

EVALUACIÓN DEL PODER IRRITANTE DE UNA FORMULACIÓN DE FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO HUMANO RECOMBINANTE EN CONEJOS

✉ Sandra Valdés,¹ Gipsy Quintero,¹ Yamilé Vega,¹
Raquel Lazcano² y Xiomara Álvarez¹

¹Departamento de Farmacología y Toxicología, Centro de Química Farmacéutica,
Calle 200 esq. 21 Atabey, Playa, apartado postal 16042, La Habana, Cuba.

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, apartado postal 6162, La Habana, Cuba.

ABSTRACT

We studied the dermic and eye irritancy effect of human recombinant epidermal growth factor. We used the Draize test in albin rabbits to determine the dermic and eye irritation indexes. We did not observe signs of skin irritation and the value of the primary irritation index was 0. The conjunctival effects were mild and disappeared after 72 h. The eye irritancy index was less than 10. We concluded that this formulation is not irritant and can be used in therapy.

Key words: dermic irritation, eye irritation

Biotecnología Aplicada 1997;14:97-99

RESUMEN

Se evaluó el efecto potencial de irritación local dérmica y oftálmica, después de la administración del factor de crecimiento epidérmico (EGF) humano recombinante. Para determinar los índices de irritabilidad dérmica primaria (IIP) y oftálmica (IIO) se utilizó el método de Draize, y se emplearon como biomodelos conejos albinos. El valor resultante del IIP fue de 0, al no observarse signos de irritación cutánea en los animales tratados. Se apreciaron efectos conjuntivales ligeros, que desaparecieron en un periodo de 72 h. El IIO obtenido fue menor que 10, por lo cual se concluye que la formulación de EGF no es irritante y se avala su uso en la terapia.

Palabras claves: irritabilidad dérmica, irritabilidad oftálmica

Introducción

La epidermis constituye la primera línea de defensa ante exposiciones físicas, químicas y térmicas. A pesar de esto, el hombre puede verse expuesto a serios daños en la piel, como resultado del contacto accidental o por el empleo diario de un producto de uso industrial, doméstico o de un medicamento. Al igual que la piel, las membranas mucosas de los ojos están sometidas al ataque de agentes externos, por lo que los compuestos químicos que tienen diferentes usos y patrones de exposición deben ser evaluados para su seguridad (1).

En 1944, Draize y colaboradores (2), propusieron el test de irritabilidad dérmica primaria y un sistema de gradación para los posibles efectos causados en la piel. A pesar de ser un método utilizado en la actualidad, existe un conjunto de regulaciones (3-6) que lo han modificado con el objetivo de proteger al hombre. Aunque algunos investigadores tratan de simplificar el problema de la irritabilidad provocada por contacto accidental al ensayar una sustancia que se aplica sobre la piel, el científico debe suponer que toda sustancia química puede ser un potente irritante dérmico (7).

El factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (EGF-hr) es una simple cadena poli-

peptídica de 53 restos aminoácidos y un peso molecular de 6045 Da que fue aislada inicialmente de la glándula submaxilar (8).

Los estudios preliminares sobre el EGF han demostrado sus propiedades en lo que a maduración y mitosis se refiere (9). Otras evidencias han probado que el EGF no es sólo un factor de inducción mitótica sino además un elemento promotor de la migración celular (10).

Distintas investigaciones plantean su posible uso en Oftalmología (11), tratamiento de úlceras gástricas (12), Oncología (13) y en el tratamiento de quemaduras, en los cuales se logró una reducción significativa del tiempo de cicatrización.

El objetivo de este ensayo consistió en evaluar el efecto potencial de irritación local dérmica y el grado de irritabilidad oftálmica producida por este medicamento en conejos albinos, después de una sola administración.

Materiales y Métodos

La crema compuesta por 10 mg/g de principio activo de EGF-hr, sulfadiacina de plata al 1 % y excipiente hidrófilo, se empleó en el estudio de irritabilidad

1. Henkes H, Canta LR. Drug-induced disorders of the eye. In: *Excerpta Medica. Proceedings of the European Society for the Study of Drug Toxicity*, edited by WAM Duncan. Elsevier/North-Holland, NY 1973;14:146-153.

2. Draize J, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharm Exp Ther* 1944;82: 377.

3. EPA. Proposed guidelines for registering pesticides in the US, hazard evaluation: human and domestic animals. *Fed Reg* 1978;43:37336.

4. OECD. Data interpretation guides for initial hazard assessment of chemicals. OECD, 1984. Paris.

5. EEC. Council Directive 79/831/EEC (September 18). Annex V, Part B: Methods for the determination of toxicity. Annex VII: 4.1.5. Acute toxicity, skin irritation. *Off. J Europ Common* 1979;22, (L 259), 10.

6. EEC. Directiva 79/831/EEC. Anexos VII y VIII, Parte B: Métodos para la determinación de la toxicidad. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*. 1992;N L 383 A/107.

✉ Autor de correspondencia

dérmica. El EGF-hr se utilizó a una concentración de 10 µg/mL en el ensayo de irritabilidad oftálmica. Tanto la crema, como el principio activo EGF-hr, fueron producidos por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, La Habana).

La fluoresceína sódica se obtuvo de BDH Chemicals Ltd Poole, Inglaterra. Los componentes del colirio (cloruro de benzalconio, alcohol benzílico y alcohol feniletílico) fueron suministrados por la Industria Médico Farmacéutica (IMEFA, La Habana).

Animales

Se emplearon 21 conejos albinos, machos, de 2,5 kg de peso corporal, procedentes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana), distribuidos de la siguiente forma: tres animales para el ensayo de irritabilidad dérmica y dieciocho para el estudio de irritabilidad oftálmica.

Métodos

Se realizaron los ensayos de irritabilidad en el siguiente orden:

1. Estudio de irritabilidad dérmica.

La piel de los animales fue tratada siguiendo los lineamientos trazados por la Comunidad Económica Europea (CEE) (6). Veinticuatro horas antes del inicio del ensayo se depilaron la espalda y los flancos de cada animal y se seleccionaron los animales de piel sana, teniendo en cuenta lo planteado por Nixon y colaboradores en 1975 (14) acerca de la posibilidad de que una reacción más severa puede ser esperada en piel dañada, lo cual hace que el modelo animal sea más sensible.

Una vez depilados los animales, se escogieron dos sitios por cada uno para la administración de la crema. El sitio se cubrió con un parche de gasa quirúrgica y se fijó con una cinta adhesiva hipoalérgica. Al cabo de las 4 h se retiró el vendaje y el sitio tratado se lavó con agua destilada. En cada animal se examinaron los signos de eritema y edema, así como la formación de escaras a los 60 min y a las 24, 48 y 72 h de haber retirado el parche.

Antes de aplicar la crema se determinó el pH de una preparación acuosa al 10 % de la sustancia.

2. Estudio de irritabilidad oftálmica.

Han sido propuestos muchos sistemas de clasificación para los irritantes oculares. Algunos han sido publicados en la literatura (15, 16) y en varios lineamientos de ensayo. La Organización para la Cooperación y Desarrollo (OCDE) (4) ha adoptado básicamente la interpretación de Green y colaboradores (15) y el Consejo Nacional de Investigaciones de la Ciencia de la Academia Nacional (NAS-NRC) (17).

Los ojos de los animales fueron tratados, al igual que en piel, siguiendo los lineamientos de la CEE (6). Ambos ojos (tratado y control) se examinaron

24 h antes de iniciar el ensayo añadiendo una gota de fluoresceína sódica al 2 % en cada uno se lavaron con cloruro de sodio al 0,9 % y se observaron bajo lámpara de luz ultravioleta.

La sustancia de ensayo se aplicó en el fondo del saco conjuntival y 1 h después de la aplicación, el ojo tratado se lavó con cloruro de sodio. En cada animal se examinaron los signos de lesiones corneales, de iris y conjuntiva luego de la aplicación de una gota de fluoresceína sódica en ambos ojos y la observación bajo lámpara de luz ultravioleta a los tiempos previstos (1, 24, 48, 72, 96 y 168 h) después de la aplicación.

Antes de aplicar la formulación se determinó el pH de una preparación acuosa al 10 % de la sustancia.

Se utilizaron seis animales por grupo. La composición de cada tratamiento fue la siguiente:

- Tratamiento 1. EGF-hr + alcohol benzílico al 0,5 %.
- Tratamiento 2. EGF-hr + alcohol benzílico y alcohol feniletílico al 0,9 %.
- Tratamiento 3. EGF-hr + cloruro de benzalconio al 0,01 %.

Procesamiento matemático

Se analizó y registró la reacción de piel y ojos a los tiempos referidos con anterioridad. Los valores resultantes se obtuvieron basados en el sistema de evaluación de Draize para la graduación de la intensidad de la reacción cutánea y las lesiones oculares en escalas de 0 a 4.

- Teniendo en cuenta estos valores se calculó el índice de irritación primario (IIP).

$$IIP = \sum_{t=1}^{nt} \sum_{s=1}^{ns} \sum_{a=1}^{na} (ER_{ast} + ED_{ast})$$

donde:

ER : sumatoria del número de eritema

ED : edemas observados en cada animal, sitio y en tiempo.

$a = 1 \dots na$ na : número de animales

$s = 1 \dots ns$ ns : número de sitios

$t = 1 \dots nt$ nt : número de tiempos

ER_{ast} : ER observado en el animal a , en el sitio s , en el tiempo t

ED_{ast} : ED observado en el animal a , en el sitio s , en el tiempo t

- Puntaje de las lesiones oculares (P).

$$P = A \times B \times 5 + A_1 \times 5 + (A_2 + B_1 + C) \times 2$$

donde:

A : opacidad corneal

B : área de la córnea involucrada

A_1 : iris

A_2 : eritema

B_1 : edema

C : secreciones

El máximo puntaje posible fue 110.

7. Lingk W. Registration requirements within the German Federal Health Office. *Fd Chem Tox* 1985; 23: 155.

8. Cohen S, Carpenter G. Human epidermal growth factor isolation and chemical and biological properties. *Proc Nat Acad Sci* 1975;72:1317-1321.

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

10. Nial M, Rian GB, O'Brien BM. The effect on wound healing in mice. *J Surg Res* 1982;33:164-169.

11. Chan K et al. Pharmacokinetic study of recombinant human epidermal growth factor in the anterior eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32(13):3209-3215.

12. Zandomenighi R. The role of the epidermal growth factor in the pathogenesis of peptic ulcer disease. *Am J Gastroenterol* 1991;86: 1150-1153.

13. Macías A, Pérez R, Lage A. Estudios sobre el factor de crecimiento epidérmico (FCE). I. Expresión del receptor en el cáncer mamario humano. *Interferón y Biotecnología* 1985;2: 27-40.

14. Nixon GA, Tyson CA, Wertz WC. Interspecies comparisons of skin irritancy. *Toxic Appl Pharmac* 1975;31: 481.

15. Green WR, Sullivan JB, Mehir RM. A chemically-induced eye injury in the albino rabbit and rhesus monkey. *The Soap and Detergent Association*, NY 1978.

16. Guillot J, Gonnat JF, Clement C. Evaluation of ocular irritation potential of 56 compounds. *Food Chem Toxicol* 1982;20: 573-82.

17. NAS-NRC. Dermal and eye toxicity test. In: *Principles and procedures for evaluating the toxicity of household substances*. NAS Public 1977;1138:23, NAS, Washington DC.

Tabla 1. Lesiones oculares observadas en los animales, a los diferentes tiempos por grupos de tratamiento.

| Parámetro | Tiempo (h) | Tratamiento | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | | | | | | 2 | | | | | | 3 | | | | | |
| Conjuntiva | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| A | 1 | 1 | | | | 1 | | 1 | 1 | | | | | 1 | | | | | 1 |
| | 24 | 2 | | | | 1 | | 2 | 2 | | | | | 1 | | | | | 1 |
| | 48 | 2 | | | | 1 | | 2 | 2 | | | | | 1 | | | | | 1 |
| | 72 | 1 | | | | 1 | | 1 | 1 | | | | | 1 | | | | | 1 |
| B | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 24 | 1 | | | | 1 | | 2 | 1 | | | | | 1 | | | | | |
| | 48 | 1 | | | | 1 | | 2 | 1 | | | | | 1 | | | | | |
| | 72 | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | |
| C | 1 | 1 | | | | | | 2 | 1 | | | | | 1 | | | | | 1 |
| | 24 | 2 | | | | | | 2 | 2 | | | | | 1 | | | | | 1 |
| | 48 | 2 | | | | 1 | | 2 | 1 | | | | | 1 | | | | | 1 |
| | 72 | 1 | | | | 1 | | 1 | 1 | | | | | 1 | | | | | 1 |

A: Eritema.

B: Edema.

C: Secreción.

1-6: Número de los animales del ensayo por grupo de tratamiento.

Tratamiento 1, 2 y 3: Grupos de tratamiento.

Resultados y Discusión

Estudio de irritabilidad dérmica

Al determinar el pH de la crema se obtuvo un valor de 8,3, el cual se encuentra en el rango de aceptación planteado por las agencias regulatorias que eliminan todas aquellas sustancias con pH menores que 2,5 y mayores que 11,5.

En los animales tratados no se encontraron signos de irritación cutánea, a pesar de haber realizado el experimento a una concentración de 10 mg/g de crema, lo cual supera la forma de aplicación en la clínica, que es la crema de Hebermin con 10 µg/g; con ello se obtuvo obteniéndose un índice de irritabilidad dérmica igual a 0.

Se ha planteado que el conejo, a pesar de ser el modelo experimental empleado en los ensayos, tiende a exagerar la respuesta (18) y reacciona de forma más sensible que el hombre a varias sustancias químicas. De ahí que la sustancia fue denominada *NO IRRITANTE* según la clasificación de Draize (2), lo cual avala su uso en la terapia contra quemaduras así como en cosméticos.

Estudio de irritabilidad oftálmica

Al determinar el pH de la formulación se obtuvo un valor de 8, que se encuentra en el rango de aceptación planteado por las agencias regulatorias.

Al interpretar los resultados de la evaluación final para la irritabilidad oftálmica, se debe tener en cuenta la significación biológica de los cambios oculares.

Existen cuatro categorías de datos generados por el ensayo de Draize que son considerados cuando se interpretan los resultados: tipos de efectos oculares, severidad, reversibilidad y rango de incidencia (4). Todas estas categorías están interrelacionadas. Los puntajes individuales no representan un estándar absoluto de la irritación de un material (19).

En la Tabla 1 pueden observarse los signos por animal para los diferentes grupos de tratamiento. En los grupos de tratamiento 1 y 2, los signos evidenciados fueron eritema, edema y secreción en dos animales, mientras que en el tratamiento 3 pudo apreciarse fundamentalmente, eritema y secreción de grado 1 en dos animales. Al analizar la severidad de los daños, se obtuvieron los siguientes índices: 2,0, 3,0 y 1,6 para los tratamientos 1, 2 y 3, respectivamente.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos y la clasificación según el método cubano (20) (*no irritante, ligeramente irritante, moderadamente irritante e irritante severo*), podemos clasificar las tres formulaciones oftálmicas como *NO IRRITANTES*.

En las formulaciones estudiadas, los efectos oculares observados fueron ligeros y desaparecieron en un período de 72 h. Si tenemos en cuenta los efectos oculares, el rango de incidencia y la reversibilidad, podemos concluir que la tercera formulación es la más adecuada para su uso en preparaciones oftalmológicas.

18. Rondabush RL, Terhaar CJ, Fasseti DW, Dziuba SP. Comparative acute effects of some chemicals on the skin of rabbits and guinea pigs. *Toxic Appl Pharmac* 1965;7:559.

19. Chan PK, Wallace A. Principles and methods for acute toxicity and eye irritancy. In: *Principles and methods of toxicology*. Ed. A. Wallace. Raven Press, NY. 1989;6:169-220.

20. García S et al. Elaboración de una metodología para evaluar irritabilidad oftálmica. Validación con distintos métodos. *Revista Cubana de Farmacia* 1988;22:5.