar al azar las cuatro muestras a probar al azar, considerando que el área infestada consta de cuatro cuadrantes.
3. Colocar un parche en cada cuadrante.
4. Después de 24 horas quitar el parche y lavar con agua tibia y con jabón neutro.
5. Secar con toalla estéril desechable, procurando no tallarle con fuerza para no irritar más la piel del conejo.
6. Repetir de los pasos 2 a 5 durante 6 días más.
7. Después de cada lavado se hará una observación minuciosa de la piel del conejo, para realizar la evaluación terapéutica.
8. Al finalizar la terapia, se realizará una revisión diaria del conejo durante 21 días.
9. Si la infestación del conejo no es muy intensa, se utilizará 1 conejo por muestra, previa infestación de 18 conejos más.

IV. Prueba de eficacia y/o equivalencia para conejos infestados con *Psoroptes cuniculi*.

Se utilizarán 12 conejos infestados con *Psoroptes cuniculi*, a cada conejo se le aplicarán dos muestras, una por cada oreja, en total 6 orejas para cada muestra. La aplicación se hizo con isopos estériles en toda la oreja, cuando presentaban costras se extraían con una pinza quirúrgica. La terapéutica fue de 7 días consecutivos de aplicación del medicamento (muestra). Posteriormente se realizó una observación diaria hasta que apareciera de nuevo la enfermedad o que fuera de 21 días. El procedimiento en general consistió en los siguientes pasos:

1. Aplicar con un isopo estéril una muestra por oreja de cada conejo, en toda la oreja.
2. En total serán seis orejas por muestra, o dos muestras por conejo. Aplicarlas al azar.
3. A las 24 hrs. realizar una revisión, si presentan costras quitarlas con una piza quirúrgica.
4. Realizar de los pasos 1 a 3 durante 7 días total, de terapéutica.
5. Al terminar el séptimo día lavar con agua y revisar la oreja.
6. Revisar la oreja hasta que aparezca la enfermedad, por un máximo de 21 días.

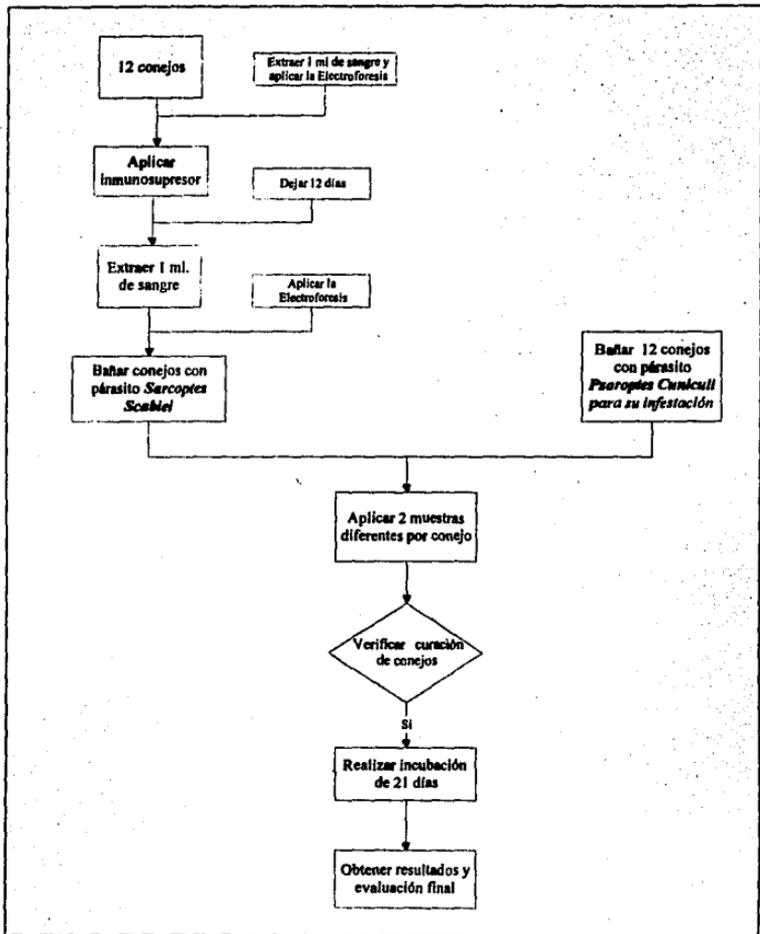


Figura 5. Diagrama de flujo de la prueba de eficacia y/o equivalencia

VII. RESULTADOS.

I. Estudio de irritabilidad

En el estudio de irritabilidad se realizó la evaluación de acuerdo a lo que establecen Draize (ver anexo 1) y la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, dando los siguientes resultados:

CONEJO	Eritema		Edema	
	24hrs.	72hrs.	24hrs.	72hrs.
• 1	1	1	2	4
• 2	0	0	1	0
• 3	0	2	1	0
• 4	0	0	0	0
• 5	0	4	0	0
• 6	0	0	0	4
PROMEDIO	0.666		1	0.833

Cuadro 1. Evaluación de la muestra Placebo en la prueba de irritabilidad según Draize.

CONEJO	Eritema		Edema	
	24hrs.	72hrs.	24hrs.	72hrs.
• 1	0	0	1	3
• 2	0	0	0	0
• 3	0	0	2	2
• 4	0	0	0	0
• 5	0	1	1	0
• 6	0	0	0	0
PROMEDIO	0.083		0.75	0.416

Cuadro 2. Evaluación de la muestra Problema en la prueba de irritabilidad según Draize.

CONEJO	Eritema		Edema		
	24hrs.	72hrs.	24hrs.	72hrs.	
• 1	0	0	0	0	
• 2	0	0	0	2	
• 3	1	2	0	1	
• 4	0	0	0	0	
• 5	0	2	0	0	
• 6	0	0	0	2	
PROMEDIO	0.416		0.416		0.416

Cuadro 3. Evaluación de la muestra Comercial 1 en la prueba de irritabilidad según Draize.

CONEJO	Eritema		Edema		
	24hrs.	72hrs.	24hrs.	72hrs.	
• 1	0	0	0	0	
• 2	0	0	0	2	
• 3	1	0	0	0	
• 4	0	0	0	0	
• 5	0	0	0	0	
• 6	0	0	0	0	
PROMEDIO	0.083		0.166		0.124

Cuadro 4. Evaluación de la muestra Comercial 2 en la prueba de irritabilidad según Draize.

De acuerdo a los cuadros anteriores, se observó en los promedios que el placebo es el que presenta mayor irritabilidad con un valor de 0.833 (cuadro 1) siguiéndole las muestras comercial 1 y el problema con un valor de 0.416 (cuadros 2 y 3) en ambos casos, y por último la muestra comercial 2 con un valor de 0.124 (cuadro 4).

Aunque se observa que todos entran en el primer punto de la evaluación de Draize, donde los valores menores de 2 orientan a un producto como irritante ligero.

II. Infestación de los conejos con *Sarcoptes scabiei*.

Por otro lado, en la infestación del conejo por *Sarcoptes scabiei*, se logra la inmunodepresión de los conejos, ya que al evaluar la inmunoglobulina IgG se observa que para todos los conejos disminuyó a casi la mitad, oscilando entre los rangos de 0.41-0.49 g/dL (antes de inyectar el inmunosupresor) y 0.19-0.25 g/dL (después de la inmunosupresión) (figuras 6y7); sin embargo, durante el lapso de incubación del ácaro de *Sarcoptes*, que fue de 21 días, no se observó rasgo alguno de la presencia de la sarna al ser revisadas las orejas y el lomo, incluyendo pliegues en donde se pudiera reproducir el parásito (cuello, entre el cuerpo y patas y área cercana al rabo).

Aún después de 14 días, por lo tanto, el método de la prueba de eficacia y/o equivalencia en *Sarcoptes* no se llevó a cabo, ya que no había conejo alguno donde realizar la prueba.

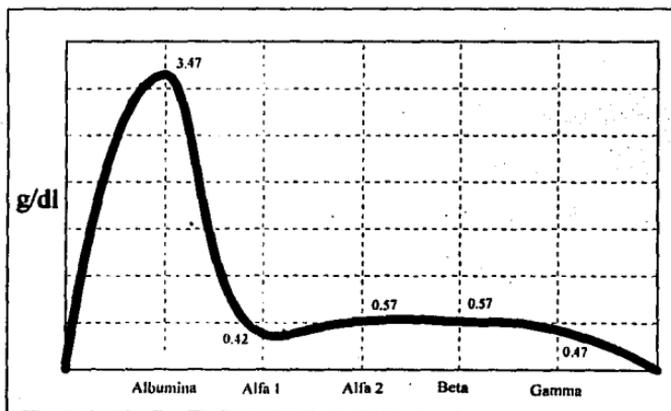


Figura 6. Lectura en densitómetro de la electroforesis de proteínas del suero del conejo antes del tratamiento inmunosupresor.

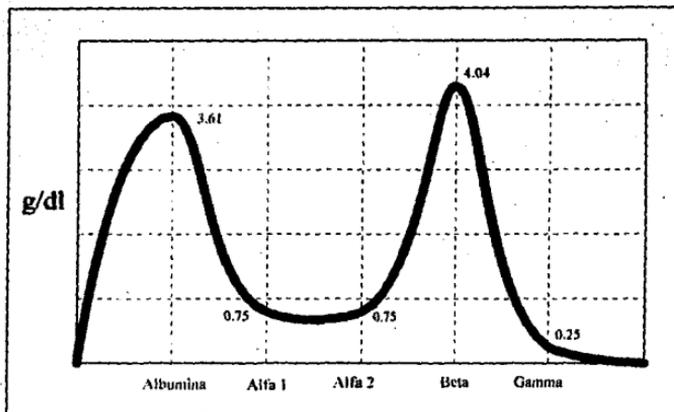


Figura 7. Lectura en densitómetro de la electroforesis de proteínas del suero del conejo después del tratamiento inmunosupresor.

3. Prueba de eficacia y/o equivalencia terapéutica.

La prueba en *Sarcoptes* no se llevó a cabo por lo arriba mencionado, no obstante en los conejos ya infestados con *Psoroptes*, el tratamiento se dió 7 días continuos, posteriormente se hace una revisión diaria durante 14 días. El tratamiento, como se explica arriba, se aplica en las orejas con isopos estériles.

Durante los primeros siete días de revisión se observó que la infestación había desaparecido en todos los conejos para las cuatro muestras. Sin embargo, al octavo día se observó que sólo 1 de 6 conejos para cada muestra empieza a presentar indicios de reinfestación, pero en el conejo de la muestra problema la lesión es en la parte profunda de la oreja, cerca del oído, lo que se observó con el otoscopio, mientras que para las demás muestras la lesión es en la parte media de la oreja.

Posteriormente, en el décimo día ya son 3 de 6 conejos por muestra los que presentarán la sarna apareciendo ya las lesiones en el área circundante al oído para todos los casos; finalmente en el décimo cuarto día de revisión ya todos los conejos volvieron a presentar la enfermedad (figuras 8-11), siendo los de la muestra problema y comercial 1 los que presentan las lesiones más ligeras y principalmente cerca al oído, mientras que para el estandar 2 y placebo se da más en las partes medias de las orejas y cerca del oído.

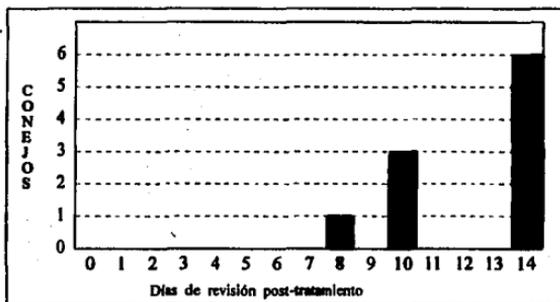


Figura 8. Evaluación de los conejos que se reinfectan con Psoroptes Cunicullii después del tratamiento con la muestra *Problema*.

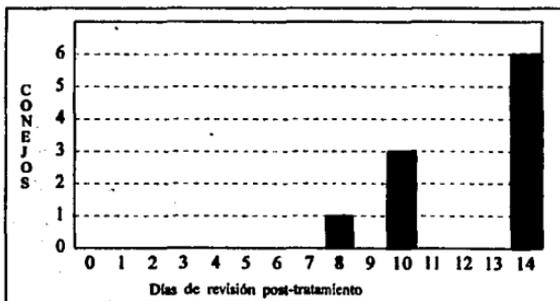


Figura 9. Evaluación de los conejos que se reinfectan con Psoroptes Cunicullii después del tratamiento con la muestra *Placebo*.

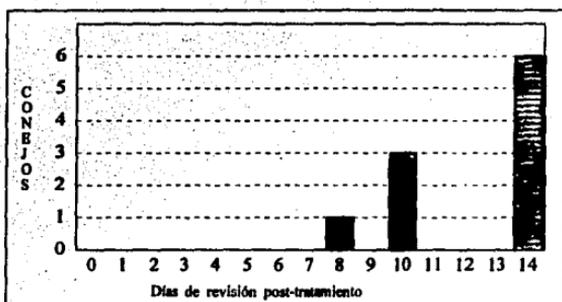


Figura 10. Evaluación de los conejos que se reinfestan con *Psoroptes Cuniculi* después del tratamiento con la muestra *Comercial 1*.

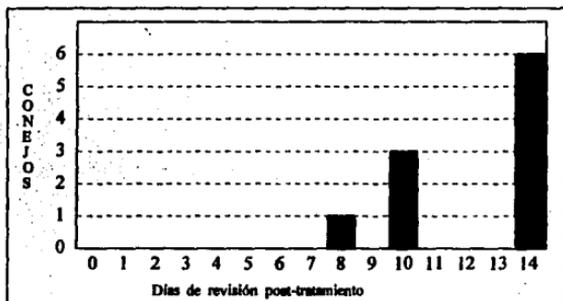


Figura 11. Evaluación de los conejos que se reinfestan con *Psoroptes Cuniculi* después del tratamiento con la muestra *Comercial 2*.

VIII. ANALISIS DE RESULTADOS.

Como se puede ver en los resultados del estudio de irritabilidad, el placebo resultó ser el que presenta el valor más alto de irritabilidad (0.833 unidades Draize), lo cual se pudo deber a que como no tenía al principio activo, benzoato de bencilo, entonces el efecto tensoactivo no se diluyó, lo que provocó a su vez que hubiera más daño a la piel.

También se puede observar que la muestra problema y la muestra comercial 1, tienen valores Draize finales inferiores al placebo e iguales entre sí, dicha semejanza indica que la presencia del lindano en la muestra comercial no tuvo mucho que ver en el grado de irritabilidad. Mientras que en la muestra comercial 2 la irritabilidad es la más mínima de las cuatro lo que viene a reafirmar que el lindano no tiene que ver en la irritabilidad, sin embargo hay que considerar que su absorción es más peligrosa que la del benzoato de bencilo.

Por otro lado, la sarna por *Sarcoptes scabiei* no se logró en los conejos debido a que la piel no presentaba las condiciones propicias para su desarrollo, entre ellas el grosor de la piel, ya que como se mencionó anteriormente el parásito tiende a hacer túneles en la piel humana y la piel del conejo es más delgada, además hay que considerar que la administración del inmunosupresor no se continúa y aunque es de larga duración (36 a 72 hrs.) el efecto inmunosupresor no alcanza para poder permitir la infestación del conejo con el ácaro; o simplemente por que no hay una zoonosis.

En la prueba de eficacia con *Psoroptes* se observa en las cuatro muestras un comportamiento aparentemente igual, ya que todos vuelven a presentar sarna en el mismo número de sujetos al mismo lapso de tiempo, pero los que presentaron una sarna más profunda o casi dentro del oído fueron los que se analizaron con la muestra problema, lo

que pudo deberse a que el parásito se anido en el oído durante la etapa de aplicación de la muestra y volvió el ácaro a salir después de terminada la terapéutica, esto se vió complementado con la manera de curar, ya que la curación no se pudo hacer dentro del oído por la incomodidad hacia el conejo de poderle causar desde una afección mínima al oído hasta el rompimiento de este.

De igual manera, al final del estudio el comportamiento de la muestra comercial 1 se presenta similar al del problema, que indica que no importó la forma farmacéutica pero si el principio activo.

Para los conejos de las demás muestras la sarna se presentó en zona más visibles, en la parte media de la oreja, lo que indica que aún considerando la emigración del parásito hacia el oído la terapéutica no fue tan efectiva, de lo contrario la enfermedad se hubiera desarrollado principalmente en la zona cercana al oído.

IX. CONCLUSIONES.

De acuerdo a lo antes mencionado podemos concluir que:

- 1) Las cuatro muestras son irritantes ligeros, sin embargo es necesario considerar los peligros de toxicidad que presenta el lindano al ser absorbido sistémicamente y las ventajas que da el benzoato de bencilo de su fácil eliminación y baja toxicidad.
- 2) El benzoato de bencilo es más eficaz que el lindano, cuando ambos se presentan en la misma forma farmacéutica.
- 3) No importa la forma farmacéutica en la que se presente el benzoato de bencilo, es igual de eficaz.
- 4) El ácaro de *Sarcoptes scabiei* no presenta zoonosis, no obstante, para reafirmar este punto se recomienda que se realice de nuevo el experimento pero ahora continuando con la inmunosupresión después de haber aplicado el baño del parásito al conejo.
- 5) La crema que se desarrolla en la FES-Zaragoza presenta las condiciones propicias para que pudiera ser probada en el ser humano, ya que pasa la prueba de irritabilidad siendo un irritante ligero.

X. BIBLIOGRAFIA

1. Biagi, F., Enfermedades parasitarias, 2a. ed., Ed. La Prensa Médica Mexicana, México 1985, pp. 329-331.
2. Arenas, R., Dermatología: Atlas, Diagnóstico y Tratamiento, Ed Mc.Graw-Hill, México 1987, pp. 437-441.
3. Brown, H., Parasitología Clínica, 2a. ed., Ed. Interamericana, México 1967, pp.274-275.
4. Steigleder, G., Dermatología y Venerología, Ed. Salvat, España 1988, pp. 233-238.
5. Saul A., Lecciones de Dermatología, 10a ed., Ed. Francisco Mendez Cervantes, México 1983, pp. 169-179.
6. Goodman, A., Las Bases Farmacológicas De La Terapéutica, 6a. ed., Ed. Medica Panamericana, España 1985, pp. 970.
7. The Merck Index, 11a ed., Ed. Merck And Co. Inc., USA 1989, pp. 176,745.
8. Florey, K., Analytical Profiles Of Drug Substances, Ed. Academic Press Inc., Vol 10, USA 1990, pp. 67.
9. Roman, F., Innovación y Desarrollo Farmacéutico, Ed. Asociación Farmacéutica Mexicana A.C., México 1990, pp.35-65.
10. Banker, G., Pharmaceutics And Pharmacy Practice, Ed. J.B. Lippincott Co., USA 1982, pp. 22-24.
11. Smith, M., Pharmacy. Drugs And Medical Care, 2a. ed., Ed. The Williams And Wilkins Co., USA 1976, pp. 201-203.
12. Foster, R., Farmacología Básica, 2a. ed., Ed. Acribia, España 1991, pp. 406-412.
13. Requisitos Para El Trámite De Registro Sanitario De Medicamentos En México. 1990, Secretaria De Salud.
14. Levin, R., Pharmacology: Drug Actions And Reactions, 2a ed., Ed. Little,Brow And Company Boston, USA 1987, pp. 391-400.

15. Conn, P., Principios De Farmacología, Ed. El Manual Moderno, México 1991, pp. 27-30.
16. Bowman, W., Farmacología, 2a ed., Ed. Interamericana, México 1985, pp.41.1-41.3.
17. Lieberman, H., Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse System, Vol.I. Ed. Marcel Dekker, N.Y. And Basel, USA 1988, pp. 123-125.
18. Remington, Farmacía, 17a. ed.. Ed. Panamericana, Argentina 1987, pp. 445-459, 2135.
19. Helman, J., Farmacotecnia Teórica y Práctica, Tomo VII, Ed. Continental, México 1984, pp. 2300-2311.
20. Banker, G., Modern Pharmaceutics, 2a. ed., Ed. Marcel Dekker, Inc., USA 1990, pp.264-266.
21. Gibaldi, M., Biopharmaceutics And Clinical Pharmacokinetics, 4a ed., Ed. Lea And Febiger, USA 1991, pp.105-110.
22. Wilkinson, J., Cosmetología De Harry, Ed. Díaz De Santos, Madrid 1990, pp.29-43.
23. Farmacopea De Los Estados Unidos Mexicanos, 5a. ed., Secretaria De Salud, Comisión Permanente De La Farmacopea De Los Estados Unidos Mexicanos, México 1988, pp. 193-194.
24. Barry, B., Drugs And The Pharmaceutical Sciences.Dermatological Formulations, Vol.18, Ed. Marcel Dekker Inc., USA 1983, pp. 250-254.
25. Tse, F., Drugs And The Pharmaceutical Sciences. VOL.46, Ed. Marcel And Dekker Inc., USA 1991, pp. 13-16, 93-104.
26. Martínez M., Cunicultura, Tesis Para Obtener El Título De M.V.Z. en la UNAM,UNAM 1993, pp. 12-15,156.
27. Dawn, G., Laboratory Animal Handbook, Parasites Of Laboratory Animal, Vol. 12, Ed. Royal Society Of Medicine Service Limited, Londres 1992, pp. 24-34.
28. Lachman, L., The Theory And Practice Of Industrial Pharmacy, 3a. ed., Ed. Lea And Febiger, USA 1986, pp. 534-539.
29. Rosenstein, E., Diccionario De Especialidades Farmacéuticas, 38a de., Ed. PLM, México 1992, pp. 1052-1053.
30. Goth, A., Farmacología Médica, 11a. ed., Ed. Doyma, España 1981, pp. 641-645.

31. Litter, M., Farmacología, 7a. ed., Ed. El Atenco, Argentina 1986, pp. 1833-1984.
32. Stites, D., Inmunología Básica y Clínica, 5a. ed., Ed. El Manual Moderno, México 1985, pp. 274-276.
33. Katzung, B., Farmacología Básica y Clínica, 4a. ed., Ed. El Manual Moderno, México 1991, pp. 720-725.
34. Krupp, M., Manual De Diagnóstico Clínico y De Laboratorio, Ed. El Manual Moderno, México 1986, pp. 78-88.
35. Balcells, A., La Clínica Y El Laboratorio, Ed. Marin, México 1981, pp. 117.
36. McGilvery, R., Conceptos Bioquímicos, Ed. Reverté, España 1977, pp. 72-75.
37. Veale, W., Bioquímica, Ed. Continental, México 1984, pp. 107.
38. White, A., Principios De Bioquímica, 2a. ed., Ed. Mc Graw-Hill, España 1978, pp. 942-958.
39. Devlin, T., Bioquímica, Tomo I, 2a. ed., Ed. Reverté, España 1989, pp. 46-50.
40. Marks, R., Manual De Dermatología, Ed. Médica Y Técnica S.A., España 1979.
41. De Castro, A., Casos Clínicos: Dermatología, Ed. SALVAT, España 1980.
42. Fitzpatrick, T., Dermatología, 2a.ed., Ed. Panamericana, Argentina 1980.
43. Krupp, M., Diagnóstico Clínico y Tratamiento, 24a. ed., Ed. El Manual Moderno, México 1989.
44. Petersdorf, R., Principios De Medicina Interna, 10a. de., De McGraw-Hill, Vol.1, México 1986, pp. 145,848.

ANEXO 1

Método de Draize.

Como se mencionó anteriormente, el método de Draize se utiliza para evaluar los posibles efectos de irritabilidad para productos que son aplicados en la piel del hombre, utilizándose a los conejos para dicha evaluación.

Se usan conejos de la raza Nueva Zelanda blancos, machos; se usan 6 con piel intacta y 6 con piel escoriada (en forma de gato), del lomo. El producto farmacéutico a probar es aplicado en parches de 2.5x2.5 cm de doble monocapa de gasa quirúrgica sujeta por alguna cinta adhesiva; y finalmente cubierta toda el área de la piel experimentada. Se aplican 0.5g de muestra en el caso de sólidos y 0.5mL de muestra en el caso de líquidos.

Después de obtenidos los valores a las 24 y 72 hrs. para todos los conejos, tanto escoriados como no escoriados, se saca la media de las 24hrs y las de 72hrs por separado, ya sean eritema o edema; posteriormente se hace una media entre las 24 y 27hrs juntas(8,18).

La obtención de la última media da la evaluación final del producto probado, de acuerdo a los siguientes valores (valores ó unidades Draize):

- de 0 a 2: irritantes ligeros
- de 2 a 5: irritantes moderados
- más de 5: irritantes severos(18).

La evaluación de 24hrs y las 72hrs, tienen valores de acuerdo a la siguiente tabla:

Reacción cutánea	Valor
Eritema y formación de escaras:	
No eritema	0
Eritema muy ligero	1
Eritema bien definido	2
Eritema de moderado a severo	3
Eritema severo a escara	4
Formación de edema:	
No edema	0
Edema muy ligero	1
Edema ligero	2
Edema moderado	3
Edema severo	4

Cuadro 5. Valores Draize para la evaluación de la prueba de irritabilidad.

ANEXO 2

Procedimiento para la electroforesis.(Se realiza con el kit completo Titan III de Helena laboratories)

1. Conectar cámara de electroforesis a control de voltaje.
2. Añadir 50 mL de solución buffer a cada compartimiento de la cámara de electroforesis.
3. Añadir 200 mL de buffer en un vaso de precipitados de 250 mL.
4. Meter la membrana de electroforesis en el vaso de precipitados, durante 5 minutos.
5. Colocar muestras de suero en el porta muestras, verificando que quede un menisco.
6. Sacar membrana del vaso y colocarla sobre la placa de muestreo.
7. Tomar muestras de suero con el aplicador de muestras y aplicar en la membrana dos veces.
8. Una vez preparada la membrana, colocarla en la cámara de electroforesis por 19 minutos y 180 volts.
9. Terminado el tiempo, teñir la membrana con solución Ponceus durante 5 minutos.
10. Lavar membrana con solución de ácido acético 5% de 3 a 4 veces, la membrana debe tomar una coloración blanca.
11. Deshidratar con metanol durante 5 minutos.
12. Lavar con solución de metanol-ácido acético (5:1) durante 8-10 minutos.
13. Secar membrana hasta que quede transparente.
14. Leer en el integrador para electroforesis.

GLOSARIO

- Ambloplía:** pérdida visual que no es debida a un error de refracción o a otra enfermedad del ojo(44).
- Edema:** son ronchas rojizas o pequeñas protuberancias que producen comezón(41).
- Eritema:** erupciones en la piel en la que se ven afectados los vasos sanguíneos, lo que produce una coloración rojiza en la zona de daño(42).
- Glomerulonefritis:** trastorno renal que consiste en hematuria microscópica, eliminación de elementos formados en la orina, proteinuria e insuficiencia renal. Puede existir daño en la estructura glomerular(43).
- Hiperqueratosis:** perturbación del crecimiento normal de las células de la piel que dan como resultado una capa córnea defectuosa e imperfecta, se caracteriza por lesiones rugosas de superficie áspera(40).
- Impetiginización:** es la enfermedad secundaria de una enfermedad preexistente, las enfermedades previas más comunes son la pediculosis, la sarna o picadura de insectos, etc.(41).
- Mieloma:** es una afección maligna de las células plasmáticas caracterizada por sustitución de la médula ósea, destrucción del hueso y formación de paraproteína(43).
- Mixedema:** secreción hormonal insuficiente que se manifiesta por la disminución del consumo de oxígeno(44).
- Onicogriposis:** engrosamiento, elongación y curvatura de la uña parecida a un cuerno de carnero, que se ve generalmente en los pies(42).