

ADMINISTRACIÓN TRANSDÉRMICA DE TINTA CHINA CON TDES

Modelo experimental en cobayas

A. FRUCTUOSO MARTÍNEZ
F. HIDALGO BONACHE
J. V. BOLARÍN LUCAS
J. YÁNEZ GASCÓN
M. ALCARAZ BAÑOS
V. VICENTE ORTEGA

CÁTEDRAS DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y
RADIOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA,
UNIVERSIDAD DE MURCIA, ESPAÑA

Resumen

Realizamos el estudio experimental de la administración transdérmica de tinta china mediante el equipo TDES (Dercont-Dell®, Murcia, España) en cobayas.

Aplicamos 5 ml de la suspensión de tinta china al 5% en liposomas de lecitina de soja sobre una zona de 3 x 6 cm del lomo de cobayas, mediante el cabezal emisor de ondas electromagnéticas del equipo TDES, durante 20 minutos. Por otro lado, aplicamos a algunos de los animales controles la tinta china sin las ondas electromagnéticas, y a otros, el cabezal con ondas sin tinta china.

Realizamos el estudio microscópico óptico y electrónico mediante biopsias en sacabocados tomadas inmediatamente después del tratamiento, a las 24, 48, 72 y 96 horas, y a los 26 días.

El resultado más relevante en las zonas tratadas fue el hallazgo de depósitos de tinta china en epidermis y dermis, que eran más extensos a partir de las 24 horas. No observamos alteraciones morfológicas ópticas ni ultraestructurales, lo que demuestra la idoneidad del modelo experimental puesto a prueba.

Introducción

La denominada vía transdérmica representa una alternativa a las vías tradicionales de administración de principios activos y fármacos, con las ventajas de su fácil accesibilidad y disponibilidad, además de sus efectos sistémicos, como lo demostrado en estudios con hormonas, vasodilatadores, bloqueantes de receptores, etcétera. Estas características permiten evitar, por lo tanto, los efectos colaterales indeseables de las otras vías.¹⁻³ Uno de los inconvenientes más importantes es que el paso de numerosas sustancias a través de la piel es muy lento o escaso, por lo que durante la última década se han efectuado diversas investigaciones dirigidas a desarrollar procedimientos, tanto químicos como físicos, que faciliten el paso a través de la piel.⁴ Entre estos últimos se destaca la iontoforesis, capaz de introducir determinadas sustancias a través de la piel mediante corrientes de bajo voltaje por un mecanismo de electropulsión. Sin embargo, existe el riesgo de que origine reacciones adversas, con formación de radicales libres; por ello es importante conocer la polaridad de las sustancias y, además, hidratar bien la piel.

Otra técnica más reciente es la electroporación, que, a través de cargas eléctricas u ondas electromagnéticas, es capaz de introducir sustancias por un mecanismo de electroporación de la membrana celular, sin riesgo de ionización. Mediante pulsos cortos de alto voltaje origina un cambio temporal en la permeabilidad de la membrana celular, a diferencia de la iontoforesis, y permite, así, el paso de iones y moléculas de mayor tamaño, como péptidos, proteínas, etcétera.⁵⁻⁸

El objetivo de nuestro trabajo es demostrar experimentalmente la incorporación transdérmica de tinta china en cobayas, mediante el emisor de ondas electromagnéticas de alta frecuencia TDES (Dercont Dell®, Murcia, España).

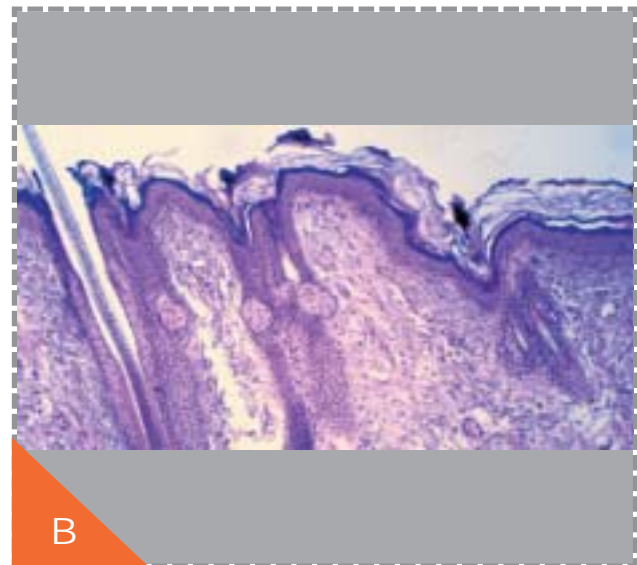
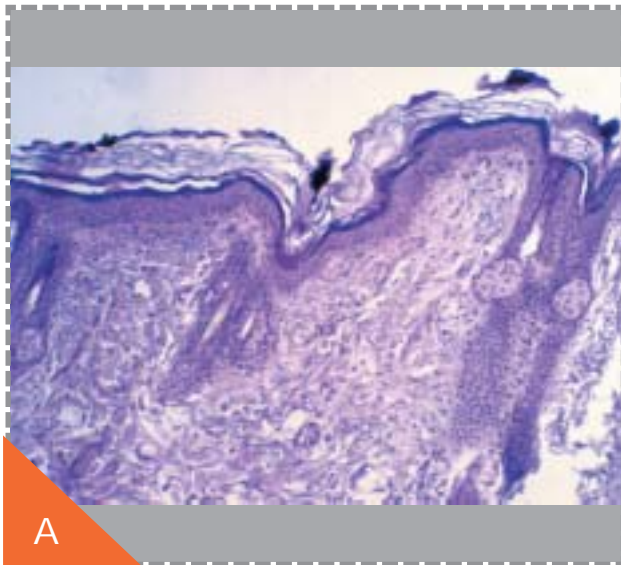
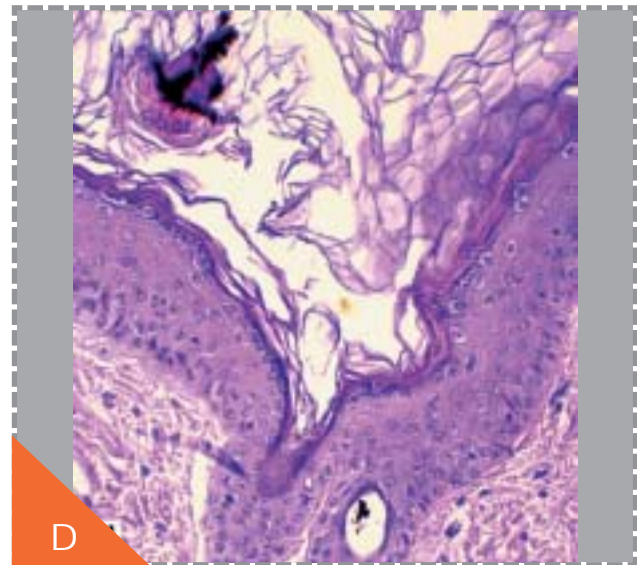
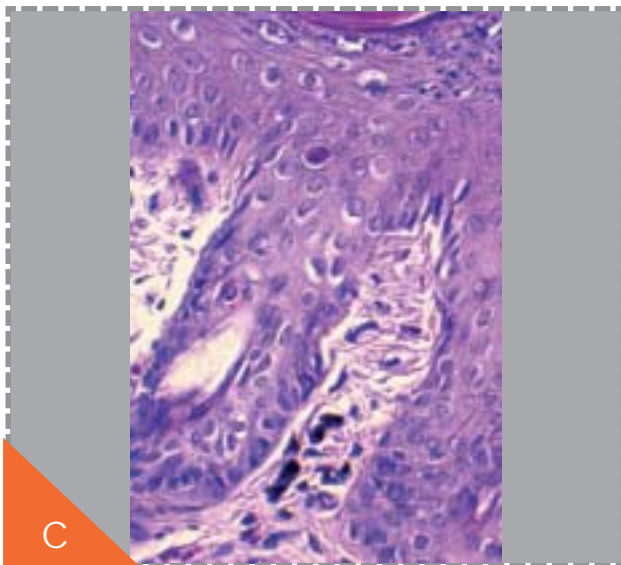


Figura 1. Características microscópicas.

A) Microscopia óptica control A: depósitos de tinta china en la superficie del estrato córneo que muestran el típico aspecto en hojal-dre (H.E. 125X).

B) M.O.: inmediatamente después del tratamiento.



C) M.O.: zona tratada a partir de las 24 horas. Pigmento en macrófa-gos de la dermis papilar (H.E. 500X).

D) M.O. ídem: depósitos de pigmento en estrato córneo con imagen en hojal-dre, epidermis y folículo piloso (H.E. 312,5X).

Material y métodos

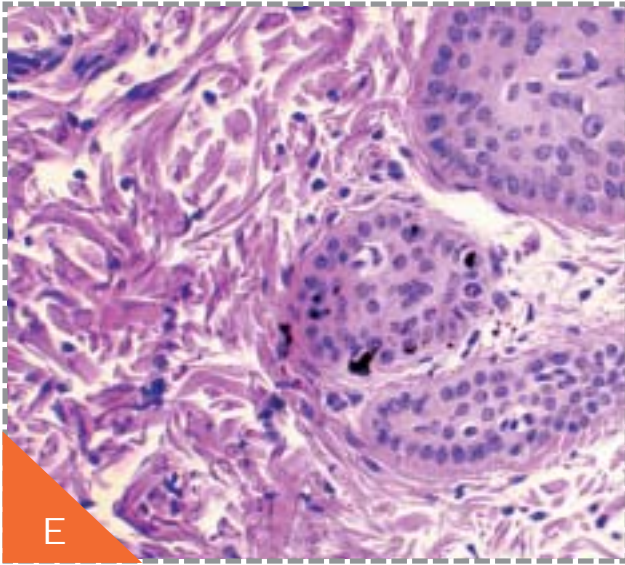
Hemos utilizado 10 cobayas (5 tratadas y 5 controles) del animalario (SACE) de la Universidad de Murcia (licencia nº 30030 2-AB del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, orden 13-10-1988).

Los animales fueron sedados con 0,3 ml de clorhidrato de ketamina por vía intramuscular (Imalgene 1000, Merial®). Posteriormente, rasuramos una zona del lomo, la lavamos con jabón neutro y la secamos. A continuación, aplicamos

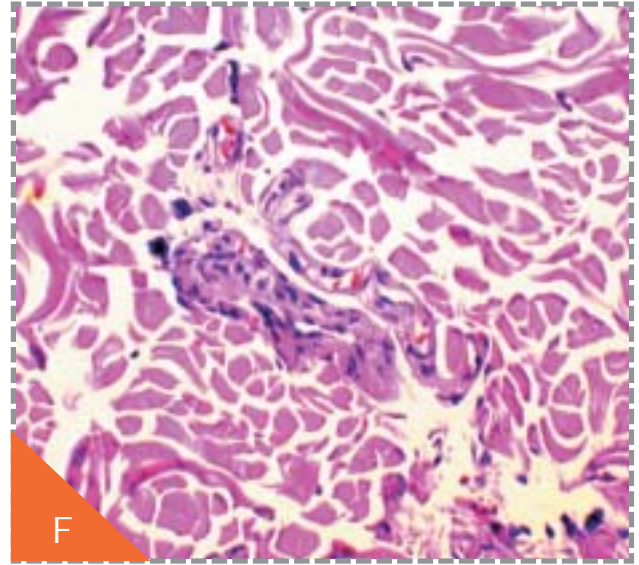
mediante goteo 5 ml de la suspensión de tinta china al 5% en liposomas de lecitina de soja, en una zona cutánea rasurada de 3 x 6 cm, y deslizamos el cabezal emisor del aparato de ondas electromagnéticas de alta frecuencia TDES durante 20 minutos. Una vez terminada la sesión, procedimos de nuevo a lavar la zona tratada con jabón neutro y a secarla.

Con los animales control, realizamos a su vez 2 grupos:

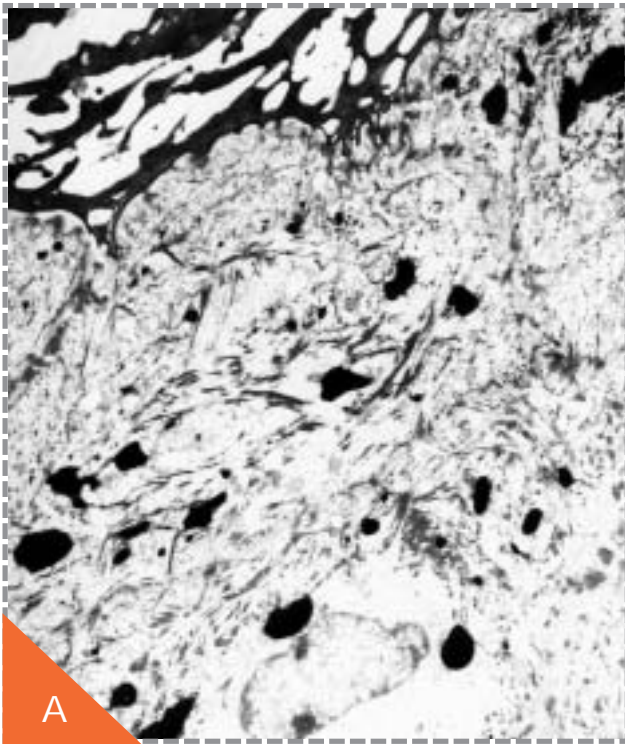
A. En uno, aplicamos la suspensión de tinta china ya descrita en una zona cutánea de características similares, con el cabe-



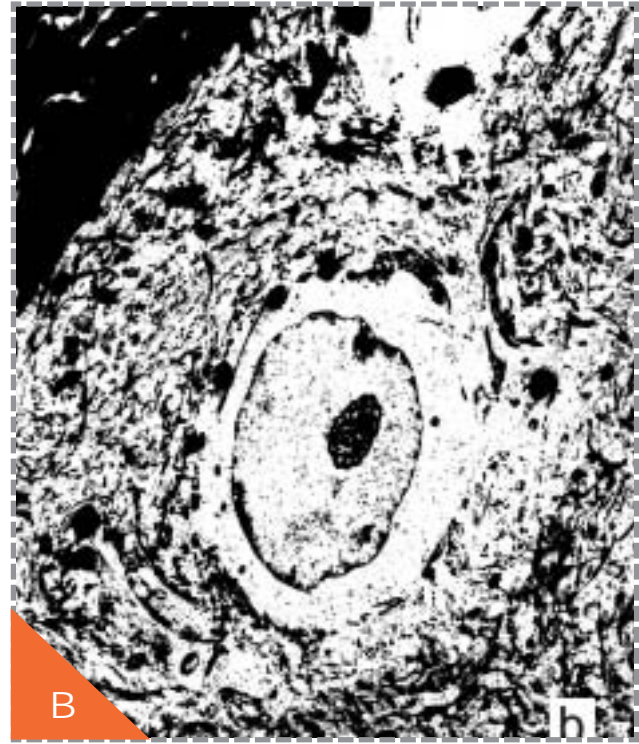
E) M.O. idem: pigmento en folículo piloso y dermis (H.E. 200X).



F) M.O. idem dermis: pigmento alrededor de los vasos y entre las fibras (H.E. 230X)



A) Estrato córneo y granuloso: partículas de tinta china de borde angular y gránulos de queratohialina redondeados (3850X)



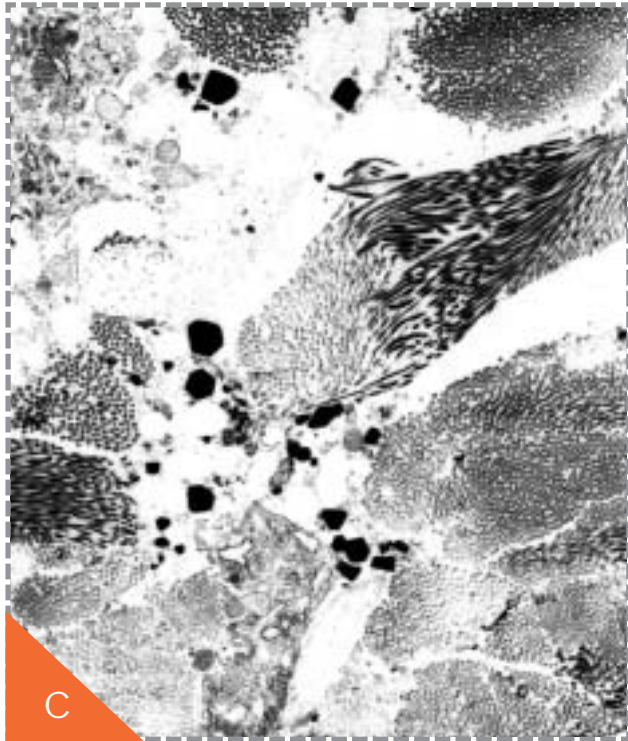
B) Detalle de las partículas de tinta china en queratinocito del estrato granuloso y entre los tonofilamentos (4250X).

zal, sin emitir ondas electromagnéticas (equipo desconectado) y durante el mismo tiempo.

B. En otro, aplicamos el cabezal con emisión de ondas en una zona cutánea de similares condiciones, pero sin administrar la tinta china.

Realizamos biopsias en sacabocados de las zonas cutáneas tratadas y controles, inmediatamente después del tratamiento, a las 24, 48, 72, 96 horas y a los 26 días.

Para el estudio microscópico óptico, las muestras fueron fijadas en formol neutro tamponado al 10%, durante al menos 24 horas,



C) Partículas de tinta china entre haces de fibras colágenas de la dermis, algunas envueltas por membrana (porción central) (8500X).

y después fueron procesadas por el método habitual para su inclusión en parafina. De los bloques realizamos secciones seriadas de 4 micras, que fueron teñidas con hematoxilina-eosina.

Para el estudio de microscopía electrónica de transmisión, fragmentos cutáneos de 1 mm³ fueron fijados en Karnovsky y posfijados en tetraóxido de osmio; tras la deshidratación de las muestras y el aclarado con óxido de propileno, se las impregnó con resinas epoxy. Las secciones ultrafinas fueron contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo. El estudio ultraestructural y fotográfico se realizó con un microscopio electrónico ZEISS EM 10c.

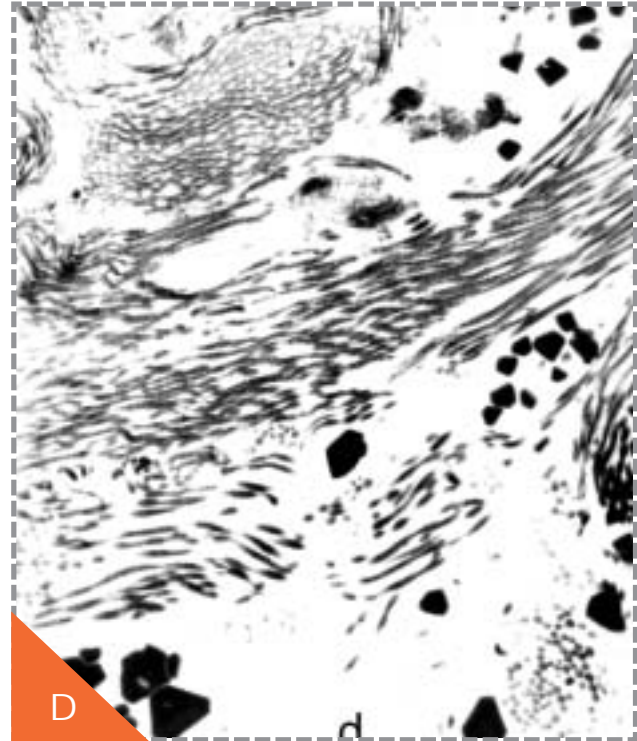
Resultados

Todas las muestras cutáneas de las zonas tratadas con tinta china a las que aplicamos el equipo TDES mostraban imágenes morfológicas superponibles, que, no obstante, variaban en relación con el momento de la biopsia. Las imágenes de las muestras tomadas inmediatamente después del tratamiento se podían superponer por completo, así como las tomadas en otros momentos (a las 24, 48, 72 y 96 horas, y a los 26 días). Observamos diferencias entre ambos grupos y, por supuesto, entre el grupo de las zonas tratadas y ambos grupos control.

I. Características morfológicas de las zonas cutáneas tratadas:

A) Biopsias realizadas inmediatamente tras el tratamiento:

a. Estudio con microscopio óptico: todas las muestras cutáneas presentaban depósitos de un pigmento negro brillante, o sea, tinta china, que se disponían en numerosos cúmulos pequeños locali-



D) Detalle de las partículas angulares entre las fibras de colágeno (9300X).

zados indistintamente por encima del estrato córneo, entre sus capas, así como en la epidermis y los poros foliculares. En ninguna de ellas observamos que el pigmento formara parte de los anejos intradérmicos ni en dermis (Fig. 1C).

b. Estudio con microscopio electrónico: confirmó la presencia de pigmento en el estrato córneo, el espinoso y los poros foliculares, bajo la forma de pequeños cúmulos de partículas geométricas con contornos angulares afilados, que se destacaban respecto de los gránulos de queratohialina del estrato granuloso, por ser éstos de forma redondeada y ovoide, con contornos curvos (Figs. 2 A y B).

B) Biopsias a las 24, 48, 72 y 96 horas, y a los 26 días:

a. Estudio con microscopio óptico: todas las muestras de las distintas biopsias presentaban características morfológicas superponibles, que se caracterizaban por la presencia de múltiples depósitos de pigmento, similares a los descritos en el grupo anterior, pero en distintos niveles cutáneos, en las células basales de la epidermis y de los folículos pilosos, así como en la dermis papilar y reticular, donde se localizaban preferentemente alrededor de los vasos y de las glándulas sebáceas y sudoríparas (Figs. 1 D, E, F y G).

b. Estudio con microscopio electrónico: se observaban características similares a las del grupo anterior, así como partículas de tinta china en diferentes lugares de la epidermis y dermis (Figs. 2 B, C y D).

II. Características morfológicas de las zonas controles:

A) Las zonas cutáneas tratadas exclusivamente con la suspensión de tinta china, sin ondas electromagnéticas, muestra-

ban en las biopsias inmediatas al tratamiento algunas partículas de pigmento de características ópticas y electrónicas similares a las descritas en los grupos anteriores, pero localizadas exclusivamente sobre el estrato córneo (Figs. 1 B y 2 A).

B) Las zonas cutáneas a las que aplicamos exclusivamente las ondas sin tinta china no mostraban depósitos de pigmento ni alteraciones microscópicas ópticas, ni electrónicas.

En ninguna de las numerosas muestras cutáneas estudiadas en todos los animales utilizados en el trabajo observamos en el nivel del epitelio y los anexos cutáneos, ni en la dermis, alteraciones microscópicas ni ultraestructurales de tipo necrosis, ni lesiones ultraestructurales del tipo vacuolización celular, tumefacción de organelas, alteraciones de las membranas, cambios nucleares y de la cromatina, etcétera.

Discusión

La vía transdérmica es una opción frente a las tradicionales vías de administración de principios activos y fármacos (oral, intramuscular e intravenosa), con dos ventajas: es fácil acceder a la piel y, al ser la piel el órgano más extenso del cuerpo, es posible conseguir efectos sistémicos y evitar los efectos colaterales indeseables que a veces presentan las vías oral o parenteral.^{2,8,9} Uno de los procedimientos físicos desarrollados durante la última década con el fin de facilitar la eficacia transdérmica es la electroporación, que ha permitido el paso de distintas sustancias, como quedó demostrado en estudios experimentales previos,¹⁰ en el tratamiento de procesos inflamatorios^{11,12} y neoplásicos,¹³ tanto en humanos¹⁴⁻¹⁶ como en modelos animales.¹⁷

En nuestro trabajo hemos podido estudiar el paso de macromoléculas de tinta china (constituidas por partículas de carbón micronizado, sulfato de hierro, goma adherente y componente graso), en suspensión, en liposomas de lecitina de soja, a través del estrato córneo y la epidermis, así como por los folículos pilosos hasta distintos niveles de la dermis. Allí las moléculas se sitúan, como en los tatuajes, tanto en el interior de los macrófagos, como entre las fibras de colágeno, y en la proximidad de los anejos y vasos dérmicos, como demuestra el estudio con microscopio óptico y electrónico realizado. Dicho paso fue mediado por las ondas electromagnéticas de alta frecuencia emitidas por el equipo TDES (Dercont Dell®), puesto que en los controles, donde sólo aplicamos la tinta china sin ondas electromagnéticas, apenas observamos pequeños depósitos de pigmento, exclusivamente localizados en la capa más superficial del estrato córneo, pero nunca en las zonas epidérmicas profundas.

Además, la aplicación de las ondas del aparato TDES no originan en nuestro modelo experimental ningún tipo de alteración morfológica, macroscópica, microscópica ni ultraestructural en ninguna de las muestras cutáneas de las zonas tratadas ni en los controles a los que aplicamos las ondas electromagnéticas sin la tinta china. Observamos, además, que el estrato córneo mantenía su típico aspecto normal en hojaldre, pues de haber ocurrido quemadura, por leve que fuese, el estrato córneo tendría un aspecto compacto homogéneo e intensamente eosinófilo. Tampoco observamos con el microscopio electróni-

co necrosis, ni siquiera imágenes de homogenización nuclear ni citoplasmática, ni los signos ultraestructurales característicos de daño celular, tales como tumefacción y vacuolización de organelas, irregularidad y fragmentación de membranas, vacuolización nucleolar y marginación de la heterocromatina nuclear, como los que fueran descritos de forma constante en estudios previos por la acción de distintos agentes lesivos o tratamientos.¹⁸⁻²²

Por último, el cobaya ha demostrado ser un buen modelo experimental en el estudio de la vía transdérmica; en este sentido, nuestro trabajo confirma los estudios previos de Panchangnula.¹⁰ El cobaya es un animal dócil, de fácil manejo, no agresivo y cuya piel es, junto con la del cerdo, la que muestra mayor similitud con la humana.

Conclusión

Nuestro trabajo ha demostrado la eficacia del equipo TDES en el paso transdérmico de una sustancia compuesta por macromoléculas (tinta china), sin originar alteraciones morfológicas ni ultraestructurales, así como la idoneidad del cobaya como modelo experimental.

Dirigir correspondencia a:



VICENTE VICENTE ORTEGA

**Cátedra de Anatomía Patológica,
Facultad de Medicina, Universidad de Murcia**

30100, Espinardo, Murcia, España

Tel.: 968 367150

Fax: 968 364150

E-mail: vvortega@um.es

www: <http://www.radiologia.es>

Referencias bibliográficas

1. Prausnitz MR: The effects of current applied to the skin: a review for transdermal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1996;18:395-425
2. Shin SC, Cho CW, Choi HK. Permeation of piroxicam from the poloxamer gels. *Drug Dev Ind Pharm* 1999;25(3):273-278
3. Shin S, Cho C, Oh I. Enhanced efficacy by percutaneous absorption of piroxicam from the poloxamer gel in rats. *Int J Pharm* 2000;193(2):213-218
4. Asbrill CS, El-Kattan AF, Michniak B. Enhancement of transdermal drug delivery: chemical and physical approaches. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2000;17(6):621-658
5. Prausnitz MR. A practical assessment of transdermal drug delivery by skin electroporation. *Adv Drug Deliv Rev* 1999;35(1):61-76
6. Prausnitz MR. Electroporation. In electronically-controlled drug delivery. Berner and Dinh, eds, Boca R, Florida, CRS Press. 1999:185-214
7. Canatella PJ, Karr JF, Petros JA, Prausnitz MR. Quantitative study of electroporation-mediated molecular uptake and cell viability. *Biophys J* 2001;80(2):755-764
8. Dujardin N, Staes E, Kalia Y, Clarys P, Guy R, Preat V. In vivo assessment of skin electroporation using square wave pulses. *J Control Release* 2002;79(1-3):219-227
9. Preat V and Prausnitz MR. Enhanced drug delivery using high-voltage pulses. *Adv Drug Deliv Rev* 1999;35:1-2
10. Panchangnula R. Transdermal delivery of drugs. *Ind J Pharm* 1997;29:140-156
11. Yokozomo Y, Sagitani. Effects of phospholipids on the percutaneous penetration of indomethacin through the dorsal skin of guinea pigs. *J Control Release* 1996;38:267-274
12. Badkar AV, Betagen GV, Hofmann GA, Banga AK. Enhancement of transdermal iontophoretic delivery of a liposomal colchicine formulation by electroporation. *Drug Deliv* 1999;6:111-115
13. Dev SB. Electrochemotherapy for cancer. *Cancer Watch* 1996;5(2):23-24
14. Glass LF, Pepine ML, Fenske NA, Jaroszeski MJ, Reintger DS. Bleomycin-mediated electrochemotherapy of metastatic melanoma. *Arch Dermatol* 1996;132(11):1353-1357
15. Heller R, Jaroszeski MJ, Glass LF, Messina JL, Rapaport DP. Phase I/II trial for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors using electrochemotherapy. *Cancer* 1996;77(51):964-971
16. Hyacinthe M, Jaroszeski MJ, Dang W, Coppola D, Karl RC. Electrically enhanced dry delivery for the treatment of soft tissue sarcoma. *Cancer* 1999;85(2):409-417
17. Heller R, Jaroszeski MJ, Perrott R, Messina JL, Gilbert RA. Effective treatment of B16 melanoma by direct delivery of bleomycin using electrochemotherapy. *Melanoma Research* 1997;7:10-18
18. Vicente V, Gómez M, Ochotorena MM, Canteras M. Respuesta del crecimiento del melanoma B16 al tratamiento *in vitro* con melfalan. *Oncología* 1992;13(3):97-104
19. Rodríguez-Vicente J, Vicente-Ortega V, Canteras-Jordana M, Calderón-Rubiales F. Relationship between 4-hydroxyanisole toxicity and dopa oxidase activity for three melanoma cell lines. *Melanoma Res* 1997a;7(5):373-381
20. Rodríguez-Vicente J, Vicente-Ortega V, Canteras-Jordana M, Calderón-Rubiales F. Citotoxicidad del 4-hidroxianisol y actividad dopa oxidasa en varias líneas de melanoma. *Oncología* 1997c;20(9):551-558
21. Rodríguez-Vicente J, Vicente-Ortega V, Canteras-Jordana M, Sánchez-Pedreño P. El ácido azelaico como agente sensibilizante en la quimioterapia *in vitro* del melanoma. *Actas Dermo-Sil* 1997d;88:317-326
22. Vicente V, Martínez C, Yáñez J, Alcaraz M, Canteras M. Melanoma metastásico pulmonar: efectos del etanol y flavonoides. *Rev Esp Patol* 2003;36(4):425-432