

## Efecto Sobre las Glándulas Sebáceas en Oreja de Hámsters y Evaluación Toxicológica Preclínica de Cremas Conteniendo Bioglea

Alicia LAGARTO\*, Raimara GONZÁLEZ, Viviana BUENO, Raiza VEGA, Nilia de la PAZ, Iván MORALES, Yamile VEGA, Carmen CARRILLO, Reina PIMIENTA & Isbel GUERRA

UCTB Control Biológico. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos.  
Calle 17 N° 6208 e/ 62 y 64. Playa. Ciudad de La Habana, Cuba.

**RESUMEN.** La bioglea es un producto natural que se obtiene en balnearios de aguas minerales. Se realizó la evaluación del efecto antiacné e irritación dérmica y ocular de dos cremas cuyo principio activo es la bioglea a las concentraciones de 2,5 y 5%. En la evaluación toxicológica se realizaron los ensayos de irritación ocular y dérmica siguiendo la metodología descrita por las normas N° 404 y 405 de OECD. En el ensayo de irritación dérmica fueron aplicados 0,5 g de las cremas sobre la piel de tres conejos albinos Nueva Zelanda machos. En el ensayo de irritación ocular se aplicaron 0,1 g de las cremas sobre las estructuras oculares de tres conejos. Para la actividad farmacológica fueron aplicados, vía dérmica, 0,1 g de las cremas sobre la oreja derecha de hámsteres Sirios Dorados hembras estimulados androgénicamente por inyección intramuscular de 80 µg/ml de propionato de testosterona, con el objetivo de evaluar su efecto antiacné. La crema de bioglea a las dos concentraciones calificaron como no irritantes para el ensayo de irritación dérmica y ocular. La estimulación androgénica produjo un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) del área de las glándulas sebáceas respecto al grupo no estimulado androgénicamente. Las dos concentraciones de bioglea administradas produjeron una significativa disminución ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ ) del tamaño de las glándulas sebáceas de la oreja de hámsteres estimulados androgénicamente. El efecto obtenido fue sistémico debido a la semejanza en el tamaño de las glándulas sebáceas entre las orejas tratadas con las cremas y las orejas no tratadas. De acuerdo con los resultados obtenidos con las cremas de bioglea pueden ser empleadas en la terapia antiacné.

**SUMMARY.** "Effect on Sebaceous Glands of Hamsters Ears and Pre-clinic Toxicological Evaluation of Creams Containing Bioglea". Bioglea is a natural product obtained from mineral water resorts. We evaluated anti-acne effect, eye and dermic irritation of two creams with bioglea as active substance at concentrations of 2.5 and 5 %. Eye and dermic irritation test was conducted according to the OECD N° 404 and 405 Guidelines. In dermal irritation assay 0,5 g of the creams was applied on the skin of three male New Zealand albino rabbits. In eye irritation assay 0,1 g of the creams were applied on the ocular structures of three rabbits. For antiacne activity assay 0,1 g of the creams was applied on right pinna of female Syrian golden hamsters androgenic stimulated by 80 µg/ml testosterone propionate intramuscular injection. In eye and dermic irritation tests both concentrations of Bioglea creams were classified as non-irritant. Androgenic stimulation cause a significant increase ( $p < 0,001$ ) in sebaceous glands size when compared with the androgenic non-stimulated group. Both concentrations of Bioglea caused significant decrease ( $p < 0,05$  and  $p < 0,01$ ) in sebaceous glands size of androgenic stimulated hamsters pinna. The effect observed was systemic due to similar sebaceous glands size of creams treated side and untreated side. According to these results Bioglea creams will can be use in antiacne therapy.

### INTRODUCCIÓN

Por milenios las aguas y fangos minerales han sido considerados fuente inagotable de bienestar para el organismo, por su contenido en sales y además por la presencia en ellas de sustancias biogénicas orgánicas, activadoras de la vitalidad, estimulantes celulares y protectoras de

la piel. Esta rica composición le confiere propiedades curativas que son muy útiles en el tratamiento de enfermedades reumáticas como osteoartritis, osteoartrosis, artritis reumatoide<sup>1,2</sup> y dermatológicas como psoriasis, dermatitis atópica, envejecimiento de la piel, trastornos sebóreos, serosis idiopática, acné y urticaria<sup>3-5</sup>.

**PALABRAS CLAVE:** Actividad antiacné, Bioglea, Cremas, Irritación ocular, Irritación dérmica.

**KEY WORDS:** Antiacne effect, Bioglea, Creams, Dermic irritation, Eye irritation.

\* Autora a quien debe ser enviada la correspondencia. E-mail: cinfa@infomed.sld.cu

La bioglea es un compuesto activo que se ha obtenido en el balneario de San Diego de los Baños de la provincia de Pinar del Río. Se ha reportado que la bioglea está constituida por polisacáridos, azufre inorgánico, yodo, vitaminas, lípidos y nitrógeno proteico. Posee propiedades hidratantes, emolientes y revitalizantes de la piel por lo que se la puede emplear en tratamientos cosméticos, siendo de utilidad para el acné, la seborrea y la celulitis <sup>6</sup>.

El acné vulgaris consiste en un aumento de la actividad de las glándulas sebáceas con cornificación (hiperqueratosis) del folículo piloso que origina la formación del comedón, pequeña masa cornea engastada en el orificio folicular, la que se infecta e inflama secundariamente produciendo pápulas, pústulas, nódulos y finalmente cicatrices <sup>7</sup>. Afecta a alrededor del 80% de la población entre las edades de 11 a 30 años. Puede persistir por años y produce desfiguración y cicatrices permanentes que provocan afectaciones en el desarrollo psicosocial, problemas emocionales y depresión <sup>8</sup>.

En nuestro centro se formuló una crema empleando como principio activo la bioglea obtenida del balneario de San Diego de los Baños en la Provincia de Pinar del Río, con el objetivo de emplearla en la terapia del acné. El presente trabajo tiene como objetivo la evaluación del efecto antiacné y el potencial irritante de dos concentraciones de la crema de bioglea en animales de experimentación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Sustancia de prueba*

Las cremas de bioglea empleadas en el ensayo fueron elaboradas en la UCTB Tecnologías Básicas del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), a partir de la bioglea obtenida del balneario de San Diego de los Baños, Pinar del Río. Se emplearon dos concentraciones: 2.5 y 5% en una base emulsionada aceite en agua (excipiente lavable). Ambas fueron sometidas a conteo microbiológico cumpliendo los requerimientos de este ensayo. Como control positivo para el ensayo de determinación de efecto antiacné se empleó la crema Natural Cusí procedente de Laboratorios Cusí SA, Natural Division, El Masnou, Barcelona, España.

### *Animales*

Para la determinación del potencial irritante ocular y dérmico se emplearon conejos albinos Nueva Zelandia machos, con un peso de entre 1,8 y 2,0 kg. Para el ensayo farmacológico se

emplearon hámster Sirios Dorados hembras con 110-120 g de peso corporal. Todos los animales fueron provistos por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) y mantenidos en bioterio con temperatura controlada de  $20 \pm 2$  °C con un ciclo de luz /oscuridad de 12-12 h. La alimentación consistió en dieta estándar para roedores y conejos y agua a voluntad.

### *Evaluación toxicológica*

#### *Ensayo de irritación ocular*

Este ensayo se llevó a cabo según lo descrito por la norma N° 405 de la OECD <sup>9</sup>. Para el mismo se emplearon tres conejos por cada formulación, los que fueron sometidos, en las 24 h previas al ensayo, a un examen riguroso de sus estructuras oculares (córnea, iris y conjuntiva) para descartar la presencia de algún daño. El día del ensayo fue instilado 0,1 g del material de prueba en el ojo derecho; el ojo izquierdo fue tomado como control. Ambos ojos fueron examinados aproximadamente a las 1, 24, 48 y 72 h posteriores a la aplicación inicial para detectar la presencia de eritema, edema, secreciones anormales, reacción del iris a la luz y alteraciones de la córnea. Posteriormente se procedió a la determinación del Índice de Irritación Ocular y a la clasificación de las sustancias de acuerdo a las siguientes categorías <sup>10</sup>:  $0 \leq x < 10$  no irritante,  $10 \leq x < 20$  irritante ligero,  $20 \leq x < 30$  irritante moderado,  $30 \leq x \leq 110$  irritante severo.

#### *Ensayo de irritación dérmica*

Este ensayo se llevó a cabo según lo descrito en la norma OECD N° 404 <sup>11</sup>. El día antes del ensayo los animales fueron depilados y rasados en el área dorsal del lomo a una distancia suficiente de la columna vertebral para proceder a la aplicación y observación de los sitios de ensayo. Se seleccionaron tres conejos con la piel intacta por cada sustancia de prueba, a los cuales se les aplicó 0,5 g de la sustancia sobre la piel durante 4 h. Los respectivos sitios de aplicación fueron cubiertos con sendos parches de gasa que fueron adheridos a la piel con cinta hipoalérgica. Al finalizar este período los parches fueron retirados y, una vez marcado el sitio de aplicación, se removieron los remanentes de la sustancia en ensayo empleando agua estéril.

Las observaciones se realizaron a las 0,5; 1; 24; 48 y 72 h después de la remoción del parche, registrándose las reacciones sobre la piel para eritema y edema, que fueron empleadas para el cálculo del índice de irritación. Las cremas fueron clasificadas según el índice de irritación obtenido y de acuerdo a la siguiente escala <sup>12</sup>: 0-0,4

no irritante, 0,5-1,9 irritante ligero, 2,0-4,9 irritante moderado y 5,0-8,0 irritante severo.

### **Evaluación Farmacológica**

Los hámsters fueron divididos en 5 grupos de ensayo con 5 animales cada uno, según el siguiente esquema <sup>13</sup>: Grupo I, Control (no estimulado androgénicamente); Grupo II, Estimulación androgénica; Grupo III, Estimulación androgénica + Crema de bioglea 2,5%; Grupo IV, Estimulación androgénica + Crema de bioglea 5%; Grupo V, Estimulación androgénica + Crema Natural Cusí.

#### **Estimulación androgénica**

La estimulación androgénica se llevó a cabo administrando intramuscularmente 80 µg de propionato de testosterona disuelto en 1 ml de aceite vegetal a los grupos II al V, en días alternos durante 14 días. Los animales del grupo I fueron inyectados con 1 ml de aceite vegetal <sup>13</sup>.

#### **Aplicación de la sustancia de prueba**

A los grupos III al V se les administró además con 0,1 g de la crema correspondiente según el esquema de tratamiento, en el lado ventral de la oreja derecha durante 14 días. La oreja izquierda no recibió tratamiento alguno sirviendo como control <sup>13</sup>.

El día 15 fueron sacrificados los animales por inyección intraperitoneal de 80 mg/kg de pentobarbital sódico con el objetivo de extraer las orejas completas para ser procesadas histopatológicamente y determinar el tamaño de las glándulas sebáceas <sup>13</sup>.

#### **Determinación del tamaño de las glándulas sebáceas**

A cada oreja obtenida se le retiró el cartílago con ayuda de una pinza fina y se procedió a incubarla a temperatura ambiente durante 1 h en solución de cloruro de calcio 1M, con el propósito de separar la dermis de la epidermis. La dermis obtenida fue teñida con coloración especial Sudán III, para la observación microscópica de un área de 5 o más glándulas sebáceas, la cual incluye todos los acinos sebáceos ligados a una unidad polisebácea en cada espécimen.

El tamaño de las glándulas sebáceas fue determinado con un analizador de imágenes SAM-SUMG, con programa diseñado para estudios morfométricos denominado DIGIPAT.

Los tamaños de las glándulas sebáceas fueron dados en µm<sup>2</sup> y expresados como la media ± desviación estándar. La comparación estadística se realizó mediante un test Anova de clasificación simple y un test de Duncan, tomando una significación de  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Evaluación toxicológica**

#### **Ensayo de irritación ocular**

A la hora posterior a la administración de la crema de bioglea 2,5% se observó la presencia de eritema, edema y secreciones en todos los animales, así como lesiones de grado 3 a nivel de la córnea en uno de los animales. Al cabo de las 24 h las lesiones conjuntivales desaparecieron en dos de los animales y en el tercer animal se mantuvieron pero en menor grado. Las alteraciones observadas en la córnea desaparecieron a las 48 h posteriores, tiempo al cual no se observaron alteraciones en la mucosa ocular de los animales. El Índice de Irritación Ocular fue de 3,91, correspondiéndose con una clasificación de No Irritante.

La administración de la crema al 5% provocó eritema de grado 1 y secreciones de grado 2 a la hora posterior a la administración, así como lesiones de grado 2 a nivel de córnea en todos los animales. Al cabo de las 24 h las lesiones conjuntivales y de córnea desaparecieron. El valor obtenido de Índice de Irritación Ocular fue de 4,33, clasificándose como No Irritante.

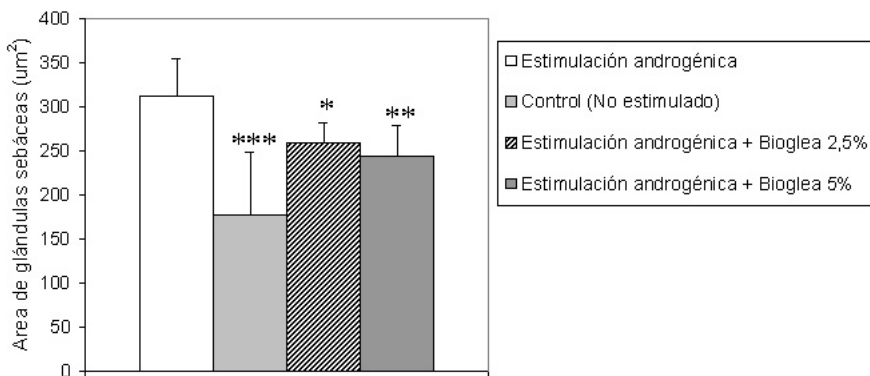
#### **Ensayo de irritación dérmica**

A las 24 h posteriores a la administración se observó eritema de grado 3 en un animal para la crema de bioglea 2,5% y de grado 2 para la crema de bioglea 5%. Estas alteraciones disminuyeron gradualmente y al cabo de las 72 h habían desaparecido. En los animales restantes no se observaron signos de toxicidad. El Índice de Irritación Primario fue de 0,55 y 0,33 para las cremas de bioglea al 2,5 y 5%, correspondiéndose con una clasificación de Irritante Ligero y No Irritante respectivamente.

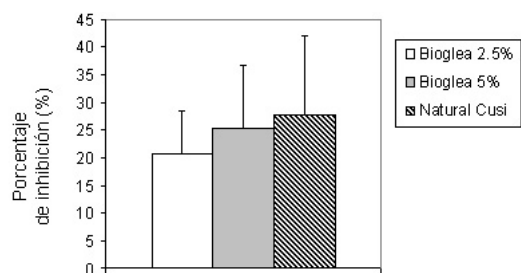
### **Evaluación farmacológica**

En la Figura 1 se observan los resultados obtenidos al comparar el tamaño de las glándulas sebáceas de la oreja tratada para cada grupo experimental. En la misma se aprecian diferencias altamente significativas ( $p < 0,0001$ ) entre el grupo control y los grupos estimulados androgénicamente, lo cual indica la efectividad de la estimulación androgénica.

También obtuvimos una disminución significativa del tamaño de las glándulas sebáceas en los grupos tratados con la crema de bioglea 2,5% ( $p < 0,05$ ), crema de bioglea 5% ( $p < 0,01$ ) y crema Natural Cusí ( $p < 0,001$ ) respecto del grupo estimulado androgénicamente. El tamaño de las glándulas sebáceas en los grupos tratados con las cremas de bioglea 2,5 y 5% fue significa-



**Figura 1.** Area de glándulas sebáceas de la oreja de hámster. Diferencias significativas respecto al grupo estimulado androgénicamente \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.01$ . \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figura 2.** Porcentaje de inhibición obtenidos para cada grupo de tratamiento. No se observaron diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0.05$ ).

tivamente mayor que en el grupo control ( $p < 0.01$  y  $p < 0.05$  respectivamente). Estos efectos no fueron significativamente diferentes entre las dos cremas de bioglea y la crema Natural Cusi, siendo similares el tamaño de las glándulas sebáceas de la oreja tratada para estos tres grupos.

En la Figura 2 se observa el por ciento de inhibición para los grupos tratados, no existiendo diferencias significativas entre los resultados para cada grupo de tratamiento ( $p < 0,05$ ). Los resultados obtenidos al comparar el tamaño de las glándulas sebáceas de la oreja tratada y no tratada en los grupos III al V se observan en la Tabla 1. En ninguno de los grupos se observaron diferencias significativas en el tamaño de las glándulas sebáceas entre las orejas tratadas y no tratadas. Este comportamiento reflejó la absorción de las cremas en los grupos bajo tratamiento.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La medicina natural ha mostrado ser promisoría en el tratamiento de una variedad de trastornos dermatológicos que incluyen inflamación, fototoxicidad, psoriasis, dermatitis atópica, alopecia aerata y liquen plano <sup>4,14</sup>. El efecto de las sales sobre la piel no se debe solamente a efectos físicos, sino que también son el resultado de la penetración de los minerales al organismo y de las acciones farmacológicas definidas que ejercen las sales sobre las células de la

| Tratamiento        | Oreja tratada (µm²) | Oreja no tratada (µm²) |
|--------------------|---------------------|------------------------|
| Bioglea 2,5% cream | 260,33 ± 20,75      | 248,46 ± 27,68         |
| Bioglea 5% cream   | 248,7 ± 40,77       | 237,55 ± 31,34         |
| Natural Cusi cream | 240,44 ± 36,13      | 206,89 ± 47,90         |

**Tabla 1.** Tamaño de las glándulas sebáceas en las orejas tratadas y no tratadas para cada grupo experimental (µm²). No se observaron diferencias significativas entre las orejas tratadas y no tratadas ( $p < 0.05$ ).

piel <sup>14-15</sup>. Diferentes estudios han demostrado la efectividad de las sales en el tratamiento de enfermedades tales como la psoriasis <sup>4, 16</sup>.

Las hormonas masculinas que se encuentran tanto en el hombre como en la mujer aumentan durante la adolescencia estimulando e incrementando las glándulas sebáceas de la piel, que se produce por la unión de la dihidrotestosterona a receptores androgénicos en la piel. Este es uno de los factores de la patogénesis del acné vulgaris <sup>13</sup>. Para el estudio del efecto de agentes terapéuticos sobre las glándulas sebáceas se ha usado ampliamente el modelo biológico que emplea las glándulas sebáceas de la oreja y flanco lateral del hámster <sup>13,17</sup>.

El efecto obtenido al administrar las cremas de bioglea en oreja de hámsteres estimulados androgénicamente fue significativo y similar a la crema Natural Cusi (Laboratorios Cusi SA, España), empleada como control positivo, que ejerce su efecto por disminución de la secreción sebácea. El efecto obtenido a las dos dosis administradas de bioglea fue estadísticamente semejante, aunque se puede apreciar un mayor porcentaje de inhibición en el grupo tratado con la crema al 5%. Ambas dosis además, produjeron un efecto que no fue diferente del obtenido para el control positivo de acuerdo al test estadístico empleado.

El azufre ha sido empleado en tratamientos locales tópicos contra el acné, por sus conocidas propiedades antisépticas y queratolíticas <sup>18</sup>.

Es probable que el contenido de este elemento en la bioglea juegue un importante papel en sus propiedades de inhibición de la secreción sebácea mostradas en este estudio. La bioglea, entre otros componentes, contiene azufre orgánico e inorgánico. La misma posee propiedades humectantes, emolientes y revitalizantes sobre la piel, por lo que puede emplearse en tratamientos cosméticos y ser beneficioso en la terapia del acné, la seborrea y la celulitis <sup>6</sup>.

La eficacia de la bioglea para el tratamiento de la psoriasis ha sido estudiada empleando una matriz derivada de la microflora de aguas y fangos termales con altas concentraciones de azufre. El efecto antipsoriático ha sido atribuido a sustancias como caroteno, vitaminas hidro y liposolubles y fitosteroles. Estas sustancias no solo ejercen un efecto antiinflamatorio sino que pueden actuar sinérgicamente con los componentes minerales de la matriz termal para atenuar los síntomas de la psoriasis <sup>6</sup>.

El efecto antiacné de la crema de bioglea obtenido en nuestro estudio fue de naturaleza sistémico, evidenciado por la similitud del área de glándulas sebáceas entre las orejas tratadas y no tratadas. La eficacia del tratamiento en balnearios no sólo tiene un efecto psicológico, ya que las sales contenidas en estas aguas poseen un efecto directo en las estructuras de la piel son absorbidas en cierta medida y actúan sistémicamente <sup>19-20</sup>.

Toxicológicamente las cremas no resultaron irritantes en piel ni en ojo, avalando este resultado el empleo de dichas cremas en tratamientos dermatológicos en la terapia del acné.

Aunque la extrapolación de resultados obtenidos en animales para el empleo en humanos no refleja datos exactos, brinda una idea de la seguridad y efectividad de una nueva formulación para el tratamiento clínico. En nuestro estudio, siguiendo una metodología descrita por el Prof. Dr. Sc. Do Trung Dàm (comunicación personal) <sup>21</sup>, encontramos que las dosis de 1,2 g y 5,9 g no deberían causar efectos irritantes significativos sobre los ojos y la piel respectivamente en seres humanos. En el estudio farmacológico encontramos que sería necesaria la aplicación de 0,44 g del compuesto activo extendido sobre la piel para obtener el efecto farmacológico observado en animales <sup>22</sup>.

A modo de conclusión se puede afirmar que la crema de bioglea no produjo irritación en el ojo ni en la piel y que mostró un efecto inhibitorio del área de las glándulas sebáceas, que fue sistémico y similar en ambas concentraciones ensayadas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Van Tubergen, A. & S. Van Der Linden (2002) *Ann. Rheum. Dis.* **61**: 273-5.
2. Elkayam, O., J. Ophir, S. Brener, D. Paran, I., Wigler, D. Efron, Z. Even Paz, Y. Politi & M. Yaron (2000) *Rheumatol. Int.* **19**: 77-82.
3. Titzmann, T. & B.R. Balda (1996) *Clin. Dermatol.* **14**: 611 - 3.
4. Ozcelik, S., H.H. Polat, M. Akyol, A.N. Yalcin, D. Ozcelik & M. Marufihah (2000) *J. Dermatol.* **27**: 386-90.
5. Carabelli, A., G. De Bernardi di Valserra, M. De Bernardi di Valserra, S. Tripodi, E. Bellotti, R. Pozzi, C. Campiglia & P. Arcangeli (1998) *Clin. Ter.* **149**: 271-5.
6. Mazzulla, S., R. Chimenti, S. Sesti, S. De Stefano, M. Morrone & G. Martino (2004) *Clin. Ter.* **155**: 499-504.
7. Healy, E. & N. Simpson (1994) *Br. Med. J.* **308**: 831-3.
8. Solish, N., M. Raman & V. Pollack (1998) *J. Cutan. Med. Surg.* **2**: 24-32.
9. OECD N° 405 (2002) *Guideline for testing of chemical. Acute eye irritation / corrosion.*
10. García, G., M. Palacios, R. Gazapo & L. Pérez (1988) *Rev. Cub. Farm.* **22**: 5.
11. OECD N° 404 (2002) *Guideline for testing chemical. Acute dermal Irritation / corrosion.*
12. ISO 10993 (2000) *Biological Evaluation of Medical Devices. Part. 10. Test for irritation and sensitization*, págs. 8-13.
13. Taisuke, S., T. Takashi & M. Masaaki (1995) *J. Dermatol.* **22**: 233-7.
14. Levin, C. & H. Maibach (2002) *Arch. Dermatol.* **138**: 207-11.
15. Hercogova, J., E. Stanghellini, E. Tsourelis-Nikita & G. Menchini (2002) *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **16**: 263-6.
16. Tsourelis-Nikita, E., G. Menchini, I. Ghersetich & J. Hercogova (2002) *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **16**: 260-2.
17. Plewig, G. & C. Luderschmidt (1977) *J. Invest. Dermatol.* **68**: 171-6.
18. Breneman, D.L. & M.C. Ariano, (1993) *Int. J. Dermatol.* **32**: 365-7.
19. Cecchetti, M., S. Bellometti, A. Lalli & L. Galzigna (1995) *Phys. Rheabil. Kur. Med.* **5**: 92-3.
20. Galzigna, L., C. Moretto & A. Lalli (1996) *Bio-med. Pharmacother.* **50**: 306-8.
21. Do Trung Dàm (2000) Departamento de Farmacología y Bioquímica del Instituto de Materia Médica, Hanoi, Viet Nam. *Comunicación personal.*
22. Malarca, H. (1987) *Bases para la Investigación Biomédica*. Distribuidora y Editora Mexicana. México DF., págs 87-88.