



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**FACULTAT DE BIOCIÈNCIES**  
**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR**

**PROGRAMA DE DOCTORADO:**  
**BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA**

# **NANOSISTEMAS AVANZADOS PARA APLICACIONES DERMATOLÓGICAS**

**Rafael Miñana Prieto**

**Memoria presentada para optar al título de doctor por la Universidad Autónoma  
de Barcelona**

**DIRECTORA:**  
**Dra. Judith Sendra Cuadal**

**TUTOR:**  
**Dr. Jaume Farrés Vicén**

**Cerdanyola del Vallès, 2017**





Universitat Autònoma  
de Barcelona

FACULTAT DE BIOCÈNCIES

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

# **NANOSISTEMAS AVANZADOS PARA APLICACIONES DERMATOLÓGICAS**

**Rafael Miñana Prieto**

Cerdanyola del Vallès, 2017



Al equipo Endor

A mis padres y hermanos

A Pedro



## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al personal de Endor Nanotechnologies la oportunidad que me han dado al poder desarrollar y completar esta tesis doctoral. Especialmente el director general y fundador de la empresa, Joaquín Querol, por haberme dado la oportunidad de vivir la experiencia de formar parte de la familia Endor y de crecer en ella, también a la directora científica de la empresa y directora de esta tesis, la Dra. Judith Sendra por enseñarme a ver, pensar y escribir como científico y trabajar con rigor, exigencia y precisión. También quiero agradecer a mis compañeros Luciano Sobrevals, Laura Vivero y Hanna Parkkola por su paciencia, amistad y por haber compartido su experiencia científica en mi formación, y por esos ratos de comida tan buenos que pasábamos y que tanto echo de menos con las empanadas argentinas, las “meat balls” con mermelada de frutos rojos o las castañas con leche que nunca antes había probado. También agradecerle a Julián Peña por su amistad y su compañerismo tras todos estos años.

Durante este proyecto hemos colaborado con diversas entidades, y quisiera agradecerles al Director Médico del Instituto de Fotomedicina, el Dr. Joan Ramón Garcés y su Directora de Láser Cutáneo, la Dra. Eva Ciscar, así como a Gabriel Buendía Bordera por su rigor y profesionalidad. También agradecer la profesionalidad de la empresa EVIC Hispania, a la Unidad de Toxicología del PCB y al resto de servicios Científico-Tecnológicos de la UB por su profesionalidad.

Gracias también al Dr. Simó Swartz Jr. por abrirme las puertas del CIBBIM Nanomedicina del Hospital Vall d’Hebron cuando recién salía de la facultad y por impulsar mi carrera científica como nuevo miembro de la familia Endor. También una mención muy especial a Petra por su paciencia, su cariño y amistad en todos estos años. Agradecerle también al Dr. Jaume Farrés, por haber aceptado tutorizar mi tesis, haber estado a mi lado en todo momento y prestarme su ayuda, crítica y buenos consejos. No puedo olvidarme de Javier, Valeria, Carles, Tiziana, Davide Rubini y Sylvia por su ayuda y consejos, y al resto de compañeros Simone, Davide D’Amico, Ignasi, Albert, etc.



Quiero también agradecerles a todas esas personas que llegaron a mi vida y han apostado por mi cuando con apenas 14 años me fui de mi casa para cumplir mis sueños en el CAR de Sant Cugat de Barcelona y la Residencia Joaquín Blume d'Esplugues de Llobregat. A Ana Benito, Berta Veiga y Susana Regüela por su grandísimo trabajo y apoyo desde el Servei d'Atenció a l'Esportista del CAR de Sant Cugat. Al director del CAR durante aquellos años, el Sr. Francesc de Puig por haber sido como un padre en los buenos y menos buenos momentos, siendo yo tan pequeño y estando tan lejos de mi familia. Agradecer la profesionalidad y humanidad de todo el equipo médico, fisios, tutores, cocineros, servicios de limpieza, seguridad, etc., del CAR.

A todos mis profesores de la residencia Joaquín Blume y del IES CAR, en especial Enric, Angy y Kathy por haber participado activa y personalmente en mi formación académica. A mis maestros Bondi, César, Grant y Edy por haber fundado mis pilares como esgrimista de élite, a la Federació Catalana d'Esgrima por haber apostado por mí como deportista en el equipo nacional y catalán de esgrima y al mismo tiempo haber impulsado y apoyado mi carrera académica. A todos mis compañeros deportistas de Madrid, Canarias, Valencia, Burgos, León, Guadalajara, Andalucía, etc. En especial a Elena Benítez, Alberto Ruíz, Bárbara Balada, Miguel Martín, Aina Rovira, Sandra Montes y David Ruiz.

También otras personas especiales que han formado parte de mi vida y que con el paso de los años me doy cuenta de lo mucho que les debo, muchas de ellas ya no están, pero siguen en mi corazón. Desde los profesores de mi estimado colegio de “Los Hermanos” de Amposta: la senyoreta Paquita, M<sup>a</sup>. Carmen, Gloria, Don José Maria y Mossen Josep ya que gracias a vosotros aprendí a leer, escribir, sumar, restar, etc. A mis profesores de mi segundo colegio “Sagràt Cor” de Amposta: la senyoreta Rosa Sebastià, M<sup>a</sup>. Teresa, Teresa Oms, Montse Rosa, Maite, Àngels, Raúl, Pere, Josep, Hermana Susana, Hermana Rosario Montero, Hermana Rosario Sanz de Acedo, Hermana Soledad, etc. Además de mis profesores de extraescolar Cari y Manolo, muchas gracias por vuestro

arte y Rosa ya que sin tu cronómetro y mi Olivetti, escribir esta tesis habría sido mucho más complicado.

A mi grupo de compañeros de facultad por compartir largas horas de estudio, experiencias increíbles y por hacerme sentir como en casa. A mi amiga Nerea Sánchez por su amistad incondicional, por abrirme su casa, su familia y acogerme como a un hermano más. También a mis grandes amigos Jeni, Javi, Jacint, Toni, Montse, José Alberto, Isa, Jose, Estívaliz, Jairo y Eric por vuestra paciencia y apoyo. A mis amigos de Amposta, en especial a Pau Fabregat, Henar y Paula Curto.

Por último, quisiera dedicar un sentido agradecimiento a mi familia. A mis hermanos Mari y Angelillo por ser como son y por estar siempre a mi lado y por apoyarme cuando he pasado por momentos difíciles. Porque su amor es incondicional desde que tengo uso de razón, y porque somos los tres embrujados que hacemos piña unidos siempre que es necesario. A mis hermanos adoptivos Carlos y Maripau por su cariño. A mis padres Rafael y María por brindarme el maravilloso privilegio de traerme a este mundo, por haberme enseñado valores fundamentales como la tolerancia y el respeto que son los pilares de la vida, por enseñarme a creer en mí y por apoyarme en cada paso de mi vida. Gracias a vosotros hoy soy la persona que soy. A mis abuelos José y Dolores, Juan y María que han sido y siguen siendo mis guías espirituales. Gracias a Pedro por ser mi compañero incondicional en el tren de la vida, por querer compartir conmigo los sueños y la esencia de la vida, por compartir buenos y no tan buenos momentos, por todo lo que hemos compartido y por mostrarme lo que es la felicidad. Y a Pedro y Loles por acogerme como a un hijo más y a Ramón y Vanesa por hacerlo como un hermano más. Y por último gracias a mis fieles y leales compañeros, Cocó y Lucas. Por su cariño incondicional y por estar a mi lado siempre, en todo momento, día y noche, todos los días del año.



El trabajo experimental de esta tesis ha sido realizado en el laboratorio de Endor Nanotechnologies, S.L. En el Parc Científic de Barcelona (C / Baldiri Reixac 15, 08028 Barcelona).



# ÍNDICE

---



ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	7
ABREVIACIONES.....	23
ABSTRACT.....	29
RESUMEN.....	31
1. INTRODUCCIÓN.....	35
1.1 La piel: estructura y funciones.....	35
1.1.1 Epidermis.....	36
1.1.2 Membrana basal.....	39
1.1.3 Dermis.....	39
1.1.4 Hipodermis.....	41
1.2 El ácido hialurónico (HA).....	42
1.2.1.1 Funciones y propiedades del HA.....	43
1.2.1.2 Aplicaciones del HA.....	44
1.3 Nanomedicina.....	46
1.3.1 Nanotecnologías en cosmética.....	52
1.4 Nanopartículas de Oro.....	54
1.4.1 Historia del oro médico.....	54
1.4.2 Síntesis de las AuNPs.....	55
1.4.3 Propiedades de las AuNPs.....	56
1.4.4 Toxicidad de las AuNPs.....	58
1.5 Aplicaciones biomédicas de las AuNPs en dermo-cosmética.....	62
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	69
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
3.1 Parte 1: síntesis de los nanomateriales.....	77
3.1.1 Síntesis de las AuNPs.....	77
3.1.2 Síntesis de AuNPs-PEG.....	78



3.1.3	Síntesis de HASH .....	79
3.1.3.1	Tiolación del HA 10 kDa.....	80
3.1.4	Síntesis del Golden Hyaluronan (GH).....	81
3.2	Parte 1: caracterización fisicoquímica de las AuNPs y del GH .....	81
3.2.1	Microscopía electrónica de transmisión.....	81
3.2.2	Dispersión de luz dinámica.....	82
3.2.3	Potencial Z .....	82
3.2.4	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo .....	83
3.2.5	Análisis elemental orgánico del GH .....	84
3.2.6	Estudios de calidad y estabilidad .....	85
3.2.6.1	Espectroscopia ultravioleta visible .....	86
3.2.6.2	Examen Visual.....	86
3.3	Parte 2: estudios de viabilidad celular .....	87
3.3.1	Ensayo de toxicidad in vitro .....	88
3.3.2	Ensayo de mutagénesis Ames.....	90
3.3.3	Ensayo de genotoxicidad del cometa.....	94
3.4	Parte 2: estudios de seguridad In vitro .....	95
3.4.1	Test de absorción transdérmica.....	95
3.4.1.1	Procedimiento de ensayo .....	96
3.4.2	Test de irritación ocular .....	98
3.4.2.1	Procedimiento del ensayo .....	99
3.5	Parte 3: estudios de eficacia in vitro.....	102
3.5.1	Ensayo de migración celular .....	102
3.5.2	Ensayo de proliferación celular .....	103
3.5.3	Ensayo de expresión génica .....	103
3.6	Parte 4: estudio de seguridad en voluntarios Patch Test .....	105
3.6.1	Voluntarios.....	106

3.7	Parte 4: estudios de eficacia en voluntarios.....	106
3.7.1	Estudio anti-edad .....	108
3.7.1.1	Estudio fotográfico .....	109
3.7.1.2	Estudio de la hidratación.....	110
3.7.1.3	Estudio topométrico de la piel con FOITS .....	111
3.7.1.4	Estudio de la matriz extracelular por ultrasonidos de alta frecuencia (HFUS).....	113
3.7.2	Estudio anticelulítico .....	114
3.7.2.1	Productos utilizados.....	116
3.7.2.1.1	Aplicación del producto.....	116
3.7.2.2	Aleatorización de la aplicación de los productos.....	117
3.7.2.3	Medición del peso.....	117
3.7.2.4	Medición de la circunferencia del muslo.....	117
3.7.2.5	Fotografía Clínica .....	118
3.7.2.6	Cuantificación de antioxidantes por autofluorescencia espectroscópica .....	118
3.7.2.7	Evaluación de la epidermis y dermis mediante HFUS de 50 MHz.....	119
3.7.2.8	Análisis 3D de los hoyuelos y de la textura.....	120
3.7.2.9	Biopsias de piel.....	122
3.8	Parte 5: formulación final, especificaciones y ficha de registro europeo.....	123
3.9	Parte 6: análisis estadístico.....	129
4.	RESULTADOS	133
4.1	Caracterización fisicoquímica de las AuNPs y del GH.....	134
4.1.1	Microscopía electrónica de transmisión.....	134
4.1.2	Dispersión de luz dinámica.....	135
4.1.3	Potencial Z .....	135
4.1.4	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo .....	136
4.1.5	Análisis elemental orgánico del GH .....	137

4.1.6	Calidad y estabilidad.....	137
4.1.6.1	UV-VIS.....	137
4.1.6.2	Examen visual.....	140
4.2	Estudios de viabilidad celular.....	141
4.2.1	Ensayo de toxicidad in vitro .....	141
4.2.2	Ensayo de mutagénesis Ames.....	143
4.2.3	Ensayo de genotoxicidad del cometa.....	144
4.3	Estudios de seguridad ex vivo .....	146
4.3.1	Absorción transdérmica .....	146
4.3.2	Test de irritación HET-CAM.....	147
4.4	Estudios de eficacia in vitro .....	148
4.4.1	Ensayo de migración celular .....	148
4.4.2	Ensayo de proliferación celular .....	150
4.4.3	Ensayo de expresión génica .....	151
4.5	Estudio de seguridad en voluntarios Patch Test.....	153
4.6	Estudios de eficacia en voluntarios .....	153
4.6.1	Estudio facial anti-edad.....	154
4.6.2	Estudio anticelulítico .....	162
5.	DISCUSIÓN .....	175
5.1	Caracterización fisicoquímica de las AuNPs y del GH.....	175
5.2	Viabilidad celular .....	179
5.3	Seguridad ex vivo.....	181
5.3.1	Absorción transdérmica .....	181
5.3.2	Test de irritación HET-CAM.....	182
5.4	Eficacia in vitro .....	184
5.5	Estudio de seguridad en voluntarias: Patch Test.....	188

5.6	Eficacia en voluntarias .....	189
5.6.1	Estudio anti-edad .....	189
5.6.2	Estudio anticelulítico .....	191
6.	CONCLUSIONES.....	199
7.	REFERENCIAS.....	205
8.	ANEXOS.....	225
9.	APÉNDICES.....	259



# ABREVIACIONES

---



**ABREVIACIONES**

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEO:	Análisis elemental orgánico
ARN	Ácido Ribonucleico
Au:	Oro
AuNP:	Nanopartícula de oro
CAM	Membrana corioalantoidea; en inglés, <i>Chorioallantoic Membrane</i>
CRF:	Cuaderno de recogida de datos; en inglés, <i>Case Report Form</i>
DLS:	Dispersión dinámica de luz; en inglés, <i>Dynamic light scattering</i>
ECM	Matriz extracelular; en inglés, <i>Extracellular matrix</i>
EMT	Epitelio mesenquimal de transición; en inglés, <i>Epithelial to Mesenchymal Transition</i>
EPR	Efecto de mayor permeabilidad y retención; en inglés, <i>Enhanced permeability and retention</i>
ESF	Fundación europea de la ciencia; en inglés, <i>European Science Foundation</i>
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos; en inglés, <i>US Food and Drug Administration</i>
GH	Golden hyaluronan
GM	Glucosa mínima
HA:	Ácido hialurónico (combinando hialuronato sódico)
HaCat	Queratinocitos humanos inmortalizados
HARE	Receptor de endocitosis de hialurónico; en inglés, <i>Hyaluronan receptor for endocytosis</i>
HAS	Sintasa de hialurónico; en inglés, <i>Hyaluronan synthase</i>



HASH:	Ácido hialurónico tiolado; en inglés, <i>Thiolated hyaluronic acid</i>
HDF	Fibroblastos dérmicos humanos; en inglés, <i>Human dermal fibroblasts</i>
HEX	Hexosaminidasa
ICP-MS:	Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente; en inglés, <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
LYVE-1	Receptor de hialuronano endotelial de los vasos linfáticos 1; en inglés, <i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1</i>
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos; en inglés, <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
NCL	Laboratorio de caracterización nanotecnológica de los Estados Unidos; en inglés, <i>US Nanotechnology Characterization Laboratory</i>
NP:	Nanopartícula
PBS:	Tampón fosfato salino; en inglés, <i>Phosphate buffered saline</i>
PDT	en inglés, <i>Photodynamic therapy</i>
PEG:	Polietilenglicol
HPLC-MS:	Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un espectrómetro de masas; en inglés, <i>Mass directed compact chromatography system</i>
Pot-Z:	Potencial zeta
QD's:	Puntos cuánticos; en inglés, <i>Quantum dots</i>
RHAMM	Receptor de hialurónico mediado por motilidad; en inglés, <i>Receptor for hyaluronan-mediated motility</i>

ROS	Especies reactivos del oxígeno; en inglés, <i>Reactive oxygen species</i>
SCGE	Electroforesis de célula única; en inglés, <i>Single cell gel electrophoresis</i>
SEM:	Error estándar de la medida; en inglés, <i>Standard error</i>
SPR:	Resonancia del plasmón de superficie; en inglés, <i>Surface plasmon resonance</i>
TEM:	Microscopía electrónica de transmisión; en inglés, <i>Transmission electron microscopy</i>
UV-Vis:	Espectroscopía ultravioleta–visible; en inglés, <i>Ultra violet-visible</i>
VEGF/VEGFR	Factor de crecimiento vascular endothelial / receptor; en inglés, <i>Vascular endothelial growth factor/receptor</i>



# ABSTRACT / RESUMEN

---



**ABSTRACT**

The emergence of nanotechnology in life sciences has generated high expectations due to its promising diagnostic, therapeutic and cosmetic applications. One of the major challenges of this process lies in the development of "nanotherapies", that are specifically targeted to destined tissues and organs avoiding the systemic adverse effects of current treatments.

Because of their biocompatibility, gold nanoparticles (AuNPs) are among the most widely used metal nanoparticles on the research of new biomedical products. AuNPs possess a reactive surface that allows the attachment of organic molecules and exhibit interesting optical properties, such as the surface plasmon resonance, which facilitate the design of advanced systems with multiple applications. Several studies have shown that AuNPs conjugated to stabilizing molecules (such as polyethylene glycol) express very low levels of toxicity, lower than precursor gold salts. On the other hand, hyaluronic acid (HA) is broadly used in medicine, especially in dermatology. HA has structural functions and it is involved in the maintenance of homeostasis, playing an important role in certain tissues such as skin, cartilage and joints. In addition, HA acts on cellular level through binding to different receptors such as CD44, Rhamm, LYVE1 and HARE. Through its main receptor CD44, HA has been shown to be involved in migration, cell proliferation, survival and differentiation processes. HA is an essential ingredient of cosmetic products and its use has been proven to promote skin regeneration despite being a large molecule that can not penetrate the deep layers of the skin.

During this project, we have developed an advanced nanosystem called Golden Hyaluronan (GH), consisting of a spherical core of gold nanoparticle conjugated to modified small size HA molecules in a stable manner; thus, facilitating deep skin layer penetration. We have also studied both structural and cellular effects produced by GH, showing that it successfully passes in *vitro* toxicity, genotoxicity, and efficacy tests as well as *in vivo* toxicity and efficacy trials.

Our studies with GH have shown a safety health profiling as well as better effects on efficacy compared to HA. We have shown that GH has stimulated the synthesis of different molecules involved in regeneration processes especially the synthesis of molecules with cosmetic interest, such as HA, collagen, and elastin, confirming our hypothesis. Thereby, utilizing the results of this thesis, Endor has developed a pioneering product with dermocosmetic applications in the field of skin regeneration and rejuvenation, called Y.en Effect.

**RESUMEN**

La llegada de la nanotecnología a las ciencias de la salud ha generado muchas expectativas debido a las importantes aplicaciones diagnósticas, terapéuticas y cosméticas. Uno de los grandes retos en este proceso reside en el desarrollo de «nanoterapias», dirigidas específicamente a los tejidos y órganos diana, evitando los efectos secundarios de los tratamientos actuales.

Debido a su biocompatibilidad, las nanopartículas de oro (AuNPs) son unas de las nanopartículas metálicas más utilizadas en la investigación biomédica de nuevos productos. Las AuNPs tienen una superficie reactiva que permite la unión de moléculas orgánicas, así como interesantes propiedades ópticas como la resonancia de plasmon superficial adquirida por el oro coloidal a tamaño nanométrico, facilitando el diseño de sistemas avanzados con múltiples aplicaciones. Existen varios estudios que demuestran que las nanopartículas de oro conjugadas a moléculas estabilizantes (como por ejemplo el polietilenglicol), presentan patrones de toxicidad muy bajos, inferiores a la propia toxicidad de las sales de oro precursoras.

Por otra parte, el ácido hialurónico (HA) es ampliamente utilizado en medicina, sobre todo con aplicaciones dermatológicas. Destaca su función estructural y de mantenimiento de la homeostasis, jugando un papel importante en determinados tejidos como la piel, el cartílago o en las articulaciones. Además, el HA interactúa a nivel celular a través de diferentes receptores celulares como son el CD44, Rhamm, LYVE1 y HARE. Su principal virtud es su capacidad de absorber agua hasta aumentar 50 veces su peso en seco. Dicha capacidad para retener agua lo convierte en un excelente aliado para hidratar la piel, protegerla de los radicales libres y favorecer la regeneración de la piel, convirtiéndose en un ingrediente indispensable para las marcas cosméticas. No obstante, tiene como limitación que su gran peso molecular que dificulta su penetración a capas profundas de la piel.



Durante esta tesis, hemos desarrollado un avanzado nanosistema llamado *Golden Hyaluronan* (GH), conjugando moléculas de HA de pequeño tamaño a nanopartículas de oro de manera estable, facilitando de este modo la penetración en capas profundas de la piel. Hemos estudiado tanto los efectos producidos a nivel estructural como celular superando con éxito las pruebas de toxicidad, genotoxicidad y eficacia *in vitro*, así como los ensayos de seguridad y eficacia *in vivo*. El principal receptor de este nanosistema ha sido el CD44, a través del cual, el HA está implicado en procesos de migración, proliferación celular, supervivencia y diferenciación.

Nuestros estudios demuestran que el GH ha estimulado la síntesis de diferentes moléculas implicadas en procesos de regeneración, especialmente moléculas con interés cosmético, como son el HA, el colágeno o la elastina, confirmando así nuestra hipótesis. De esta manera, con los resultados de esta tesis, Endor ha desarrollado un producto pionero en el mercado con aplicaciones dermocosméticas, concretamente en el ámbito de la regeneración de la piel para el rejuvenecimiento facial llamado *Y.en Effect* (<http://www.yen-effect.com/index.html>).

# INTRODUCCIÓN

---



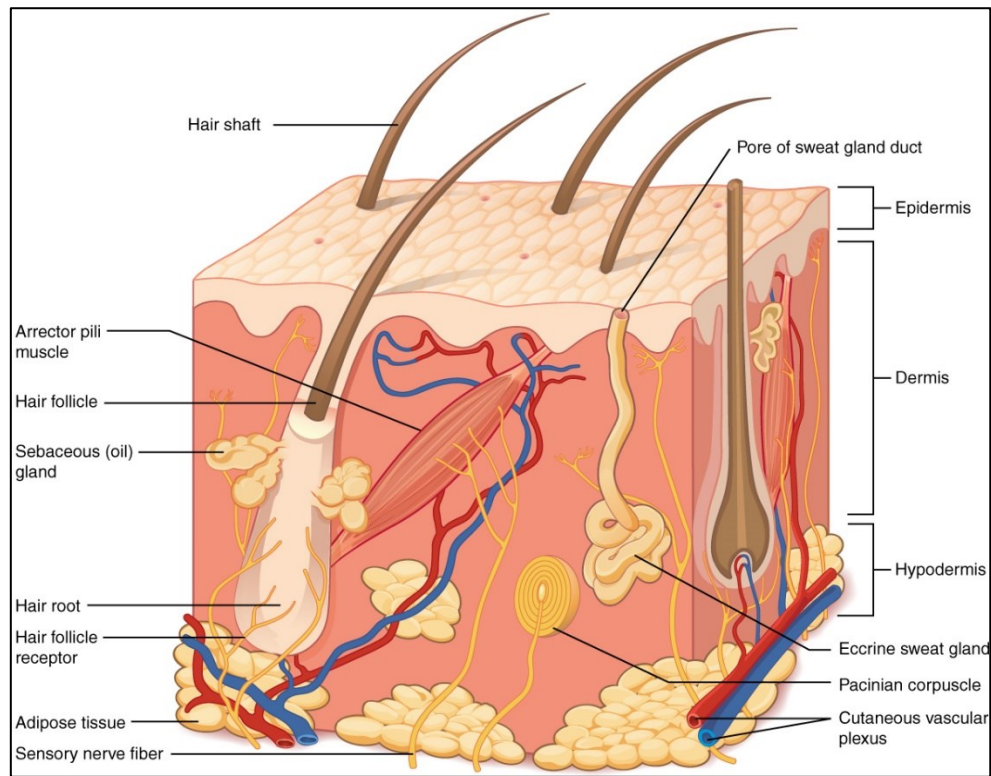
## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 La piel: estructura y funciones

La piel es un órgano grande y complejo que ocupa un área de aproximadamente 2 m<sup>2</sup>, representando aproximadamente una décima parte de la masa corporal. Ejerce protección a los tejidos de las tensiones ambientales y sirve como una interfaz sensorial entre el cuerpo y su entorno (Balasubramani et al., 2001; Metcalfe & Ferguson, 2007a). En un nivel básico, la piel proporciona una barrera física que sirve a la doble función de mantener la homeostasis y excluir factores de estrés externos, como por ejemplo patógenos potenciales. En su mayor parte, esto incluye la regulación del calor a través de la sudoración y la vasoconstricción / vasodilatación, el control de la entrada y la pérdida de líquidos como barrera semi-impermeable, la síntesis de vitamina D a través de la radiación ultravioleta de la luz solar, la función sensorial, y la acción de las células inmunes. La importancia de mantener esta barrera está corroborada por la alta mortalidad asociada con la ruptura aguda o crónica de la piel sin intervención clínica (Clark et al., 2007; Sachs & Voorhees, 2010).

La piel humana adulta está compuesta por distintas capas (Figura 1.1) (Nucleus Medical Media (2017) Skin layers and functions). La más externa de estas, la epidermis escamosa estratificada, consiste predominantemente en queratinocitos, pero también contiene los pigmentos que producen los melanocitos, células inmunoprotectoras de Langerhans y células sensoriales de Merkel (Jones et al., 2002; Metcalfe & Ferguson, 2007a, Sheridan & Moreno, 2001). La epidermis está limitada en el lado inferior por la zona de la membrana basal en la cuál encontramos los melanocitos, separada de la dermis subyacente. La propia dermis es un tejido rico en matriz extracelular (ECM) que proporciona soporte mecánico a la epidermis y contiene unidades pilo-sebáceas, fibras nerviosas, vasos sanguíneos y linfáticos. Además, la dermis está constituida por fibroblastos, macrófagos y mastocitos, pero en función del estado de la piel las poblaciones celulares pueden variar. La hipodermis y el tejido adiposo subcutáneo se

encuentran debajo de la dermis y se componen de capas sueltas de tejido conectivo y grasa (Metcalf & Ferguson, 2007a, b; Rodrigues et al., 2008).



**Figura 1.1. Capas de Piel.** La piel se compone de dos capas principales: la epidermis, hecha de células epiteliales estrechamente empaquetadas, y la dermis, hecha de tejido conectivo denso e irregular que alberga vasos sanguíneos, folículos pilosos, glándulas sudoríparas y otras estructuras. Debajo de la dermis se encuentra la hipodermis, que está compuesta principalmente de tejidos conectivos y grasos sueltos (Nucleus Medical Media (2017). *Skin layers and functions*).

### 1.1.1 Epidermis

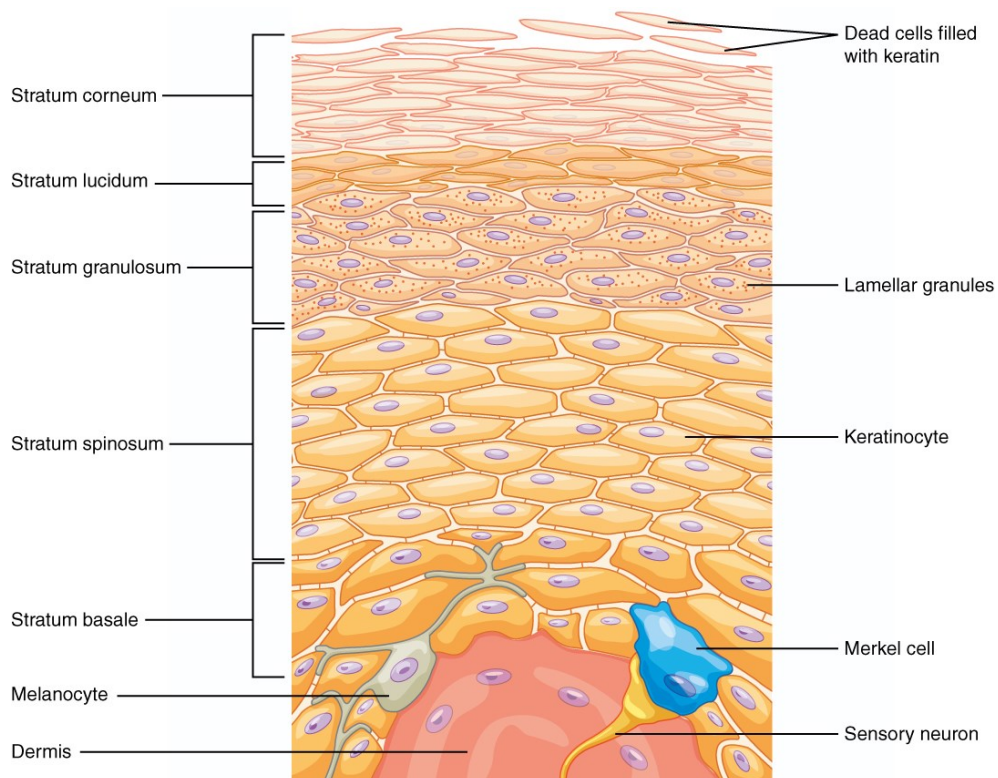
La epidermis humana es la barrera más importante del cuerpo frente al ambiente externo hostil. Está formada por un epitelio estratificado avascular que se regenera cada 28 días. La epidermis está compuesta por aproximadamente un 95% de queratinocitos, aunque también hay otras poblaciones celulares como los melanocitos, que aportan la

pigmentación a la piel y la protección a la radiación solar a través de la melanina; las células de Merkel o mecanorreceptores que se encargan de la función sensorial; y las células de Langerhans y linfocitos intraepidérmicos, encargados de la respuesta inmune de la piel. (Bennett, 1988).

Los estratos de la epidermis son generados por un proceso de proliferación basal continua y una creciente diferenciación de las células a medida que progresan alejándose de la capa basal. En la mayor parte del cuerpo humano, la epidermis estratificada consta de cuatro estratos: el estrato basal, el estrato espinoso, el estrato granuloso y el estrato córneo (Figura 1.2). En la piel palmoplantar, la epidermis es más gruesa y se observa una quinta capa, denominada estrato lucidum o capa de transición, entre el estrato gransulosum y el estrato córneo. En el proceso de diferenciación, los queratinocitos basales expresan las queratinas 5 y 14 (K5 y K14) y van cambiando su expresión hacia K1 y K10 (Wang et al., 2006) a medida que migran hacia el exterior. Los queratinocitos en el estrato espinoso se unen con desmosomas, que proporcionan los puntos de iniciación para la formación de la envoltura cornificada. En el estrato granuloso, se sintetizan gránulos de queratohialina, que están compuestos de loricrina, filagrina, cristata- $\alpha$  y varios lípidos implicados en la formación de dicha envoltura (Rising et al., 2005). A medida que los queratinocitos basales progresan hacia arriba alejándose de la membrana basal, además de la queratina, también cambian los perfiles de expresión de proteína (Tabla 1.1), aumenta la formación de gránulos de queratohialina y acumulan queratina intracelularmente. La actividad de las mitocondrias disminuye en las etapas finales y las células sufren apoptosis controlada a medida que transitan hacia el destino terminal como corneocitos, formando el estrato córneo. La propia envoltura se mantiene a través de un equilibrio dinámico de proliferación y descamación de células basales de corneocitos. (Bennett, 1988).

**Tabla 1.1** Perfiles característicos de expresión de queratinocitos dentro de la epidermis adulta. (Wang et al., 2006).

Capa epidérmica	Queratinas Ácidas	Queratinas Basales	Marcadores moleculares expresados
Queratinocitos basales	K14	K5	Integrinas $\alpha 2\beta 1$ , $\alpha 3\beta 1$ y $\alpha 6\beta 4$
Queratinocitos suprabasales	K10	K1	Filagrin
			Transglutaminasa
			Involucrina
			Loricrina



**Figura 1.2.** Capas de la epidermis. La epidermis de la piel gruesa tiene cinco capas: estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lúcido y estrato córneo (Nucleus Medical Media (2017). *Skin layers and functions*).

### **1.1.2 Membrana basal**

Inmediatamente por debajo del estrato basal se encuentra la zona de la membrana basal. Esta región contiene una estructura de membrana especializada que ancla la epidermis al tejido dérmico subyacente, mientras que simultáneamente proporciona una barrera parcial a la célula y de intercambio macromolecular (Shao & Vollrath, 2002; Acharya et al., 2008). La membrana basal se puede subdividir en la lámina basal y la lámina reticular. En la lámina basal es predominantemente una malla de colágeno tipo IV decorada con glicoproteínas y proteoglicanos. La lámina reticular es una estructura basada en fibronectina, unida a la lámina basal a través de colágeno tipo VII y microfibrillas de fibrilina.

Las microfibrillas de fibrilina elástica en la lámina reticular también se extienden en la dermis y se enredan con microfibrillas de elastina (Acharya et al. 2008). La membrana basal proporciona un andamio que facilita la reparación de tejidos, promueve la diferenciación de los precursores endoteliales y mantiene los tejidos unidos (Vepari & Kaplan, 2007; Min et al., 2004a; Min et al, 2004b).

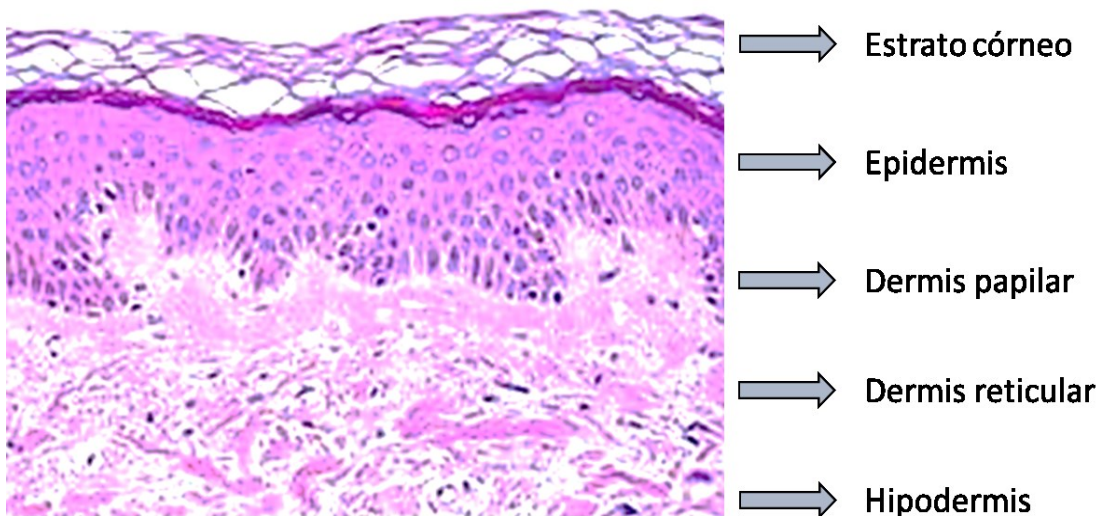
### **1.1.3 Dermis**

La dermis, o capa media, es un tejido conectivo situado directamente debajo de la epidermis (Paul & Sharma, 2004). Esta capa es responsable de la elasticidad y la integridad mecánica de la piel, y contiene vasos sanguíneos que son responsables de la nutrición de la capa epidérmica (Jones et al., 2002). Contiene receptores para el tacto, temperatura y dolor, así como folículos pilosos y los conductos sudoríparos (MacNeil, 2008). Esta capa de piel se compone de colágeno (tipo I y III), el principal tipo de fibra del tejido conjuntivo, la elastina y los glicosaminoglicanos. Los fibroblastos son el principal tipo celular presente en la dermis. Son capaces de producir enzimas de remodelación tales como proteasas y colagenasas, que juegan un papel importante en el



proceso de cicatrización de heridas (Metcalf & Ferguson, 2007a, b, Wong & Chang, 2009).

La dermis se divide en dos capas: una capa más profunda llamada reticular y una capa superficial designada papilar (Figura 1.3). La capa reticular, componente principal de la dermis, está compuesta de tejido conjuntivo denso e irregular, así como por un conjunto de fibras colágenas y elásticas que presentan una disposición ordenada y forman líneas regulares de tensión. Estas líneas reciben el nombre de líneas de Langerque, son resistentes al estiramiento en muchas direcciones y están conectadas directamente con la hipodermis. (Seeley et al., 2003). A su vez, la capa papilar debe su a las extensiones llamadas papilas que apuntan hacia la epidermis. También contiene numerosos vasos sanguíneos que suministran nutrientes a la epidermis superpuesta, elimina los productos de desecho y ayuda a regular la temperatura corporal (Seeley et al., 2003; Wong & Chang, 2009).



**Figura 1.3. Capas de la dermis. La dermis papilar en contacto con la epidermis y la dermis reticular, más gruesa y por encima de la hipodermis** (Modificada de Nucleus Medical Media (2017). *Skin layers and functions*).

#### 1.1.4 Hipodermis

La hipodermis se encuentra adyacente al borde inferior de la dermis reticular y contiene tejido adiposo que está bien vascularizado y contribuye a las propiedades mecánicas y termorreguladoras de la piel. Separa la dermis de la fascia muscular subyacente (Metcalfé & Ferguson, 2007a, b, Wong & Chang, 2009).

Esta capa de la piel se compone de tejido conectivo laxo con fibras de colágeno y elastina. Los principales tipos de células formadas en la hipodermis son los adipocitos, fibroblastos, histiocitos, células plasmáticas, linfocitos y mastocitos. La fracción de células inmunitarias de este tejido está implicada en el procesamiento de antígenos extraños que pueden entrar en el cuerpo por la interrupción de la barrera cutánea. Este tejido también contiene poblaciones de células madre y progenitoras que contribuyen al proceso de cicatrización cutánea a través del reclutamiento en el sitio de la herida. A menudo se considera que esta capa no forma parte de la piel, siendo a veces llamada tejido subcutáneo o fascia superficial. Además, aproximadamente la mitad de la grasa (grasa areolar y grasa profunda) almacenada en el cuerpo se encuentra en la hipodermis, aunque su número y ubicación varían con la edad, el sexo y la alimentación (Seeley et al., 2003).

La grasa areolar, situada entre la fascia superficialis y la dermis, es la responsable de la aparición de los problemas de textura de la celulitis. La grasa profunda, situada entre la fascia superficialis y la fascia muscular, es la responsable de los cúmulos de grasa localizados que distorsionan la silueta. La celulitis afecta a más mujeres que a hombres y por lo general se desarrolla en sitios anatómicos particulares, tales como los muslos y las nalgas laterales. Según la encuesta de la OMS (2012) se estima que del 80 al 90 por ciento de las mujeres tienen celulitis en algún momento de su vida. Suele aparecer después de la adolescencia y tiene una textura de “piel de naranja”. Los dermatólogos dividen la celulitis en cuatro etapas diferentes. En la etapa I, las personas no tendrán ninguna celulitis visible a menos que la piel se agarra de ciertas maneras. En la etapa II, la celulitis es un poco más obvia y puede ser visible cuando alguien se mantiene de cierta manera.

La etapa III se define por ondulaciones a lo largo de la piel que son evidentes en la mayoría de las posiciones sentadas o de pie. Con la celulitis en estadio IV, los individuos tendrán fosas y hoyuelos en porciones significativas de su cuerpo.

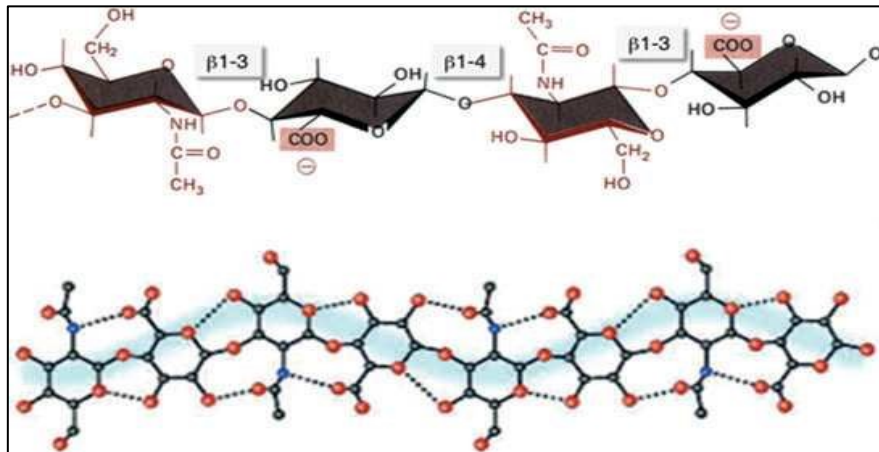
Los aspectos fisiopatológicos de la celulitis aún no están claros. Muchos factores parecen influir en el inicio de la celulitis, incluyendo el género, la herencia genética, la raza, el peso corporal y la edad. Las hormonas y el deterioro de la circulación tanto microvascular como linfática se consideran los factores etiológicos más importantes. La evaluación de la celulitis se basa principalmente en la observación clínica, medición de la circunferencia del muslo, índice de masa corporal y termografía, pero para la prueba de la eficacia de productos anticelulíticos, se necesitan métodos de evaluación más objetivos y no invasivos (Rona et al., 2006).

En el Anexo I. se recoge una breve introducción a la dermatología y su evolución a largo de la historia.

## **1.2 El ácido hialurónico (HA)**

El año 1934 los investigadores Meyer y Palmer publicaron por primera vez en el *Journal of Biological Chemistry* un innovador e inusual polisacárido con un peso molecular extremadamente alto aislado del vítreo de los ojos de bovino, el ácido hialurónico (HA). Años más tarde, ya en la década de los 50, Meyer y Palmer acabaron descubriendo la estructura química del HA, un polisacárido lineal no sulfatado ni ramificado y con carga negativa que estaba constituido por repeticiones de un disacárido compuesto de ácido D-glucurónico unido por enlace  $\beta$ 1-2 glicosídico con N-acetilglucosamina y enlace  $\beta$ 1-3 entre los disacáridos que acaban formando la cadena de HA (Figura 1.4). El HA está presente tanto en la matriz extracelular como en el líquido sinovial que baña las articulaciones y se sintetiza por tres hialuronan sintasas: HAS1,

HAS2 y HAS3, enzimas transmembranales multipaso que extruden el HA en la superficie celular o matriz extracelular a medida que lo sintetizan (Weigel et al., 1997; Toole, 2004).



**Figura 1.4. Estructura del HA, representando los disacáridos y sus enlaces.** Vivero, L (2014). *Diseño y caracterización de sistemas de liberación de fármacos basados en nanopartículas metálicas y ácido hialurónico (tesis doctoral)*. Universidad de Barcelona, España.

### 1.2.1.1 Funciones y propiedades del HA

El HA participa en una gran variedad de funciones celulares, así como en el mantenimiento de la estructura tisular. Es una parte importante de la matriz extracelular

presente en la mayoría de los tejidos de los vertebrados y se une a múltiples proteoglicanos que contribuyen a su ensamblaje y regulan sus funciones.

El HA es prominente en el líquido sinovial y los tejidos conectivos blandos. La mayor cantidad de HA reside en el tejido de la piel, donde está presente tanto en la dermis como en la epidermis (Laurent et al., 1996).

El rol fisiológico del HA en la matriz extracelular incluye la homeostasis del agua, la prevención del flujo de fluidos a través de los tejidos y la regulación del transporte de sustancias en el espacio intercelular (Laurent et al., 1996). A través de los receptores de la superficie celular, el HA también funciona como un transductor de señales que regula la adhesión, la motilidad celular, la proliferación y la diferenciación celular, activando varias cascadas de señalización intracelular, tales como c-Src, Ras y MAPKs (Itano, 2008).

Las propiedades del HA cambian en función de la concentración en la que se encuentra. A concentraciones muy bajas, las cadenas se enredan menos entre sí, dando lugar a una viscosidad leve, pero a concentraciones más altas tienen una viscosidad mayor debido al mayor enredo de la cadena. Estas propiedades reológicas hacen al HA ideal como lubricante y es utilizado en diversas aplicaciones biomédicas (Cowman et al., 2005).

Moléculas como agrecano o versicano, y receptores como el CD44, RHAMM o LYVE-1 son ejemplos de componentes celulares de unión al HA (Noble et al., 2002; Toole et al., 2002). Se considera que el CD44 es el principal receptor de HA en la mayoría de tipos celulares (Toole et al., 1997). El HA fisiológico presenta diferentes pesos moleculares y la función es diferente según el tamaño. Por ejemplo, el HA de alto peso molecular no parece estar implicado en la expresión génica y el HA de peso molecular bajo es conocido por promover la expresión de genes (McKee et al., 1996; Oertli et al., 1998).

### **1.2.1.2 Aplicaciones del HA**

El HA está involucrado en la homeostasis de los tejidos y su integridad, y actúa como base para las interacciones macromoleculares en el montaje de la matriz extracelular. La versatilidad del HA hace de él un material con múltiples aplicaciones

biomédicas como la oncología, ingeniería biomédica o dermocosmética entre otros (Gold, 2009; Prestwich, 2011; Diamond et al., 2012).

### **Oncología**

Cada vez son más los estudios que se centran en el uso del HA como vehículo en la administración de fármacos en terapias oncológicas. Sus cualidades de biocompatibilidad y biodegradación proporcionan protección y mejoran la solubilidad de las moléculas transportadas. Además, el HA es un buen transportador de fármacos antitumorales ya que su principal receptor es el CD44, que se sobreexpresa en la mayoría de tumores sólidos (Peach et al., 1993; Toole et al., 2004).

### **Ingeniería biomédica**

Gracias a sus propiedades mecánicas y biológicas, el HA presenta una buena alternativa en la ingeniería biomédica frente a terapias regenerativas (Allison et al., 2006).

Existen diversos estudios donde se ha observado un buen crecimiento de los condrocitos en matrices de HA, generando incluso cartílago dentro de la red porosa que forma el hidrogel (Burdick et al., 2004). Además, la implantación quirúrgica es un punto limitador para la mayoría de las matrices utilizadas en ingeniería de tejidos, pero el HA es un buen candidato principalmente por tres razones: en primer lugar, el inyectable de HA puede estar en cualquier forma estructural; en segundo lugar, la matriz de HA puede adherirse al tejido nativo; y en tercer lugar, los métodos de inyección y de laparoscopia reducen la invasividad del procedimiento quirúrgico (Yeo et al., 2006).

## **Dermocosmética**

El HA se ha posicionado como uno de los mejores productos cosméticos por su capacidad hidratante y regeneradora. Es un ingrediente muy utilizado en los productos tópicos ya que aumenta la humedad sobre la piel y en algunos casos incluso se ha demostrado que puede inducir diferentes vías implicadas en la síntesis de HA y colágeno, aumentando la firmeza y elasticidad de la piel (Necas et al., 2008). También es muy utilizado como relleno dérmico, donde se inyecta de manera intradérmica en las zonas de la piel que presentan arrugas profundas y gracias a su viscosidad y su capacidad de absorción de agua, consigue eliminar temporalmente estas arrugas (Tezel et al., 2008). Sin embargo, la característica más desafiante del HA obtenido comercialmente ha sido su gran tamaño molecular (3.000 nm de diámetro), teniendo en cuenta que el espacio intercelular es de tan sólo 15-50 nm. Esta limitación física hace imposible que el HA comercial convencional penetre en las capas profundas de la dermis (Desai et al., 2010) y por eso hoy en día se están utilizando oligómeros de HA de tamaño nanométrico como por ejemplo el HA Signal-10 con un tamaño de 10 kDa (HYAL Signal-10: <http://infinity-ingredients.co.uk/product/principhyal-signal-10>) que permite una mayor penetración y mejora la eficacia en la piel (Manjula et al., 2014). Sin embargo, estos pequeños oligómeros tienen dificultades para llegar a capas profundas debido a su rápida degradación.

### **1.3 Nanomedicina**

A lo largo de la última década, la medicina ha incorporado progresivamente la nanotecnología en sus áreas de trabajo, creando el área de la nanomedicina. La nanomedicina, a través del uso de herramientas de tamaño nanométrico está siendo capaz de desarrollar equipos diagnósticos, preventivos y terapéuticos con aplicaciones en el tratamiento de enfermedades (European Science Foundation, 2005). Tal como lo define la Recomendación de la Comisión Europea en 2011, un nanomaterial es un material

natural, accesorio o fabricado que contiene partículas de una o más dimensiones en el rango de tamaño de 1 nm a 100 nm. Diversos organismos, organizaciones y autoridades nacionales e internacionales han seguido trabajando en el desarrollo de una definición de nanomateriales, pero muchas de las definiciones no normativas pueden ser conflictivas y aún no tenemos una definición global o acordada en la UE.

A pesar de la polémica de la correcta definición de los nanomateriales, durante los últimos años ha habido un rápido crecimiento en el número de productos que contienen nanomateriales introducidos al mercado en diferentes sectores, como el farmacéutico, la biotecnología y la energía, entre otros (Sheetal R. D'Mello et al., 2017). Los nanomateriales de ingeniería se componen de diferentes materiales, formas y tamaños. A nanoescala, sus propiedades físicas, químicas y biológicas pueden diferir mucho del material original correspondiente. Estas características únicas que dependen del tamaño hacen a los nanomateriales muy atractivos para aplicaciones biomédicas. Además del tamaño, las propiedades que contribuyen a la actividad de los nanomateriales incluyen la forma, hidrofiliidad y configuración electrónica. Los nanomateriales también pueden derivatizarse fácilmente a través de modificaciones de superficie para ajustarlos más a fin de servir en aplicaciones farmacéuticas (Liang et al., 2008).

La nanomedicina, por lo tanto, tiene como objetivo final lograr mayores beneficios médicos y mejorar la calidad de vida a través de la vigilancia, control, construcción, reparación, defensa y mejora de los sistemas biológicos humanos, tal como se define en la revista de la Fundación Europea de la Ciencia (ESF). La nanomedicina ofrece mejores elementos de diagnóstico, biosensores y agentes de imagen a nivel molecular, así como nuevas terapias y tecnologías avanzadas para la regeneración y reparación de enfermedades y tejidos en humanos (ESF Forward Look on Nanomedicine 2005: <http://www.nanopharmaceuticals.org/files/nanomedicine.pdf>).

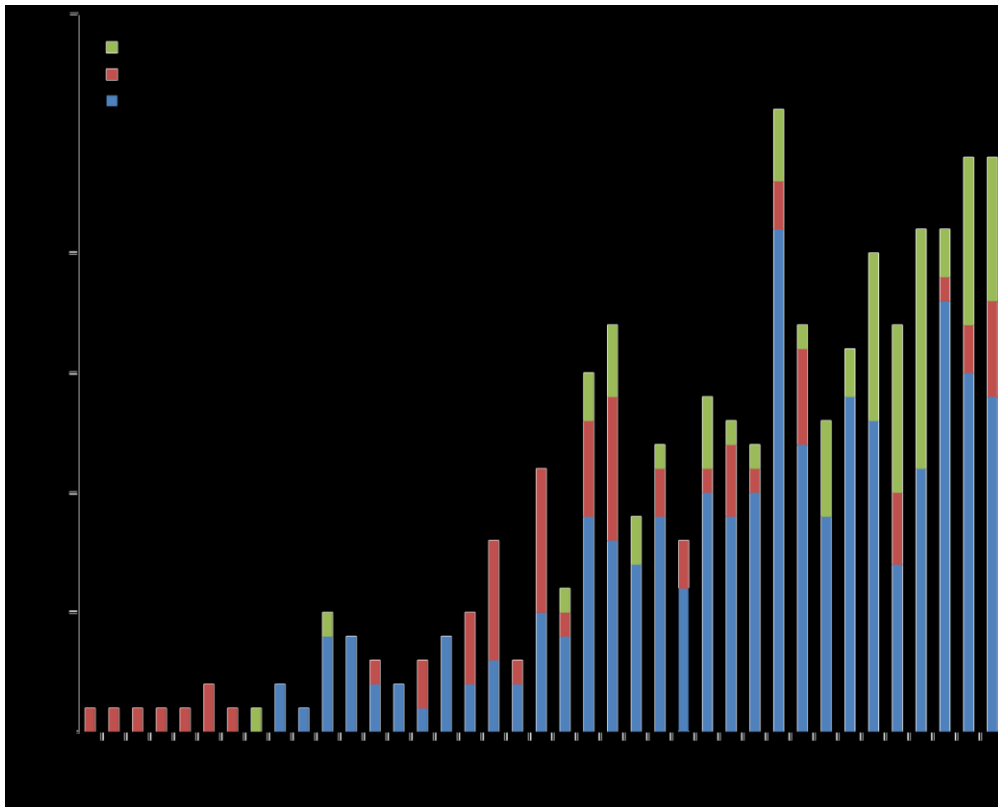
La FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) se encarga de la seguridad de los productos de consumo relacionados con la nutrición, la salud y el cuidado personal en USA. Por lo tanto, también es la responsable de valorar y regular los productos de esta



clasificación que contienen nanomateriales. En la mayoría de productos regulados por la FDA, se requiere de los conocimientos de la industria para asegurar que el producto satisface las normas de seguridad, siendo la evidencia científica absolutamente necesaria para justificar su seguridad. El grupo de trabajo en nanotecnología de la FDA hizo recomendaciones para una adecuada gestión de riesgos y una adecuada actuación (FDA et al, 2007).

La mayoría de productos que contenían nanomateriales aprobados por la FDA antes del año 2000 eran aplicados en terapia y no en dispositivos. Sin embargo, en la última década, la aprobación de aplicaciones terapéuticas se ha mantenido, mientras que se ha incrementado la aprobación de dispositivos con aplicaciones biomédicas (Figura 1.5 A y Figura 1.5 B) (Etheridge et al., 2013; Sheetal R. D’Mello et al., 2017).

A)



B)

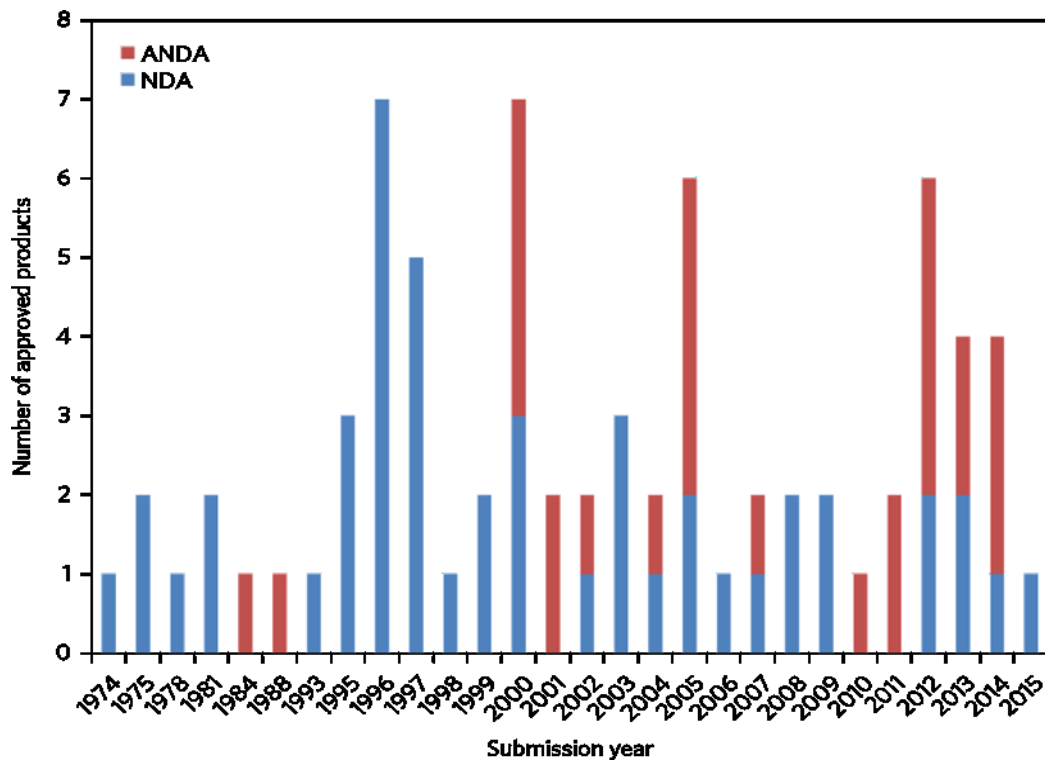


Figura 1.5. A) Gráfico representativo del número de aplicaciones de productos nanotecnológicos presentados a la FDA en nanomedicina, según si son aplicaciones de un fármaco genérico (ANDA), aplicaciones de un nuevo fármaco (NDA) o un nuevo fármaco en desarrollo (IND). B) Gráfico representativo del número de fármacos aprobados por la FDA a lo largo de los años que contienen nanotecnología. (Sheetal R. D'Mello et al., 2017).

Aplicaciones como sistemas de diagnóstico, implantes activos, biomateriales y sistemas de liberación destacan como novedosas aplicaciones médicas de las diferentes aplicaciones de los nanomateriales. (Wagner et al., 2006). Además, los nanomateriales con mayor número de aplicaciones en medicina son las nanopartículas poliméricas e inorgánicas, los liposomas, los nanotubos y nanoláminas de carbono (grafeno), óxidos de hierro y titanio, los dendrímeros o los QD's (los puntos cuánticos).

Los nanomateriales con un tamaño mayor a 10 nm tienen dificultades para ser eliminados por los riñones y dependiendo de su composición y revestimiento presentan mayor o menor tiempo de circulación en sangre. Muchas de las terapias que ya se aplican

hoy en día mediante nanomateriales son dirigidas a una diana, donde conseguir realizar su función. Modificando la superficie de las NPs se consigue escapar del sistema fagocítico mononuclear (SFM) y por lo tanto se aumenta el tiempo en circulación sanguínea (Lee D. E. et al., 2012). Gracias a la relación área-superficie-volumen que presentan los materiales de tamaño nanométrico, la capacidad de carga de ligandos se ve altamente aumentada (Wang et al., 2012). Además, muchos sistemas de administración de fármacos para el diagnóstico terapéutico basados en vectores inorgánicos como NPs de oro o QDs son fácilmente detectables ópticamente, facilitando la obtención de imágenes (Figura 1.6) (Doane et al., 2012).

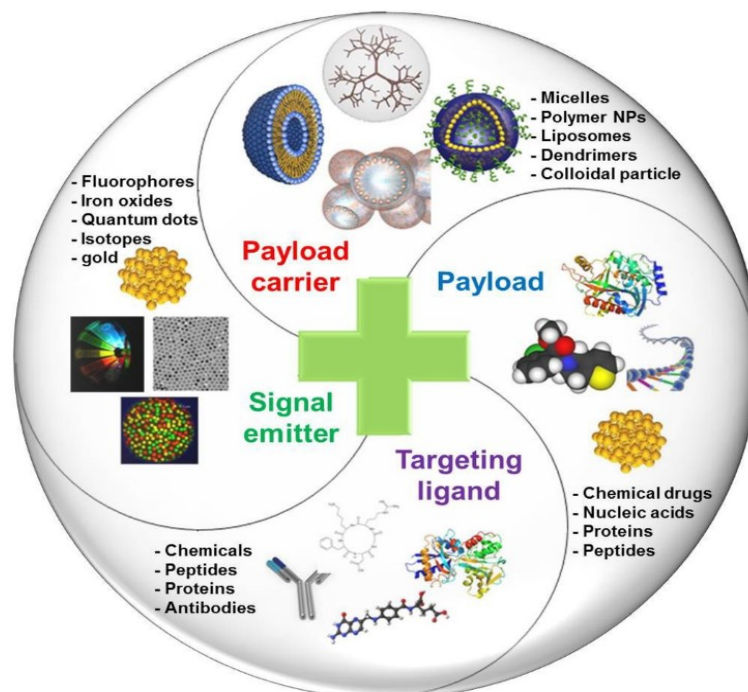


Figura 1.6. Esquema representativo de los teranósticos y materiales en nanomedicina divididos en cuatro categorías. La primera categoría está formada por elementos de encapsulación que a su vez hacen de transportadores (*Payload carriers*) como micelas, nanopartículas poliméricas, liposomas, dendrímeros y nanopartículas coloidales. La segunda categoría está formada por elementos de encapsulación (*Payload*) como moléculas químicas, ácidos nucleicos, proteínas y péptidos. La tercera categoría está formada por los ligandos dirigidos (*Targeting ligands*) como algunos químicos, péptidos, proteínas y anticuerpos. Finalmente, la cuarta categoría está formada por los emisores de señales (*Signal emitter*) como los fluoróforos, los óxidos de hierro, los puntos cuánticos, los isótopos o el oro (Jin-Kyu Rhee et al., 2014).

A pesar de que la nanomedicina es un concepto relativamente joven, las aplicaciones médicas de los coloides tienen una larga historia (Selmi, 1843). El nacimiento de la nanomedicina en la segunda mitad del siglo XX fue permitido por el descubrimiento de la química sintética del polímero algunas décadas anteriores (Baekeland, 1907). Los pioneros de los nanomateriales incluyen Faraday y sus estudios con oro coloidal en el siglo XIX y Mechnikov y Ehrlich que recibieron el Premio Nobel en 1908 por su trabajo sobre la fagocitosis y las terapias dirigidas a células. Las nanomedicinas innovadoras más avanzadas surgen del diseño racional y requieren la coordinación de varias disciplinas diferentes, tales como la química, biología, farmacología, toxicología y la clínica (Duncan & Gaspar, 2011).

Este conjunto de disciplinas se centra en conocer:

1. Las vías de exposición, incluyendo la inhalación, absorción dérmica y la ingestión (por ejemplo, en relación con los cosméticos y alimentos), así como los medios expuestos (por ejemplo, aire, agua y alimentos).
2. Las propiedades relacionadas con la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME), debido a que las interacciones biológicas pueden estar influenciadas por los cambios de tamaño.
3. El tamaño, la distribución del tamaño, la carga superficial, propiedades de la superficie, las interacciones entre partículas, comportamiento de las partículas, pureza, estabilidad y la variabilidad general de lote a lote (Hamburg et al, 2012).

### 1.3.1 Nanotecnologías en cosmética

El sector de los cosméticos fue uno de los primeros en investigar y desarrollar aplicaciones patentadas utilizando nanotecnologías y nanomateriales. Las aplicaciones cubren la formulación del producto, el embalaje, así como el equipo de fabricación de cosméticos. En los productos cosméticos, los nanomateriales se utilizan como sustancias activas, portadores y/o auxiliares de formulación con el objetivo de mejorar la eficacia del producto. En 2009 la Unión Europea adoptó un nuevo Reglamento de Productos Cosméticos (CE / 1229/2009) que contenía por primera vez requisitos específicos para los nanomateriales, que incluía una definición técnica con el término nanomaterial. Finalmente, en 2011 se aceptó en cosmética una definición general del término

«nanomaterial» en una recomendación de la Comisión de la Unión Europea (Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products:

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:en:PDF>).

En la actualidad no se dispone de información suficiente sobre los posibles riesgos asociados a los nanomateriales. Por lo tanto, se han introducido disposiciones adicionales para los nanomateriales. Hay que tener en cuenta que parte de los productos cosméticos pueden ser inhalados o ingeridos involuntariamente o ser liberados a un entorno abierto. Para que un producto cosmético sea considerado nanomaterial, la recomendación de la comisión europea sobre nanomateriales es que el 50% o más del número total de partículas, tiene que estar en un rango de tamaños de 1-100 nm y con un umbral máximo del 1% de aglomeramiento. Poco después se establece como 0,15% el número de partículas, en estado agregado o aglomerado y un rango de tamaños inferior a 100 nm como umbral de distribución de tamaños de los nanomateriales. Esta cifra es recomendada por el SCENHIR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) en el año 2009.

El Instituto Nacional Holandés para la Salud Pública y el Medio Ambiente (RIVM) señala explícitamente que los materiales que no califican como "nanomateriales" según la recomendación de la Comisión de la Unión Europea son automáticamente no seguros.

En las aplicaciones de los nanomateriales en los productos cosméticos, la Comisión incluye nanopartículas solubles. Los productos cosméticos que utilizan potenciadores de la permeabilidad requieren una atención especial. Mientras que la difusión pasiva es la forma más común de entregar los ingredientes activos a través de la piel, es importante mirar también a los nanocosméticos que están diseñados por ejemplo para liberar vitaminas, antioxidantes, filtros UV químicos y sustancias antienvjecimiento con precaución. Algunos de los nanocosméticos están diseñados como portadores o vehículos que liberan su carga de ingredientes activos en un tejido diana determinado. Esto puede ser importante para las personas que ya están sensibilizadas.

Las investigaciones sobre las alergias relacionadas con micro y nanoingredientes sugieren que en algunos casos los alérgenos de contacto encapsulados muestran reacciones significativamente menores en comparación con un grupo de control (Madsen, 2011). La Recomendación de la Comisión en su nueva definición prevé como criterio adicional la superficie específica en volumen e incluye también aglomerados y agregados. Además, tiene en cuenta los materiales porosos y las partículas con un diámetro muy pequeño ya que reaccionan a velocidades mucho más rápidas que los materiales compactos porque hay más superficie disponible para reaccionar (Bleeker et al., 2012).

En el Anexo II. se detalla como ha evolucionado la cosmética desde sus primeros inicios en el antiguo Egipto (3.000 aC), hasta hoy en día.

## **1.4 Nanopartículas de Oro**

### **1.4.1 Historia del oro médico**

El oro tiene una larga historia de uso terapéutico. Los alquimistas medievales introdujeron el concepto de "Elixir de la vida", una solución que contenía oro que había sido considerado una sustancia mágico-religiosa desde la época de la antigüedad clásica. En las culturas orientales, incluyendo China e India, los beneficios terapéuticos de las preparaciones de oro han sido reportados desde el año 2500 a. C. En el siglo 17, el oro llegó a las farmacopeas y el método más común de preparación fue la disolución del oro elemental en agua regia, seguido de calentamiento para eliminar el disolvente. Durante el siglo XIX surgió el desarrollo del doble cloruro de oro: una mezcla de cloruro de sodio y cloruro de oro que se utilizó para tratar la sífilis en forma de píldora. Las inyecciones de doble cloruro también se usaron para tratar el alcoholismo y como tratamiento de varias enfermedades incurables, como la tuberculosis, la diabetes y la epilepsia hasta el siglo XX. A continuación, el oro coloidal encontró su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide y los radioisótopos de oro en el tratamiento del cáncer (Higby, 1982).

Hoy en día, el oro coloidal es ampliamente utilizado en la medicina ayurvédica proveniente de la India para el rejuvenecimiento y la revitalización. En la medicina occidental, el compuesto de oro administrado por vía intramuscular, el aurotiomalato de sodio y la auranofina administrada oralmente se siguen utilizando para el tratamiento de la artritis reumatoide. Actúan como inmunomoduladores, pero sus mecanismos de acción precisos siguen siendo desconocidos. Además, el radioisótopo de oro se ha utilizado durante el siglo XX en inyecciones intratumorales para suministrar grandes cantidades de radiación ionizante a un tumor sin dañar los tejidos vecinos debido a la baja capacidad de penetración de los rayos beta, la radiación predominante de  $^{198}\text{Au}$  (Bhattacharya & Mukherjee, 2008).

### 1.4.2 Síntesis de las AuNPs

Las AuNPs pueden sintetizarse por diversos métodos. Estos enfoques químicos utilizan la reducción química de las sales de oro, las vías electroquímicas o la descomposición controlada de compuestos organometálicos metaestables. Para evitar la aglomeración, se utilizan diversos agentes estabilizantes. La protección puede lograrse mediante la estabilización electrostática, basada en la repulsión entre partículas, o la estabilización estérica, que utiliza moléculas orgánicas voluminosas para proteger la superficie de los NPs. Las principales clases de grupos protectores son: polímeros, donantes de P, N y S (por ejemplo: fosfanos, aminas, tioéteres), disolventes (por ejemplo: THF, THF / MetOH), alcoholes de cadena larga, tensioactivos y organometales (Zhou et al., 2009)

Dos de los métodos más populares para la síntesis de AuNPs esféricas fueron introducidos por Turkevich en 1951 y por Brust y Schiffrin en 1994. El método de Turkevich utiliza la reducción de citrato de sodio con la sal de oro ( $\text{HAuCl}_4$ ) en agua. El tamaño de las AuNPs resultantes se puede controlar variando la proporción del agente reductor en comparación con la sal de oro. Además del agente reductor, el citrato actúa también como un agente tamponador, estabilizando las NP después de la síntesis.

El método Brust-Schiffrin produce AuNPs de distribución de bajo tamaño. Este método permite la síntesis de AuNPs en soluciones orgánicas. Se trata de una reacción de  $\text{HAuCl}_4$  con tolueno en presencia de bromuro de tetraoctilamonio como reactivo de transferencia de fase y borohidruro de sodio como agente reductor. El dodecanotiol se usa como estabilizador en esta reacción (Daniel & Astruc, 2004).

Los métodos descritos anteriormente se usan para la síntesis de AuNPs esféricas. Además de las nanoesferas, las AuNPs también pueden ser sintetizadas en otras formas,



incluyendo nanorods (en forma de varilla), nanoshells (en forma de armazón o concha) y nanocages (en forma de caja con huecos porosos) (Figura 1.6) (Cai et al., 2008).



**Figura 1.3. Esquema representativo de los diferentes tipos de nanopartículas de oro.** Parkkola, H (2014). *Hyaluronic acid-coated gold nanoparticles as an anticancer drug delivery system – Biological characterization and efficacy (tesis doctoral)*. Universidad de Barcelona, España.

### 1.4.3 Propiedades de las AuNPs

Las propiedades fisicoquímicas de las AuNPs dependen de su tamaño, forma, distancia entre las partículas y su revestimiento superficial. Una característica muy interesante de las AuNPs con respecto a sus aplicaciones biomédicas es el plasmón de resonancia superficial (SPR). El SPR se define como el número de oscilaciones colectivas de los electrones en la superficie de las AuNPs que coinciden con el campo electromagnético de la luz entrante. El efecto SPR produce el color rojo intenso de la solución de AuNPs y su amplia banda de absorción a 520 nm, cuando el tamaño de las

NPs está entre 10 y 20 nm. La banda de absorción disminuye cuando el tamaño de las AuNPs disminuye. El efecto SPR también depende de la forma de las NPs y el pico de absorbancia se ensancha y cambia a azul cuando las NPs se agregan o aglomeran (Daniel & Astruc, 2004).

Las AuNPs absorben y dispersan la luz. Sus interacciones con la luz se pueden explotar de muchas maneras para visualizarlas mediante técnicas tales como microscopía de contraste de fases, microscopía de contraste de interferencia diferencial (imagen directa) y microscopía de campo oscuro (detección de luz dispersa). El color de la luz dispersa depende del tamaño y forma de las AuNPs, lo que permite el etiquetado con diferentes colores. La luz absorbida por las AuNPs conduce a la generación de calor, el cual puede ser detectado por imagen fototérmica, que detecta fluctuaciones de intensidad del líquido alrededor de las AuNPs, y por imagen fotoacústica, que detecta la onda sonora creada por expansión de líquido inducida por calentamiento. Las AuNPs también interactúan con ondas electrónicas y rayos X que proporcionan un alto contraste en microscopía electrónica de transmisión (TEM) e imágenes de rayos X. Otras características interesantes de las AuNPs son el apagado por fluorescencia (cuando los fluoróforos están cerca de las AuNPs), su espectro de dispersión Raman específico y su capacidad de transferencia de electrones (Sperling et al., 2008).

Además de poseer estas propiedades fisicoquímicas únicas, otra característica que hace que las AuNPs sean tan atractivas para la biomedicina es la facilidad de modificación y funcionalización de su superficie. Los métodos de síntesis de AuNPs más populares utilizan ligandos de tiolato para estabilizar las AuNPs, y estos tioles pueden ser fácilmente sustituidos por otras moléculas tioladas para funcionalizar las AuNPs y producir AuNPs modificadas en superficie para una variedad de aplicaciones (Daniel & Astruc, 2004).

Las AuNPs han sido confirmadas como biocompatibles por varios estudios *in vitro* e *in vivo* (Bhattacharya & Mukherjee, 2008), pero la biocompatibilidad depende siempre de las modificaciones superficiales, que pueden alterar las propiedades biológicas de las AuNPs. La funcionalización de las AuNPs con diferentes agentes va a determinar cómo estas AuNPs van a interactuar con su entorno. Debido a la gran

variedad de formas, tamaños y química superficial de las AuNPs (que pueden afectar a su órgano diana en el cuerpo humano) se debe llevar a cabo una evaluación toxicológica de cada material (Sperling & Parak, 2010).

#### **1.4.4 Toxicidad de las AuNPs**

Los compuestos basados en oro se han utilizado en clínica como agentes antiinflamatorios para tratar la artritis reumatoide (Auranofin® y Tauredon®) (Finkelstein et al., 1976). Además, micropartículas de oro radiactivas se han utilizado en el tratamiento local del cáncer (Metz et al., 1982). El inconveniente con las AuNPs es que su gran relación superficie/volumen y la gran variedad de modificaciones que se pueden realizar en su superficie, pueden afectar a la reactividad química de las AuNPs y esto a su vez puede generar mayores efectos toxicológicos que el propio material sin estar en tamaño nanométrico (Wang et al., 2011).

Se han publicado numerosos estudios de toxicidad, pero varían en el diseño experimental y la metodología (Lewinski et al., 2008). La Fundación “Risk Science Institute of Nanomaterial Toxicity” estableció en el año 2005 que la detección de la toxicidad en AuNPs debe consistir en tres estrategias: 1) caracterización del nanomaterial, 2) estudios in vitro y 3) estudios in vivo. Para desarrollar las estrategias del estudio, se debe tener presente la amplia gama de tamaños y propiedades fisicoquímicas que pueden afectar a la fiabilidad de los diferentes ensayos (Oberdörster et al., 2005)

Los expertos recomiendan analizar cada nanosistema independientemente. Las características específicas, conocidas a través de una exhaustiva caracterización del nanomaterial, afectan al perfil toxicológico, por ejemplo, las AuNPs con un diámetro de partícula menor de 2 nm poseen un grado inesperado de toxicidad superior a tamaños mayores (Schmid et al., 2008); también, dependiendo del recubrimiento químico de su superficie, el nanosistema puede ser capturado por el sistema fagocítico mononuclear

(SFM); la forma de la partícula puede dictar el inicio de la fagocitosis y afectar a las tasas de internalización celular (Fadeel et al., 2010).

Además, los factores externos pueden modificar el perfil toxicológico de las AuNPs. Los medios de crecimiento celular (para estudios *in vitro*) contienen proteínas de suero, aminoácidos esenciales, vitaminas, electrolitos y otros productos químicos que podrían interactuar con las AuNPs y cambiar sus propiedades fisicoquímicas (tamaño, estado de agregación, carga superficial y química de superficie) (Alkilany et al., 2010). Las AuNPs estables en solución acuosa tienen una carga superficial que estabiliza el sistema frente a la agregación a través de las repulsiones electrostáticas, pero la presencia de electrolitos y la alta fuerza iónica de los medios biológicos pueden provocar la agregación de las AuNPs a través de la interacción electrostática (Vesaratchanon et al., 2007).

Cedervall demostró que muchas proteínas plasmáticas son adsorbidas en NPs de forma espontánea adoptando las propiedades fisicoquímicas de la cubierta de las proteínas adsorbidas (Cedervall et al., 2007; Lynch et al., 2007; Lundquist et al., 2008). Los estudios de cultivos celulares *in vitro* son el método más utilizado para la evaluación de la nanotoxicidad. Sin embargo, siempre deben ir acompañados de estudios *in vivo*, ya que los datos obtenidos de los estudios *in vitro* pueden ser engañosos. Muchos de los ensayos *in vitro* dependen de la medición de cambios colorimétricos o de fluorescencia. Las AuNPs absorben luz en la región visible y debe considerarse la interferencia con estos ensayos. Además, las AuNPs pueden adsorber moléculas como colorantes indicadores de los medios o absorber fluorescencia (Alkilany et al., 2010).

Por otro lado, los estudios nanotoxicogenómicos pueden proporcionar información útil sobre los perfiles de expresión génica global en las células que han sido expuestas a las AuNPs y ayudar a comprender las respuestas biológicas provocadas por los nanomateriales. La proteómica también ha demostrado ser una herramienta útil para el estudio de las interacciones de las AuNPs con biomoléculas cuando estas entran en un entorno biológico.

En las estrategias in vitro también deben incluirse estudios de internalización celular ya que se ha demostrado una correlación con la toxicidad (Fadeel et al., 2010). En la Tabla 1.2 se resumen algunos resultados de toxicidad in vitro de las AuNPs en algunas líneas celulares.

**Tabla 1.2 Resumen de los resultados de toxicidad in vitro de las AuNPs.** (Alkilany et al., 2010): (1) (Goodman et al., 2004); (2) (Shukla et al., 2005); (3) (Connor et al., 2005); (4) (Pernodet et al., 2006); (5) (Patra et al., 2007); (6) (Khan et al., 2007); (7) (Pan et al., 2007); (8) (Villiers et al., 2010); (9) (Pan et al., 2009); (10) (Gu et al., 2009).

Tipo Celular	Tamaño (nm)	Superficie	Conclusiones	Referencia
Eritrocitos de mamífero	2	Amonio cuaternario, ácido carboxílico	AuNPs catiónicas son más tóxicas que las aniónicas	1
Macrófagos de Ratón	3.5	Lisina, Polilisina	AuNPs no tóxicas ni inmunogénicas	2
Leucemia humana	4, 12, 18,	CTAB, citrato cisteína, glucosa, biotina	AuNPs no tóxicas ni inmunogénicas	3
Fibroblastos dermales humanos	1, 13	Citrato	AuNPs produjeron disminución de la proliferación, adhesión y movilidad	4
Riñón de bebé de hamster	33	CTAB y citrato	AuNPs no tóxicas ni inmunogénicas	5
Carcinoma hígado humano	33	CTAB y citrato	AuNPs no tóxicas ni inmunogénicas	5
Carcinoma pulmón humano	33	CTAB y citrato	AuNPs fueron tóxicas	5
HeLa	1.4, 3.7, 15, 18	Citrato, Monofosfato de trimetilfosfina, GSH, PEG	AuNPs de 1.4 indujeron necrosis por estrés oxidativo, el resto de AuNPs no fueron tóxicas	6, 9, 10
Melanoma humano	0.8, 1.2, 1.4, 1.8, 15	Monotriphenilfosfina y trisulfonato	AuNPs de 1.4 fueron tóxicas, el resto de AuNPs no fueron tóxicas	7
Dendritas de ratón	10	Citrato	AuNPs no tóxicas y no indujeron activación de células dendríticas	8

Los estudios *in vivo* se ven limitados por factores éticos, económicos y prácticos. Los nanomateriales para uso clínico deben pasar por estudios de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) para conocer cuál es el comportamiento del material a nivel de biodistribución y farmacocinética. Además, los nanomateriales, a diferencia de muchos fármacos de moléculas pequeñas, pueden ser transportados a través del sistema linfático, lo que obviamente tiene implicaciones inmunológicas. Sin embargo, los nanomateriales pueden ser muy diferentes en tamaño y características fisicoquímicas, lo que hace difícil universalizar los estudios de ADME y las propiedades toxicológicas para reflejar las características de una clase de nanomateriales (Nyström et al., 2012).

*The ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Nanomaterial Toxicity Screening working group* propone en la evaluación de la toxicidad *in vivo* incluir las exposiciones por vía oral, tópica y parenteral. Además, estos estudios deberían incluir la evaluación de los marcadores de la inflamación, el estrés oxidativo y la proliferación celular en órganos y tejidos seleccionados (Oberdörster et al., 2005).

En el cuerpo humano las NPs interactúan con proteínas de la sangre y esta unión define la captación de las NPs por diferentes células del sistema inmune. Sin embargo, diversos estudios de seguridad realizados, sugieren que las NPs no son sustancialmente más inmunotóxicas que los medicamentos convencionales (Dobrovolskaia et al., 2007).

Experimentalmente, la posible citotoxicidad de las AuNPs es bastante contradictoria. Si las AuNPs no tienen ningún recubrimiento, los resultados de toxicidad son inciertos ya que se ha demostrado *in vitro* que aglomeran en medios fisiológicos y no se puede controlar la dispersidad de la solución (Vivero, 2014; Parkkola, 2014). Además, si el límite de concentración de partículas no es superior a las  $10^{12}$  partículas/ml, las AuNPs con diámetros entre 3 y 5 nm no son citotóxicas. La toxicidad con niveles inferiores a este número se asocia con diámetros de AuNPs de 1 a 2 nm y se justifica por la capacidad de las AuNPs de este tamaño para unirse a las biomoléculas como ADN,

cambiando el funcionamiento de los procesos moleculares celulares (Khlebtsov et al., 2011). En la siguiente tabla se resumen algunos experimentos *in vivo*, analizando la toxicidad de las AuNPs sin ningún tipo de recubrimiento (Tabla 1.3).

**Tabla 1.3 Resumen de los resultados de toxicidad in vivo de las AuNPs sin ningún tipo de recubrimiento.** (Alkilany et al., 2010). (1) (Kattumuri et al., 2007); (2) (Sonavane et al., 2008); (3) (Hillyer et al., 2001); (4) (Chen et al., 2009); (5) (Cho E. C. et al., 2009; Cho W.-S. et al., 2009); (6) (Bar-Ilan et al., 2009).

Animal	Tamaño Nanopartícula (nm)	Vía de Administración	Tiempo de Incubación	nº Animales	Conclusiones	Referencias
Cerdo	15-20	Intravenosa	0,5-24 h	3	Acumulación en pulmón e hígado, no se observan efectos secundarios	1
Ratón (ddy)	15, 20, 100, 200	Intravenosa	24 h	3	Acumulación en hígado y bazo todos los tamaños, las de 15 y 20 nm se encontraron también en corazón, estómago, riñón y cerebro	2
Ratón (BALB/c)	4, 10, 28, 58	Oral	168 h	NA	Absorción gastrointestinal, no toxicidad.	3
Ratón (BALB/c)	3, 5, 8, 12, 17, 37, 50, 100	Intraperitoneal	> 1200 h	6	3, 5, 50 y 100 no indujeron letalidad, pero sí las de 8, 12, 17 y 27 nm	4
Ratón (BALB/c)	13	Intravenosa	> 168 h	9	Produjeron inflamación y apoptosis en el hígado.	5
Pez Cebra	3, 10, 50, 100	Inyección en el agua	120 h	12	No produjeron toxicidad	6

## 1.5 Aplicaciones biomédicas de las AuNPs en dermo-cosmética

Estudios recientes dilucidaron las ventajas del uso de nanopartículas en los cosméticos (Alka et al., 2014; Wiechers & Musee, 2010). La industria cosmética está adquiriendo grandes ventajas de la nanotecnología a través del desarrollo de nanopartículas a medida para mejorar el rendimiento y la biodisponibilidad de ingredientes activos en productos cosméticos tales como protectores de solares, cremas antienvjecimiento, cremas hidratantes y perfumes (Patel et al., 2011).

Las nanopartículas de oro se han utilizado en diversos dispositivos médicos tales como en la desinfección de heridas de la piel, antiinflamatorios, cremas faciales y cremas antienvjecimiento (Alka et al., 2014).

Los beneficios del oro para el cuidado de la piel son muy diversos y su aplicación viene siempre dada en forma de coloide combinada con cubiertas poliméricas, lipídicas y marcajes con anticuerpos. También se utilizan muchas variantes en polvo de oro de 24K (99,9% de pureza) para su aplicación directa sobre la piel. Los beneficios del oro son ampliamente reivindicados a nivel mundial por el sector cosmético con una implicación muy importante en:

### **Reducción de arrugas, líneas finas y manchas:**

Los modelos de belleza han ido cambiando y el tener una piel clara, libre de arrugas y manchas es, actualmente, el deseo final de muchas mujeres y hombres. Las soluciones de oro coloidal (AuNPs) combinadas con aceites y extractos, o conjugadas a ingredientes nutritivos activan las células basales de la piel, aumentando así la elasticidad de la piel (Saraf et al., 2010).

Bloquear el transporte de melanina a la superficie de la piel es el método más eficaz para limitar la aparición de pecas y manchas de la edad. Por lo tanto, la acumulación localizada de la melanina en la superficie de la piel se puede reducir gracias a nanoterapias basadas en AuNPs (Biophoton, 2015). Por lo tanto, ayudan a reducir las arrugas, las líneas de expresión, manchas y marcas en la piel, reduciendo así los signos de la edad.

### **Estimulación de las células de la piel:**

Los iones presentes en las AuNPs conjugas con polietilenglicol ayudan a estimular las células, los nervios y las venas del cuerpo lo que conlleva a una mejor circulación



sanguínea. Esto aumenta el metabolismo de las células de la piel y la secreción de residuos (Luft, 1994).

### **Reducción del agotamiento del colágeno:**

El colágeno se produce naturalmente en el cuerpo y mantiene el cuerpo flexible. Es a su vez, el responsable de darle a la piel un aspecto liso. Los niveles endógenos de colágeno del cuerpo comienzan a agotarse a partir de los 25 años. Los cuidados de la piel a través de terapias mediante oro coloidal, combinadas con emulsionantes nutritivas, pueden ralentizar el agotamiento del colágeno en las células de la piel (Kim et al., 2005).

### **Protector frente al daño solar:**

Las nanopartículas de oro aumentan el factor de protección solar de los filtros solares comerciales debido a la reflexión y dispersión de la radiación UV (Borase et al., 2014).

### **Tratamiento de alergias:**

Las propiedades antioxidantes presentes en el oro ayudan a aumentar la circulación de la sangre que conduce a la reducción del acné y alergias de la piel (Frenk, 1995).

### **Efectos antiinflamatorios:**

Las AuNPs tienen propiedades antibacterianas y antiinflamatorias que ayudan al oxígeno a entrar en la piel para la renovación de las células. Esto ayuda en el tratamiento de úlceras y otros trastornos inflamatorios de la piel (Frenk, 1995).

**Aumento de la elasticidad de la piel:**

La piel tiende a hundirse cuando su elasticidad disminuye o se pierde por completo. El uso de las AuNPs evita la pérdida gradual de elastina y restaura la elasticidad de los tejidos. Esto impide que la piel se hunda, aumentando la elasticidad de la piel y dándole firmeza (Soto et al., 2015).

En conclusión, la aplicación de las AuNPs en la piel humana interviene en diferentes procesos que ayudan a mejorar su aspecto. No sólo ayudan a mantener la piel brillante, sino que también son beneficiosas al disminuir el agotamiento del colágeno, aumentar la elasticidad de la piel, estimular las células haciendo que la piel gane firmeza y previniendo el envejecimiento prematuro, la aparición de arrugas y las manchas solares (Otto et al., 2009; Wiechers & Musee, 2010; Prajapati et al., 2011; Alka et al., 2014).



# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Nuestro mayor conocimiento de la fisiología de la piel ha dado lugar a una revolución en la ciencia dermocosmética. Desde su aparición, los cosméticos han tenido como finalidad mejorar la apariencia personal mediante la aplicación directa sobre la piel; sin embargo, hoy en día los cosméticos han adquirido un nuevo papel en la dermatología a través del apoyo de la gestión de muchos trastornos de la piel. Este papel evolutivo de los cosméticos en el cuidado de la piel se debe principalmente a los avances científicos y tecnológicos que han cambiado la percepción y entendimiento de la fisiología de la piel y cómo los cosméticos están ayudando a mejorarla tanto física como biológicamente.

La mayoría de la investigación dermocosmética se lleva a cabo en modelos *in vitro* o de piel reconstruida, crucial en la investigación dermatológica, dada la prohibición estricta impuesta por la Unión Europea en pruebas con animales. Además, el diseño y la conducción de los ensayos que evalúan los productos dermocosméticos siguen actualmente reglas comparables a las utilizadas en el desarrollo y la evaluación de productos farmacéuticos. Los ingredientes activos dermocosméticos se prueban *in vitro* para medir su efecto preciso en la expresión de genes y proteínas. Los productos finales se evalúan a través de técnicas *in vivo* no invasivas (usadas también para ingredientes activos en estudios de prueba de concepto), junto con su impacto en la apariencia de la piel y su sensación en la piel. Estas técnicas son extremadamente útiles tanto para identificar nuevos ingredientes activos como para probar productos finales.

El objetivo de este proyecto ha sido realizar el desarrollo *in vitro* e *in vivo* de un nanosistema llamado “GH” (Golden Hyaluronan) diseñado por Endor Nanotechnologies como potente agente estimulante frente al envejecimiento celular de la piel. El GH está constituido por núcleos de oro de 12 nm que hacen de soporte a oligosacáridos de ácido hialurónico que podrían permitir alcanzar capas inferiores de la piel sin ser degradados. Al alcanzar capas más profundas, el GH podría actuar directamente sobre las células de la piel, interaccionando con sus receptores para estimular la síntesis de HA, colágeno y elastina, mejorando así la matriz extracelular de la piel y protegiéndola frente al estrés

oxidativo y el envejecimiento prematuro. Estos efectos podrían ser aplicados en un tratamiento facial, consiguiendo un aumento de la firmeza de la piel y una disminución en la aparición de arrugas. Además, este producto podría ser utilizado para otras aplicaciones corporales. Al estar aumentando la matriz extracelular, el GH podría también aumentar la densidad de la piel y/o su grosor y en consecuencia podría enmascarar las irregularidades que producen los hoyuelos de la celulitis. De manera que, afectando solamente a capas más profundas de la epidermis, el GH podría presentar un potente efecto rejuvenecedor de la piel de la cara, así como un potente efecto anticelulítico en los muslos.

Por lo tanto, en la presente tesis se pretende dar un enfoque científico multidisciplinario y examinar los principales factores en la investigación y el desarrollo de un producto dermocosmético, las directrices de seguridad y la reglamentación necesaria para su producción y comercialización.

Los objetivos específicos de esta tesis han sido:

### I. Caracterización del GH

Es imprescindible realizar los estudios de caracterización de los nanomateriales del proyecto antes de ser probados para confirmar la reproducibilidad y calidad de la producción. Las AuNPs resultantes de la síntesis deben ser dispersas, uniformes y con una distribución de tamaño reducido. La conjugación de las AuNPs con el HA, durante la producción del GH, no debe cambiar estas características.

II. Estudios de viabilidad celular

Se estudiará el perfil toxicológico *in vitro* del GH. Además, se analizará el potencial mutagénico y genotóxico del GH para descartar posibles lesiones en el genoma de las células.

III. Estudios de seguridad *ex vivo* y eficacia *in vitro*

Una vez realizados los ensayos de viabilidad celular se realizarán las pruebas de absorción transdérmica e irritación para determinar la seguridad del GH. Tras las pruebas de seguridad, se realizarán ensayos de migración, proliferación y expresión génica *in vitro* para determinar si entre los efectos del GH hay efectos que pudieran ser considerados regenerativos y antiedad.

IV. Estudios de seguridad y eficacia *in vivo*

Concluir la tesis con la validación de seguridad y eficacia del GH como ingrediente activo, mediante ensayos *in vivo* con voluntarios.





# MATERIALES Y MÉTODOS

---



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

La sección de materiales y métodos de esta tesis se divide en nueve capítulos que se distribuyen en seis partes principales.

**Parte 1:** Síntesis de nanomateriales: síntesis de AuNP, AuNP-HA (GH) y AuNP-PEG. Las AuNP-PEG han sido utilizadas como control de NPs en algunos de los estudios de viabilidad y en las técnicas de caracterización física y química para confirmar forma, tamaño y estabilidad de los nanomateriales.

**Parte 2:** Estudios de viabilidad celular y seguridad *in vitro*: estudios de toxicidad, mutagenicidad, genotoxicidad, absorción transdérmica e irritación.

**Parte 3:** Estudios de eficacia *in vitro*: diferentes estudios que determinarán si el producto es un ingrediente activo suficientemente competitivo para realizar los estudios en voluntarios como producto dermo-cosmético.

**Parte 4:** Estudios de seguridad y eficacia en voluntarios: se realizarán los estudios en voluntarios utilizando el GH como ingrediente activo dentro de un producto dermo-cosmético.

**Parte 5:** Producto Final: Diseño de la formulación final del producto, determinación de las especificaciones y completar ficha de registro europeo.

**Parte 6:** Análisis estadístico de los datos obtenidos.



### 3.1 Parte 1: síntesis de los nanomateriales

Los nanomateriales utilizados en este estudio son:

- GH (AuNP-HA): Nanopartículas de oro de 12 nm conjugadas a oligosacáridos de ácido hialurónico.
- AuNP-PEG: Nanopartículas de oro de 12 nm conjugadas a moléculas de polietilenglicol.
- HA: ácido hialurónico 10 kDa.

La síntesis de los nanosistemas conta de la síntesis y caracterización de las AuNPs, seguido de la conjugación a moléculas de HA o PEG.

#### 3.1.1 Síntesis de las AuNPs

Las AuNPs de 12 nm fueron sintetizadas por el equipo científico de Endor Nanotechnologies, donde inicialmente se realizó una puesta a punto del protocolo. Utilizando un balón de vidrio calefactado con un refrigerante en serpentín, se añadieron 150 ml de agua con agitación intensa y  $2,58 \times 10^{-3}$  M de citrato trisódico dihidratado: una vez llegó a ebullición, se inyectó rápidamente 1ml de  $\text{HAuCl}_4$  25 mM. Pasados 3 minutos se paró la reacción. El color de la solución pasó de transparente a rojo burdeos y se obtuvo una solución de NPs con 33 ppm de oro (síntesis 1X). (Figura 3.1).

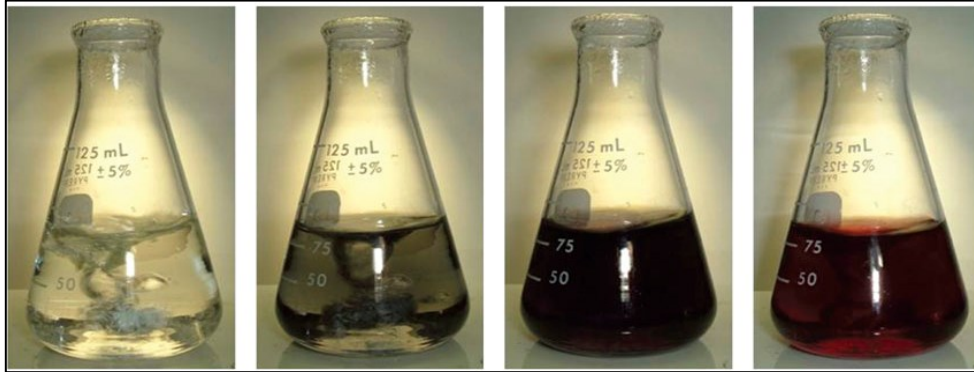


Figura 3.1 Evolución colorimétrica de la síntesis de AuNPs 100ppm. **Vivero, L (2014). *Diseño y caracterización de sistemas de liberación de fármacos basados en nanopartículas metálicas y ácido hialurónico (tesis doctoral)*. Universidad de Barcelona, España.**

Posteriormente, esta reacción de síntesis fue optimizada para conseguir concentraciones de AuNPs más elevadas. Se consiguió una solución de AuNPs con 100 ppm de Au (síntesis 3X), manteniendo las mismas condiciones anteriores, pero ajustando proporcionalmente la concentración de citrato trisódico dihidratado y la concentración de sal de oro.

### 3.1.2 Síntesis de AuNPs-PEG

Las nanopartículas de oro obtenidas en el apartado anterior están estabilizadas en el medio acuoso por el citrato, sin embargo, no están conjugadas a moléculas estabilizantes (conocidas en el sector como desnudas o naked). Estas AuNP no conjugadas no pudieron utilizarse como control en los estudios biológicos debido a que aglomeran en medios biológicos debido a las condiciones iónicas. En los experimentos en que fue necesario incluir un control de nanopartículas, se utilizaron AuNPs recubiertas por PEG (polietilenglicol), ya que se ha demostrado que son muy estables y biocompatibles y actuarían en nuestros experimentos como unas nanopartículas inertes. El PEG es posiblemente el recubrimiento más utilizado para hacer que los diferentes tipos

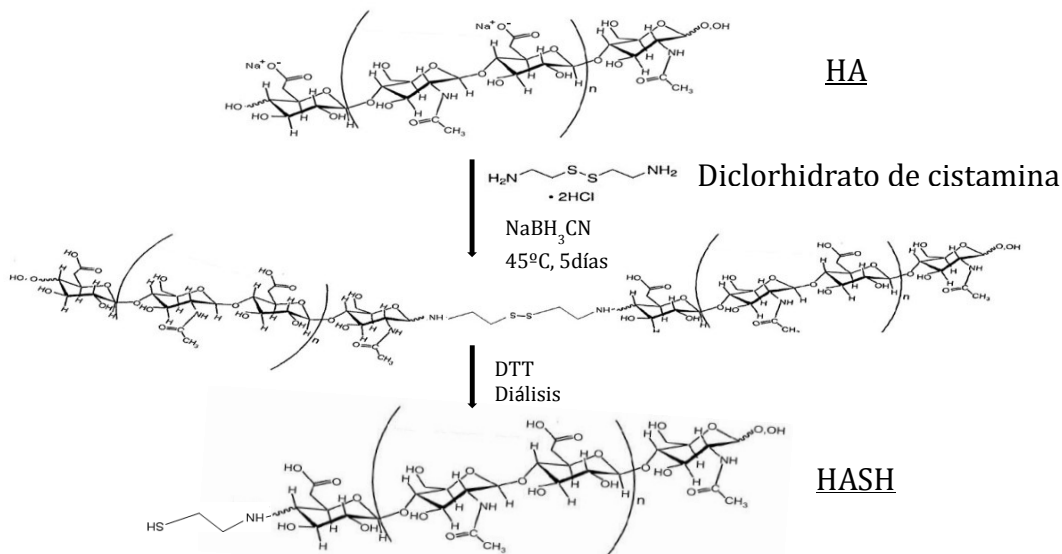
de NP sean biocompatibles y es ampliamente utilizado en la industria farmacéutica para alargar la vida media de los diversos agentes farmacéuticos (Fishburn, 2008), aunque también puede influir negativamente en el rendimiento como portador de fármacos en las nanopartículas. Las desventajas del recubrimiento con PEG incluyen la interferencia con las interacciones de las células y las AuNPs y las reacciones inmunes a las AuNPs-PEG (Amoozgar & Yeo, 2012).

Las AuNPs se sintetizaron como se describió anteriormente. Se añadieron 200 mg de PEG (O- [2- (3 - mercaptopropionilamino) etil] - O '- metilpolietilenglicol, Sigma - Aldrich) a 133,3 mL de AuNPs (100 ppm) y se dejó la reacción de conjugación en agitación durante 30 min hasta conseguir el nanoconjugado AuNP-PEG.

### **3.1.3 Síntesis de HASH**

Con el objetivo de unir fuertemente los oligosacáridos de HA a las AuNPs, se realizó una modificación a la sal sódica que consistió en añadir un grupo tiol terminal. La síntesis de la tiolación se siguió por el método descrito en la bibliografía y se representa en la Figura 3.2.





**Figura 3.2 Representación de la tiolación del HA** Vivero, L (2014). Diseño y caracterización de sistemas de liberación de fármacos basados en nanopartículas metálicas y ácido hialurónico (tesis doctoral). Universidad de Barcelona, España.

El diclorhidrato de cistamina se enlazó covalentemente en la posición terminal del polisacárido. El cianoborohidruro de sodio se utilizó para activar el carbono anomérico del polisacárido y facilitar la sustitución nucleófila de cistamina. El DTT se añadió para romper los enlaces disulfuros de la cistamina.

### 3.1.3.1 Tiolación del HA 10 kDa

La tiolación del HA 10 kDa se realizó disolviendo 0,35 mM de hialuronato sódico y 35,6 mM de diclorhidrato de cistamina en un tampón compuesto por 0,1 M  $\text{H}_3\text{BO}_3$  y 0,4 M HCl (pH 8). El balón de reacción se calentó a 45 °C con agitación. A continuación 0,2 M de cianoborohidruro de sodio se añadió y se dejó reaccionar durante 5 días bajo atmósfera de argón. Transcurrido este tiempo, se añadió 0,13 M de D-L-ditiotreitol durante una hora. Finalmente se dializó la solución en membranas con un punto de corte de 3,5 kDa, en una solución de 0,3 mM de HCl y 10,26 mM de NaCl inicialmente y una

solución con HCL a c,3 mM posteriormente. Una vez comprobado que el producto se había dializado correctamente, el producto final se liofilizó.

### **3.1.4 Síntesis del Golden Hyaluronan (GH)**

Una molécula de GH consiste en una AuNP de 12 nm recubierta por moléculas de HA unidas covalentemente a la AuNP. Para obtener este nanoconjugado, el primer paso fue la tiolación de HA de 10kDa, seguido de la diálisis y la liofilización (véase apartado 3.1.3.1).

La reacción se realizó en agitación, añadiendo 0,130 mM de HASH 10 kDa en una solución de AuNPs 12 nm (100 ppm) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Además, posteriormente a la conjugación se procedió a la dilución del lote de AuNPs 3X (100 ppm de Au) a 1X (33 ppm de Au). El nuevo lote de GH se esterilizó por filtración, se alicuotó y se guardó a 4 °C.

## **3.2 Parte 1: caracterización fisicoquímica de las AuNPs y del GH**

### **3.2.1 Microscopía electrónica de transmisión**

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) se basa en un haz de electrones que pasa a través de una muestra ultrafina en vacío, formándose una imagen a partir de las interacciones de los electrones con la muestra. Dependiendo de la densidad de la muestra, los electrones pasan o se dispersan y desaparecen de la viga. Los electrones no dispersados golpean una pantalla fluorescente y se forma una imagen de la muestra. Las muestras con alta densidad electrónica, como las AuNPs, pueden ser detectadas directamente por TEM, mientras que las muestras orgánicas necesitan ser procesadas previamente.

Se colocaron 10  $\mu\text{l}$  de AuNPs o GH en una rejilla de cobre (rejilla de cobre de malla 200 revestida con formvar, Ted Pella, INC.) y se secaron al aire. Las AuNPs fueron visualizadas por JEOL 1010 de la CCiTUB, a 80 kV con una cámara CCD Megaview III y el software de adquisición de imágenes AnalySIS. De cada muestra se midieron 200 NPs para el análisis de distribución de tamaño por ImageJ.

### 3.2.2 Dispersión de luz dinámica

La dispersión de luz dinámica (DLS) puede medir el tamaño medio (diámetro hidrodinámico) no sólo del núcleo de las NPs, sino también del recubrimiento orgánico que las envuelve. Además del diámetro de la muestra, DLS proporciona información sobre su dispersidad. DLS mide la fluctuación dependiente del tiempo (el movimiento browniano) en la intensidad de dispersión de una luz láser monocromática dirigida a la suspensión de la muestra.

Las muestras de AuNPs y de GH se analizaron en cubetas de plástico (*BrandTech Scientific, Inc.*) con una longitud de trayectoria óptica de 1 cm. El análisis de DLS se realizó utilizando Malvern Nano ZSizer de la serie *nano ZS* (*Malvern Instrument, UK*) a una longitud de onda de 532 nm con una dispersión de ángulo fijo de  $173^\circ$ . Se hicieron medidas de 3 lotes de GH por triplicado para obtener una media y una desviación típica del tamaño.

### 3.2.3 Potencial Z

El potencial Z (Pot Z) es una herramienta utilizada para determinar el estado de la superficie de las NPs y predecir así la estabilidad de la solución. Debido a los iones en superficie, las AuNPs en solución presentan una carga superficial. Cuando la diferencia entre las cargas de solvatación y la carga dispersa de la solución es baja, se dan las

condiciones adecuadas para la formación de aglomerados, ya que la carga superficial de las partículas atrae a otras partículas con cargas de signo contrario. Sin embargo, si el valor de Pot Z es alto (por encima de 30 mV), se dan las condiciones adecuadas para que las fuerzas de repulsión electrostática predominen y se evite así la formación de aglomerados.

Se midió el Pot Z en el Zetasizer de Malvern serie *nano ZS* (Malvern Instrument, UK) usando cubetas capilares en forma de U (*Disposable capillary cell*) con dos electrodos de placas paralelas planas (célula capilar desechable, instrumento Malvern). Se hicieron medidas de 3 lotes de GH por triplicado para obtener una media y una desviación típica del tamaño.

#### **3.2.4 Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo**

La espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) es capaz de detectar metales por ionización de la muestra a concentraciones tan bajas como ppt (partes por trillón) y luego separar y cuantificar estos iones. Además de cuantificar la cantidad de oro en la solución de AuNP, la ICP-MS puede usarse para detectar y cuantificar oro en células y tejidos animales con un proceso de digestión previo. Utilizamos ICP-MS para cuantificar las cantidades de Au en las soluciones de AuNP, GH y AuNP-PEG en:

- Soluciones producidas en cada síntesis (caracterización de lotes).
- Soluciones recogidas en el ensayo de seguridad *in vitro* (apartado 3.4.1, test de absorción transdérmica).

Una vez obtenida la cantidad de oro en solución por ICP-MS y conociendo el peso de una sola nanopartícula de 12 nm, se pudo conocer el número de NPs en suspensión utilizando la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ NPs} = V_{\text{Au}}/V_{\text{NP}} = (\text{mass}_{\text{Au}}/\delta_{\text{Au}})/(\pi * D^3/6)$$

Para determinar la concentración de Au en las soluciones orgánicas, las muestras fueron previamente digeridas con ácido nítrico, ácido clorhídrico y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que en conjunto forman agua regia, para degradar la parte orgánica de la solución. La digestión se realizó durante la noche a 90 °C. Después de la digestión, se prepararon muestras con un volumen definido de tiourea (Sigma-Aldrich) en HCl al 1% (dependiendo del peso de la muestra). El análisis de ICP-MS se realizó por el CCiTUB utilizando un PerkinElmer Optima 3200RL ICP-MS (Waltham, MS) en condiciones estándar. El HNO<sub>3</sub>, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el HCl utilizados en la digestión para el análisis de ICP-MS fueron en grado Instra-análisis (Baker) y el grado Supra-analizado (Merck).

### 3.2.5 Análisis elemental orgánico del GH

El análisis elemental orgánico (AEO) cuantifica la cantidad (típicamente un porcentaje de peso) de un elemento en un compuesto, más comúnmente carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre. La combustión de la muestra con un exceso de oxígeno puro a 1000 °C, da lugar a productos tales como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y N<sub>2</sub> que son arrastrados con He a través de un tubo de reducción y separados por conductividad térmica. Esta técnica solo puede cuantificar materia orgánica, por tanto, no puede cuantificar las AuNPs. Por ese motivo, se utilizó AEO para cuantificar la cantidad de HA que forma parte del GH.

Las muestras de GH se liofilizaron antes del análisis. El análisis fue realizado por el CCiTUB utilizando un analizador de elementos orgánicos Thermo EA 1108 (Thermo Scientific) en condiciones estándares recomendadas por el fabricante (flujo de helio a 120 ml / min, horno de combustión a 1000 °C, horno de columna cromatográfica a 60 °C, oxígeno dentro Del bucle: 10 ml, 100 kPa). También se empleó un analizador Thermo AEOFlash 2000 (Thermo Scientific) (flujo de helio a 140 ml / min, en un horno de combustión a 950 ° C, horno de columna cromatográfica a 65 ° C, oxígeno dentro del bucle: 10 ml, 250kPa).

El GH contiene moléculas de HA conjugadas a la superficie de las AuNPs y moléculas de HA en exceso. Para conocer el número exacto de cadenas covalentemente unidas a la AuNP, se utilizaron técnicas de separación y filtración que eliminaron las moléculas que no estaban unidas a las AuNPs. Primero se hizo la limpieza del exceso de HASH no conjugado y se utilizó el *Labscale* TFF system con membranas *Biomax* de Millipore de 100 NMWL. La purificación se realizó añadiendo agua destilada (10 veces el volumen inicial) y se concentró hasta 100 ppm de Au. De esta manera, pudimos calcular el número de cadenas de HA covalentemente unidas a las AuNPs usando los datos del AEO y del ICP-MS (Au cantidad) y el número calculado de AuNPs en solución.

### **3.2.6 Estudios de calidad y estabilidad**

La estabilidad de los ingredientes activos es el principal criterio para determinar la calidad de cualquier producto médico, farmacéutico o cosmético lanzado al mercado. La estabilidad se define como la capacidad de un producto médico, farmacéutico o cosmético para conservar sus propiedades químicas, físicas, microbiológicas y biofarmacéuticas dentro de límites especificados, a lo largo de su tiempo de conservación. Existen varias formas de inestabilidad, como por ejemplo la degradación química del ingrediente activo, la formación de productos tóxicos por efecto del proceso de descomposición o la inestabilidad producida por cambios de temperatura o pH que pueden disminuir la eficacia del producto final.

De cada lote de GH, se guardaron a 4 °C dos contramuestras de 50 ml debidamente etiquetadas. Posteriormente, se utilizó una de las dos contramuestras para proceder a los estudios de estabilidad, y poder confirmar así la calidad del producto.

### **3.2.6.1 Espectroscopia ultravioleta visible**

El fenómeno de desplazamiento de SPR cuando se produce el agregado de AuNPs puede ser examinado usando espectroscopia ultravioleta visible (UV-Vis) además de inspección visual. El pico de absorbancia característico de las AuNPs (520nm) y del GH (524nm) se desplaza hacia la derecha y se ensancha según el grado de agregación de las AuNPs.

Los espectros de AuNPs y GH en solución de síntesis se midieron con el espectrofotómetro Biotek PowerWave XS utilizando el software Gen5. Las lecturas se realizaron utilizando placas de 96 pocillos y un volumen mínimo de 150 µl de los nanomateriales.

### **3.2.6.2 Examen Visual**

La agregación de nanopartículas de oro en solución se visualiza fácilmente a simple vista debido al cambio de color del rojo al azul. La resonancia de plasmón superficial (SPR) de AuNPs de tamaño de hasta 20 nm causa la absorción de luz en el espectro azul-verde mientras que el rojo se refleja, produciendo el característico color rojizo. A medida que aumenta el tamaño de partícula, como por ejemplo debido a la agregación, la longitud de onda del SPR relacionada con la absorción se desplaza a longitudes de onda más largas, dando como resultado la absorción de la luz roja y produciendo la reflexión en azul. Este fenómeno se produce en color azul / morado representado en la Figura 3.3.

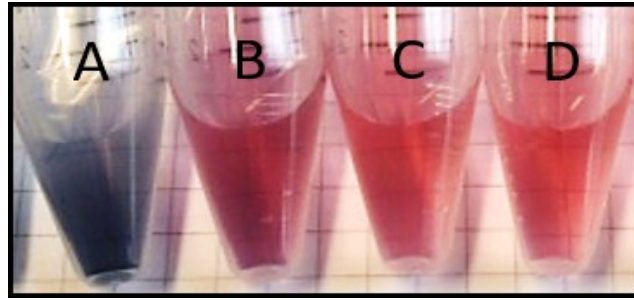


Figura 3.3 Solución de AuNPs agregadas de color azul (A) y AuNPs estables de color rojo de mayor a menor concentración (B, C y D).

### 3.3 Parte 2: estudios de viabilidad celular

La viabilidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conllevan a que se produzca un daño en las células que pueda ser detectado. Los estudios de viabilidad celular son capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con las estructuras celulares, con mecanismos esenciales para la supervivencia celular, la proliferación y/o las funciones metabólicas celulares (Repeto, 2002).

Para realizar los estudios de la viabilidad celular se escogieron dos líneas celulares humanas, una línea de fibroblastos dérmicos humanos (HDF, obtenidos en ATCC® con número de catálogo PCS-201-012™) y una línea de queratinocitos dérmicos humanos (HaCat, obtenidos en ATCC® con número de catálogo PCS-200-011™). Los fibroblastos dérmicos humanos derivan de la dermis de piel humana adulta y en condiciones de cultivo celular son capaces de sintetizar y secretar proteínas de la matriz extracelular. Los queratinocitos humanos (junto a los HDF), son unas de las células mejor caracterizadas y más utilizadas en la investigación dermatológica y cosmética ya que la epidermis se compone predominantemente de queratinocitos (Boukamp et al. 1988; Boukamp et al. 1997). HDF y HaCat son dos de las líneas celulares mejor establecidas para el análisis *in vitro* de la proliferación celular, migración celular y metabolismo del ácido hialurónico,



colágeno (tipo 2, 3, 4 y 5) y elastina, así como para la determinación de la cicatrización de heridas (Hedman et al, 1979).

### 3.3.1 Ensayo de toxicidad *in vitro*

Las pruebas de citotoxicidad *in vitro* se utilizan comúnmente en la definición del perfil toxicológico de productos químicos y farmacéuticos. A diferencia de los estudios con animales, es éticamente más aceptable y menos costoso de realizar, además de ser también más fáciles de controlar y de reproducir. Los ensayos más empleados para la citotoxicidad de los nanomateriales son aquellos mediados a través de evaluación de métodos colorimétricos. Sin embargo, las cuestiones de idoneidad de los diferentes métodos se han planteado y así como de las pruebas determinadas como válidas para los materiales que están siendo probados (Lewinsky et al., 2008).

Las líneas de fibroblastos humanos (HDF) y queratinocitos humanos (HaCat) (ATCC, Rockville, MD, EE.UU.) se cultivaron en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor (FBS) al 10% (v / v), 100 U / mL de penicilina y 100 µg / ml de estreptomina, utilizando un incubador con una atmósfera humidificada (95% de aire / 5% de CO<sub>2</sub> v / v) a 37 °C. Se

sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos (Corning Incorporated, New York, EE.UU.), 3000 y 5000 células / pocillo (HDF y HaCat respectivamente). Las células necesitaron un mínimo de 24 horas para adherirse, crecer y poder llegar a la fase logarítmica de crecimiento; posteriormente se añadió en cada pocillo una solución de GH 1X (33 ppm) previamente liofilizado y resuspendido en medio de cultivo celular completo. Se utilizaron una serie de diluciones que fueron de 1%, 3%, 25%, 50%, 75% y 100%. Tras 72 horas de incubación, las células se visualizaron por microscopía de luz invertida (Nikon E600) y se tomaron fotos. El tratamiento se retiró y las células se lavaron con PBS tres veces.

Con el fin de utilizar el ensayo más compatible con las nanopartículas de oro, se evaluaron diferentes ensayos, incluyendo NR y WST-1 además del MTT, pero todos ellos mostraron interferencia con AuNPs. Sin embargo, el ensayo de la hexosaminidasa demostró ser el más adecuado. En comparación con los otros métodos, el ensayo de la hexosaminidasa utiliza una longitud de onda muy diferente al pico de absorción de las AuNPs y no interfiere con ellos (Figura 3.4) y (Tabla 3.1).

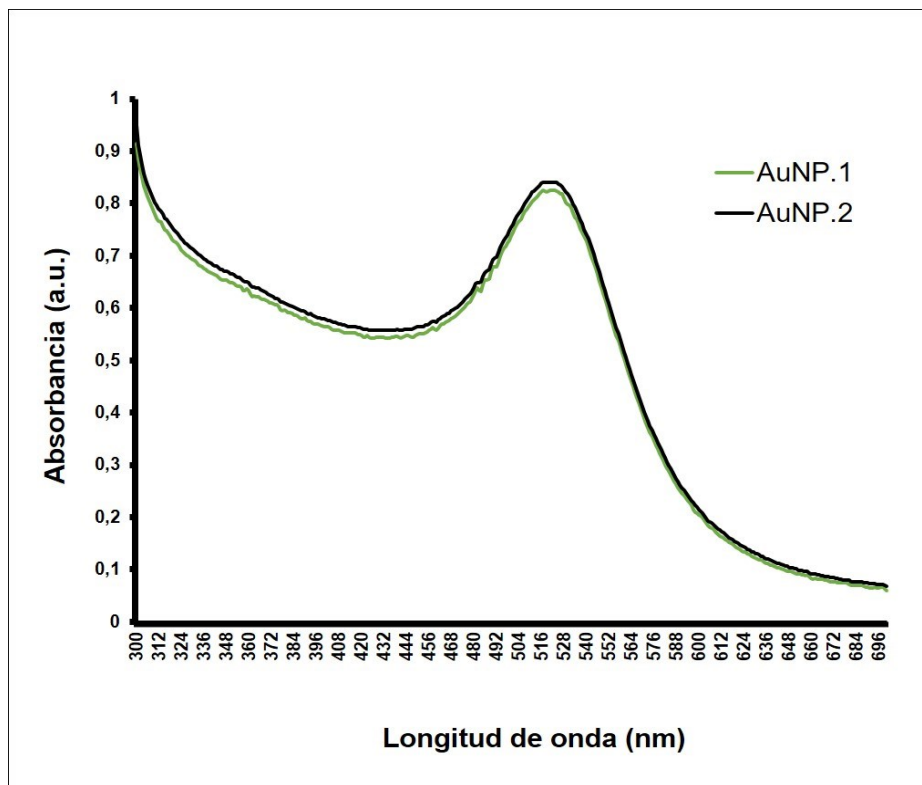


Figura 3.4 Espectro de absorción de dos lotes de AuNPs de 12 nm con su característico pico de 520nm.

Tabla 3.1 Longitudes de onda de los diferentes ensayos más utilizados para evaluar y cuantificar la viabilidad celular.

Reactivo	Longitud de onda (nm)
MTT	570
NR	550
WST-1	450
HEX	410

El ensayo que se utilizó para testar la toxicidad celular fue el ensayo de la hexosaminidasa, que utiliza el reactivo 4-nitrofenil N-acetil-beta-D-glucosaminida; éste es un sustrato para la hexosaminidasa endógena que cataliza la escisión del 4-nitrofenol y que puede medirse por espectrofotometría. Se añadió una primera solución “sustrato” previamente reconstituída según las instrucciones del fabricante y tras una hora a 37 °C se añadió la solución de revelado también reconstituída de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Tabla 1.1). Acto seguido se midió la absorbancia a 410 nm utilizando el espectrofotómetro Biotek PowerWave XS y la viabilidad celular relativa se analizó.

**Tabla 1.12 Ensayo utilizado en el estudio de viabilidad celular.**

<b>Ensayo</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Incubación</b>	<b>Solución de revelado</b>	<b>Absorbancia</b>
HEX	Sigma-Aldrich	1 hora	EDTA-glicina	410 nm

Las células utilizadas como control negativo fueron tratadas con medio de cultivo celular completo. Los experimentos de citotoxicidad se realizaron con 6 repeticiones paralelas y al menos tres veces con ambas líneas celulares. La muestra de GH utilizada para los estudios de citotoxicidad se analizó por ICP-MS para calcular las concentraciones exactas de Au y esta información se utilizó para la determinación del IC50. Las curvas de viabilidad celular se construyeron a partir de los datos resultantes de los ensayos de viabilidad celular y los valores del IC50 se calcularon utilizando las curvas de viabilidad generados por GraphPad Prism.

### **3.3.2 Ensayo de mutagénesis de Ames (*Ames Test*)**

Una parte importante de la evaluación de la seguridad es la identificación de sustancias capaces de inducir mutaciones. Los productos químicos que pueden inducir mutaciones probablemente pueden causar daños en la línea germinal y son incluso capaces de inducir cáncer.

El ensayo de mutagénesis de Ames es un ensayo de mutación bacteriana diseñado para detectar una amplia gama de agentes químicos capaces de causar daño genético. Este ensayo emplea varias cepas dependientes de *Salmonella typhimurium* que llevan diferentes mutaciones en el operón de histidina y cepas de *Escherichia coli* dependientes de triptófano que llevan mutaciones en el gen *trpE* que codifica para el componente antranilato sintasa I, una enzima necesaria en la síntesis de triptófano. Cuando estas cepas de prueba se cultivan en placas de agar que contengan medio mínimo con trazas de histidina / triptófano, sólo las bacterias que reviertan a histidina / triptófano-independiente podrán formar colonias. Siempre hay un número relativamente constante de revertientes espontáneas, que aumenta cuando se añade un mutágeno (Mortelmans y Riccio, 2000; Mortelmans y Zeiger, 2000).

Las cepas bacterianas usadas en el test de mutagenesis fueron: *Salmonella typhimurium* cepa TA98, TA100 y TA1535 y *Escherichia coli* cepa WP2 *uvrA* pKM101 (Tabla 3.3). Las cepas se obtuvieron de la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia).

**Tabla 3.3 Cepas bacterianas utilizadas en el ensayo de mutagénesis de Ames.**

Cepa bacteriana	Mutación	Reversión	Factor limitante
<i>S. typhimurium</i> TA98	Cambio en el marco de la pauta de lectura en la posición -1	Cambio en el marco de la pauta de lectura	Histidina
<i>S. typhimurium</i> TA100	GAG/CTC to GGG/CCC	Sustitución de un par de bases	Histidina
<i>S. typhimurium</i> TA1535	GAG/CTC to GGG/CCC	Sustitución de un par de bases	Histidina
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	Mutación ámbar sin sentido	Transición / transversión	Triptofano

Se resuspendieron las bacterias liofilizadas en medio de cultivo líquido y se incubaron durante la noche a 37 ° C con agitación. Al siguiente día, las bacterias fueron sembradas en placas de agar glucosa mínima (GM) con exceso de biotina e histidina (TA98, TA100 y TA1535), ampicilina (TA98, TA100 y WP2 *uvrA* pKM101) y triptófano (WP2 *uvrA* pKM101) para crear clones individuales. Este proceso de purificación se repitió dos veces. Los clones de la segunda placa de purificación se colocaron en una

placa de agar GM fresco (suplementado con nutrientes apropiadamente para permitir el crecimiento bacteriano) a fin de tener una placa control. Cuando se observó crecimiento bacteriano, los clones se inocularon en el medio de cultivo y se realizó un análisis genético para asegurar el mantenimiento de la integridad genética. Los parámetros estudiados fueron biotina, histidina, biotina & histidina y dependencia al triptófano, resistencia a la ampicilina (cepas incluyendo el plásmido pKM101), marcador *uvrA* (sensibilidad extrema a la irradiación de luz ultravioleta) y la mutación *rfa* (modificación en la capa de lipopolisacáridos de la membrana celular bacteriana, propiciando una mayor permeabilidad de la célula a moléculas grandes) (Tabla 3.4 y Tabla 3.5).

**Tabla 3.4 Dependencia de las diferentes cepas bacterianas a biotina, histidina, biotina & histidina y triptófano verificadas por análisis genético.**

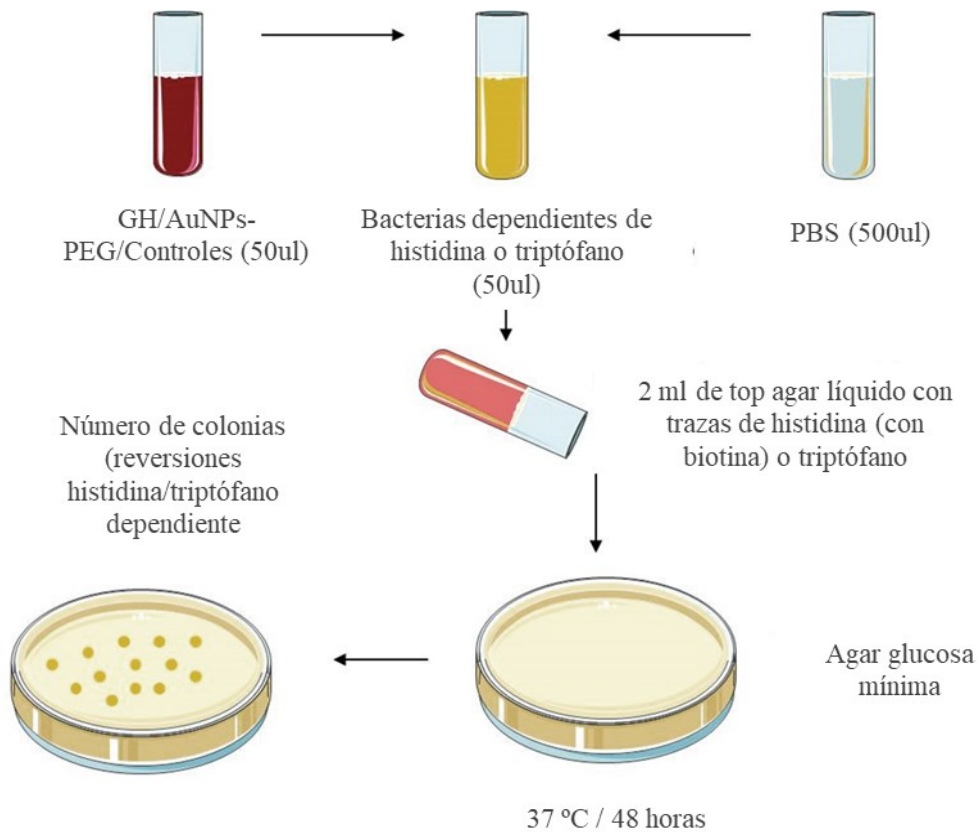
Cepa bacteriana	Biotina	Histidina	Biotina & histidine	Triptófano
<i>S. typhimurium</i> TA98	+	+	+	-
<i>S. typhimurium</i> TA100	+	+	+	-
<i>S. typhimurium</i> TA1535	+	+	+	-
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	-	-	-	+

**Tabla 1.1 Características de las diferentes cepas bacterianas utilizadas.**

Cepa bacteriana	Resistencia Ampicilina	Marcador <i>uvrA</i>	Mutación <i>rfa</i>
<i>S. typhimurium</i> TA98	+	-	+
<i>S. typhimurium</i> TA100	+	-	+
<i>S. typhimurium</i> TA1535	-	-	+
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	+	+	-

Para iniciar el ensayo de mutagénesis se cultivaron los clones que habían pasado el análisis genético. Al día siguiente se prepararon las diluciones de GH a 100 ppm, 22 ppm, 11 ppm, 2,2 ppm, 1,1 ppm y 0,11 ppm y una dilución de AuNPs-PEG como control negativo a la máxima concentración de tratamiento del GH (100 ppm) y se pre-incubaron con los cultivos de bacterias ( $1-2 \times 10^8$  bacterias) y PBS a 37 °C durante 20 min con agitación en tubos de vidrio estériles. 2 ml de solución *top agar* líquido con biotina e histidina (*S. typhimurium*) o triptófano (*E. coli*) se añadió a cada tubo después de la pre-

incubación. Posteriormente las mezclas se vertieron en placas de agar MG. Después de la solidificación de solución de *top agar*, las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h y las colonias que se habían formado se contaron (Figura 3.5). El experimento se realizó con muestras por triplicado y además se utilizaron los controles positivos de mutagénesis inductores específicos de cada cepa (Tabla 3.6).



**Figura 3.5 Procedimiento pre-incubación en el ensayo de mutagénesis de Ames.** Parkkola, H (2014). *Hyaluronic acid-coated gold nanoparticles as an anticancer drug delivery system – Biological characterization and efficacy* (tesis doctoral). Universidad de Barcelona, España.

**Tabla 3.6 Controles de mutagénesis inducida cepa-específica del Ames Test.**

Cepa Bacteriana	Control Positivo (placa)	Proveedor
<i>S. typhimurium</i> TA98	4-Nitro-o-phenylenediamine (2,5 ug)	Sigma-Aldrich
<i>S. typhimurium</i> TA100	Sodium azide (5 ug)	Sigma-Aldrich
<i>S. typhimurium</i> TA1535	Sodium azide (5 ug)	Sigma-Aldrich
<i>E. coli</i> WP2 uvrA (pKM101)	Mitomycin C (0,5 ug)	Sigma-Aldrich

### 3.3.3 Ensayo de genotoxicidad de cometa (*Comet Assay*)

Los productos químicos genotóxicos pueden causar alteraciones en la estructura de ADN o bien unirse al ADN y producir lesiones perjudiciales para el genoma humano. El ensayo del cometa es una técnica ampliamente utilizada en la identificación de sustancias genotóxicas. El ensayo del cometa, también conocido como ensayo de electroforesis en gel de célula única (SCGE), es una técnica cuantitativa, que mide el daño del ADN mediante la cuantificación de la migración de los fragmentos de ADN desnaturalizado fuera del núcleo durante la electroforesis (Liao et al., 2009).

Se utilizaron dos líneas celulares, HDH y HaCat, (ATCC, Rockville, MD, EE.UU.) que se sembraron en placas de 12 pocillos,  $3 \times 10^5$  células por pocillo. Después de 24h se añadió en los pocillos una solución de GH a la concentración stock (100 ppm) en medio de cultivo celular completo. Las células se trataron durante 6 h tras las cuales se cambió el medio y 24h después del inicio del tratamiento, las células se recogieron por tripsinización, se centrifugaron y se resuspendieron en PBS. Las suspensiones de ambas líneas celulares se mezclaron con agarosa de bajo punto de fusión al 1% a 37 °C (Sigma-Aldrich), y se colocaron en un portaobjetos de vidrio previamente recubierto con agarosa de rutina al 1% (Sigma-Aldrich) y se cubrieron con un cubreobjetos de vidrio. Los portaobjetos se dejaron a 4 °C durante 10 minutos y posteriormente los cubreobjetos de vidrio se retiraron. Seguidamente, los portaobjetos se sumergieron en tampón de lisis durante 1 hora a 4 °C. Después de lisar las células, los portaobjetos se enjuagaron con agua destilada y se dejaron en un tampón de electroforesis para permitir el desovillado alcalino del ADN durante 20 minutos a 4 °C. Las muestras corrieron en el mismo tampón durante 20 minutos a 4 °C a 25 V. Los portaobjetos se enjuagaron durante 5 minutos a 4°C con tampón de neutralización. La lisis, la electroforesis y la neutralización se llevaron a cabo en oscuridad. Finalmente, los portaobjetos se tiñeron con 1 ug/ml DAPI (Sigma-Aldrich) y los cometas se visualizaron en el microscopio Nikon E600.

El daño en el ADN se cuantificó mediante el análisis del porcentaje de ADN de la cola de 50 células por tratamiento usando CaspLab - Comet Project Software. Como control positivo se utilizaron células tratadas durante 20 minutos con 100 mM de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### **3.4 Parte 2: estudios de seguridad *In vitro***

La valoración de la seguridad *in vitro* en los ingredientes activos destinados a cosmética es básica para el cumplimiento de las directrices relativas al anexo I del Reglamento (CE) nº 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre seguridad de los productos cosméticos (<https://www.boe.es/doue/2013/315/L00082-00105.pdf>).

#### **3.4.1 Test de absorción transdérmica**

Este estudio fue realizado en colaboración con el Servicio de Absorción Percutánea del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). El objetivo fue determinar el nivel de seguridad del GH según la absorción percutánea *in vitro* durante 24 horas de exposición. El estudio se llevó a cabo en biopsias de piel de cerdo colocadas en membranas de difusión estática Franz™ (Lara-Spiral, Courtenon, France) donde se pudo analizar la distribución compartimental dérmica del GH.

En este estudio se siguieron estrechamente las directrices de la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) y el dictamen del Comité Científico de Productos Cosméticos y Productos no Alimentarios (*Guideline 428, Paris (2004)*). También se consideraron otros principios clásicos y actualizados de absorción percutánea (Bronaugh et al., 1982, 1991; Diembeck et al., 1999; ECETOC, 1993; Franz, 1975; Howes et al., 1996; Schaefer and Redelmeier 1996; Scott et al., 1992a).



La determinación analítica del oro se realizó de acuerdo con la metodología de espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

#### **3.4.1.1 Procedimiento de ensayo**

La piel se obtuvo de la parte posterior sin hervir de cerdas que pesaron aproximadamente 50 kg. La mayor parte de la grasa subcutánea se eliminó con un bisturí y la piel se enjuagó con agua del grifo. La piel se extrajo con un dermatomo GA630 (Aesculap, Alemania). Se utilizó el punzón con un diámetro interior de 2,5 cm para obtener discos de piel que encajaron en las membranas de difusión. En el estudio se usaron solamente discos de piel intacta (sin cortes, cicatrices, arañazos, manchas, marcas rojizas o lesiones). En cada biopsia se determinó el grosor de la piel con un medidor dérmico (Mahr, Alemania) antes de ser colocada en la membrana de difusión de 1,86 cm<sup>2</sup> de área expuesta, con el lado epidérmico hacia arriba. Sólo se utilizaron biopsias cutáneas con un grosor de 500 ± 50 µm.

La membrana de difusión consistió en una cámara donante superior y una cámara receptora inferior, separadas por la biopsia de piel. La parte inferior se llenó con el fluido receptor a través de una entrada lateral usando una pipeta pasteur de 3 ml. El fluido receptor fue PBS (1000-3, Sigma, EE.UU.) a pH 7,4 con adición de albúmina de suero bovino al 1% (p / p) (A - 9647, Sigma, EE.UU.) y sulfato de gentamicina al 0,04% (p / p) (G - 1264, Sigma, EE.UU.). Las burbujas de aire visible, entre el lado inferior de la piel y el líquido receptor, fueron eliminadas por entrada lateral para asegurar un contacto total.

Las membranas se colocaron en un baño de agua a fin de mantener una temperatura superficial epidérmica de 32 ± 1 °C. Se verificó la integridad de las biopsias evaluando la pérdida de agua transepidérmica con una sonda Tewameter TM210 (Courage & Khazaka, Colonia, Alemania). Las membranas que mostraron una pérdida superior a 15 gr/m<sup>2</sup>/hora fueron eliminadas y reemplazadas por otras.

Una vez completada la evaluación de las biopsias, se aplicó una solución de GH (a una concentración stock de 33 ppm de oro) y una solución de síntesis ( $2,58 \times 10^{-3}$  M de citrato trisódico dihidratado) como control negativo, en la cámara donante superior de las membranas a una dosis de aproximadamente  $5 \mu\text{l} / \text{cm}^2$ , realizando un ligero masaje con una varilla de vidrio redondeada durante unos segundos. La aplicación de las dos soluciones se realizó por triplicado. Tras 24 horas de tratamiento, se limpió la superficie de la piel con un lavado específico y se recogió el fluido receptor.

El estrato córneo de la piel fue descamado 8 veces usando cintas adhesivas D-Squame (CuDerm, Dallas, USA) y ejerciendo una presión de  $80 \text{ gr} / \text{cm}^2$  durante 5 segundos. La cantidad de oro cuantificada en las cintas correspondió a la cantidad que quedó en el estrato córneo. La epidermis se separó de la dermis después de calentar la piel a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  durante unos segundos.

Las muestras analizadas fueron de dos tipos: líquidas (soluciones de lavado / fluidos receptores) y sólidas (estrato córneo en las cintas / epidermis / dermis). Las soluciones no necesitaron ningún tratamiento en particular. Los fluidos receptores y las soluciones de lavado se analizaron directamente. Por el contrario, las muestras sólidas se sometieron a una preparación adicional para separar las muestras a analizar de las membranas.

Se eligió una disolución de HCl al 1% como solvente para la preparación (dilución o extracción) de cada tipo de muestra durante el estudio de absorción percutánea. El líquido receptor, las tiras de cinta con el estrato córneo, la epidermis y las muestras de dermis se analizaron mediante la metodología ICP-MS para cuantificar su contenido de oro.

### 3.4.2 Test de irritación ocular

El test de irritación ocular HET-CAM es uno de los métodos más extendidos en la evaluación de la irritación de un producto cosmético. El estudio se basó en la observación, de los efectos irritantes (hiperhemia, hemorragia y coagulación) que pueden ocurrir cinco minutos después de la aplicación del elemento de prueba (en este caso, una solución de GH) en la membrana corioalantoidea de huevos embrionados de gallina, en el décimo día de incubación. La técnica utilizada fue una adaptación de la descrita por Luepke N.P. Y Kemper F.H. (La prueba de Het-Cam: "Una alternativa al ensayo de ojos de Draize", Food Chem. Toxicol., 1986, 24, n ° 6/7, 495-496). El estudio se realizó íntegramente en las instalaciones del Departamento Bio Técnico de la empresa Evic France, en Blanquefort, reconocida por su cumplimiento con los principios de "Buenas Prácticas de Laboratorio".

Para la realización del estudio se proporcionaron 2 muestras, una de GH a una concentración de 33 ppm y otra de NaCl al 0,9% como control negativo. También se incluyó un control positivo a través de una curva estándar de soluciones de SDS (*Sodium dodecyl sulfate*, L6026 Sigma) al 0,05%, 0,4% y 3,2% en agua ultrapura (1.01262, Sigma). Si la concentración de SDS 0.05% daba una puntuación de  $0.5 \pm 1.2$ , la concentración de SDS 0.4% daba una puntuación de  $12 \pm 0$  y la concentración de SDS 3.2% daba una puntuación de  $21 \pm 0$ , el resultado del ensayo quedaba validado.

Se utilizaron huevos embrionados de gallina Leghorn blanca, clasificados entre 40 y 75 g suministrados por: COUVOIR de Cerveloup - 400 domaine de cerveloup 38210 Vourey. El lote de huevos fue identificado y puesto en un horno termostato a  $14 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  °C fuera de la luz, durante al menos 24 horas antes de introducirlos en la incubadora.

Pasadas las 24 horas, los huevos fueron puestos en una incubadora, bajo condiciones controladas de temperatura ( $37.8\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Durante el período de incubación de 10 días, los huevos fueron volteados al menos dos veces al día. El octavo día de incubación, los huevos se colocaron en posición vertical con la cámara de aire hacia arriba.

#### **3.4.2.1 Procedimiento del ensayo**

El GH fue atemperado a  $37^{\circ}\text{C}$  antes de proceder a su uso. Las diferentes etapas del estudio se realizaron en una iluminación constante, que no dio demasiado calor para evitar el marchitamiento de la membrana corioalantoidea (CAM). En el día 10 de incubación, los huevos se sacaron de la incubadora uno por uno y se visualizaron con una lámpara. Los óvulos defectuosos (que no se correspondían a la fase de desarrollo embrionario esperada) fueron eliminados y los huevos seleccionados se colocaron en un soporte, manteniendo la posición con la cámara de aire hacia arriba.

La cáscara de cada huevo seleccionado se perforó (con una aguja lanceolada), se abrió y cortó (con unas tijeras de extremos romos) a nivel de la cámara de aire hasta los límites de la membrana de la cáscara. A continuación, se humedeció toda la superficie de la membrana con una solución de cloruro sódico al 0,9%, previamente atemperada a  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se inclinaron los huevos para eliminar el exceso de la disolución de cloruro de sodio al 0,9% y la membrana de la envoltura se retiró con cuidado usando unos alicates para descubrir la CAM subyacente. Cualquier huevo cuya membrana corioalantoidea se dañó en este proceso (desgarro, presencia de hemorragia y cualquier otra lesión) se rechazó inmediatamente.

La aplicación del GH se realizó en 4 huevos. Se depositaron 300  $\mu$ l sobre la CAM, con una jeringa (1 ml). Inmediatamente después de la aplicación, se midió el tiempo de exposición. Después de 20 segundos de contacto, la CAM se enjuagó con 15 ml de solución isotónica de cloruro sódico (mantenida a 37°C), con una jeringa muy cuidadosamente. Por inclinación del huevo se eliminó el líquido de enjuague. Los fenómenos de irritación se observaron durante 5 minutos.

Los 20 segundos de contacto se incluyeron en la observación de 5 minutos. Al final del estudio, los embriones fueron destruidos por enfriamiento rápido a -200 °C. Las medidas tomadas en la evaluación del ensayo se realizaron visualmente, bajo lámpara.

Los fenómenos observados (hiperemia, hemorragia y coagulación) no fueron valorados según su intensidad sino según su presencia o ausencia: es una respuesta de todo o nada. La evaluación del potencial irritante se realizó de acuerdo con una escala de puntos en función del tiempo transcurrido hasta la aparición de cada fenómeno (Tabla 3.7) y cuya suma de puntos iba 0 a 21.

**Tabla 3.7 Equivalencia en puntos según el tiempo que transcurre hasta la aparición de los tres parámetros evaluados: hiperemia, hemorragia y coagulación.**

<b>Hiperhemia</b>
<b>0 - 30 segundos = 5 puntos</b>
<b>&lt; 2 minutos = 3 puntos</b>
<b>2 <math>\leq</math> 5 minutos = 1 punto</b>
<b>Hemorragia</b>
<b>30 segundos = 7 puntos</b>
<b>&lt; 2 minutos = 5 puntos</b>
<b>2 <math>\leq</math> 5 minutos = 3 puntos</b>
<b>Coagulación</b>
<b>30 segundos = 9 puntos</b>
<b>&lt; 2 minutos = 7 puntos</b>
<b>2 <math>\leq</math> 5 minutos = 5 puntos</b>

El GH se clasificó en una de las categorías definidas de acuerdo con la puntuación media obtenida (Tabla 3.8) llevada a cabo según los tres conceptos que se definen a continuación:

### **Hiperemia**

Fenómeno observado: los capilares que no eran visibles antes de la adición del producto se hacen visibles mientras que los capilares visibles se dilatan y se vuelven más rojos. Este fenómeno también puede afectar a los vasos de mayor diámetro.

### **Hemorragia**

Fenómeno observado: liberación de sangre escapando de vasos y / o capilares, teniendo diferentes apariencias, y en particular en "coliflor", en capa, en velo difuso, en punta (la sangre escapa selectivamente de diferentes lugares de la membrana). Cabe resaltar que la hemorragia puede tener una característica de corta duración; Sin embargo, debe tenerse en cuenta, - la observación, durante los primeros 30 segundos, de una hemorragia masiva requiere tener en cuenta la hiperemia oculta.

### **Coagulación**

Aparición total o parcial en la membrana de un velo opalescente que evoluciona posiblemente a opacidad o de opacidad directa. Es necesario comprobar que este fenómeno no está relacionado con el comportamiento fisicoquímico del producto en medio acuoso (por ejemplo, formación de un coloide, precipitado).

Tabla 3.8 Escala detallada del potencial irritante de los elementos de prueba en la membrana corioalantoidea.

Puntuación media	Clasificación
$\leq 1$	No irritante
$1 \leq 5$	Débilmente irritante
$5 \leq 9$	Irritante moderado
$9 \leq 21$	Irritante

### 3.5 Parte 3: estudios de eficacia *in vitro*

#### 3.5.1 Ensayo de migración celular

El ensayo de la herida es uno de los métodos *in vitro* más comunes y utilizados para estudiar la migración celular (Liang et al., 2007). Una línea de fibroblastos humanos (HDF) y queratinocitos humanos (HaCat) (ATCC, Rockville, MD, EE.UU.) fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado por calor y 1% de antibióticos (100 U de penicilina  $\text{ml}^{-1}$  y 100 U  $\text{ml}^{-1}$  estreptomicina) a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de  $\text{CO}_2$ . Las células se sembraron a una densidad de  $300 \times 10^5$  y  $500 \times 10^5$  células respectivamente en placas de 6 pocillos y se cultivaron durante 24 h. Después de la formación de una monocapa completa, se produjo una herida en forma de línea que fue producida mediante el rascado con una punta de micropipeta estéril. Los restos celulares se lavaron con PBS. Las células fueron tratadas con una solución de GH 1X (33 ppm) al 3% y 10%, además de incorporar un control con HA 10kDa al 3% y 10% y un grupo como control negativo sin tratamiento. La movilidad celular de las células se determinó por su capacidad de migración y movimiento celular. El cierre de la herida fue fotografiado 12 h después de la incubación con microscopía de luz invertida (Nikon E600) con el objetivo 40x.

### 3.5.2 Ensayo de proliferación celular

La valoración de la proliferación celular *in vitro* es una de las primeras aproximaciones para testar los efectos de un compuesto sobre un tipo celular. Este dato da una buena idea sobre qué tipo de respuesta se podría esperar del GH al utilizarlo *in vivo*.

Las células HDF y HaCat (ATCC, Rockville, MD, EE.UU.) se sembraron en placas de 96 pocillos,  $3 \times 10^5$  a  $5 \times 10^5$  células/pocillo respectivamente. Después de adherirse en la placa durante 24hrs y llegar a la fase logarítmica de crecimiento, se trataron con cuatro soluciones de GH 1X (33 ppm) preparadas al 1%, 3%, 5% y 10% comparándose con su mismo control de HA al 1%, 3%, 5% y 10%. Tras 48 hrs de incubación, se retiró el tratamiento y las células se lavaron 3 veces con PBS. Se añadió la solución de substrato previamente reconstituída según las instrucciones del fabricante y tras una hora a 37 °C se añadió la solución de revelado también reconstituída de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Acto seguido se midió la absorbancia a las longitudes de onda recomendada de 410 nm utilizando el espectrofotómetro Biotek PowerWave XS y la viabilidad celular relativa fue analizada.

### 3.5.3 Ensayo de expresión génica

El HA es ampliamente utilizado como compuesto antienvjecimiento en productos cosméticos. Por esta razón, el efecto antienvjecimiento del GH en células de la piel humana se estudió mediante la evaluación de la expresión génica de HAS-2 ya que la producción de HA endógeno es promovida en gran parte por esta sintasa intracelular. También se analizó la expresión génica de COL 1 que se encuentra abundantemente en la dermis dando resistencia al estiramiento de la piel, además la expresión génica de COL 3 que es el segundo tipo de colágeno en la dermis y estrechamente relacionado con el COL 1. Por último, se analizó la expresión génica de ELASTINA ya que la elastina es



una proteína del tejido conjuntivo con funciones estructurales que, a diferencia del colágeno proporciona principalmente resistencia y elasticidad a los tejidos.

El ácido hialurónico, el colágeno y la elastina endógenos son sintetizados principalmente por los fibroblastos epidérmicos humanos (HDF) aunque el ácido hialurónico endógeno también puede ser sintetizado por los queratinocitos, pero en menor medida (Wang et al., 2006). Por lo tanto, se estudió la expresión de HAS-2, COL 1, COL 3 y ELASTINA en HDF y la expresión de HAS-2 en HaCat. El estudio se hizo a nivel de ARN mensajero mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

Se sembraron 100.000 células HDF y 150.000 células HaCat en placas de 6 pocillos. Tras 24 horas en cultivo, se detuvo el ciclo celular por privación de suero y 24 h más tarde, se trataron las células con una solución al 3% y 10% de GH en medio de cultivo celular sin suero y se utilizó una solución al 3% y 10% de HA en medio de cultivo celular sin suero como control. Las células se trataron durante 48 horas. Después de la incubación, se retiraron los tratamientos. Se lavaron las células 3 veces con PBS, se añadió 1 ml por pocillo del reactivo Tri Reagent (Sigma) y se rasparon las células. El ARN se extrajo de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se cuantificó usando un espectrofotómetro. El ARN se convirtió en cDNA con el kit de transcripción inversa de cDNA de alta capacidad (Applied Biosystems) y se utilizó el cDNA en la PCR cuantitativa a tiempo real utilizando SYBR® Green de Applied Biosystems. Los ensayos incluyeron HAS-2 (Hs00193435\_m1), COL 1 (Hs01076777\_m1), COL 3 (Hs00943809\_m1), ELASTINA (Hs00355783\_m1) y 18S (Hs99999901\_s1) (Tabla 3.9). Las condiciones de la qPCR se detallan en (Tabla 3.10). Los datos se analizaron según el número de umbral de ciclo (C (T)) y se normalizaron en relación al gen 18S rRNA endógeno, a través del software *StepOne* de *Applied Biosystems*.

Tabla 3.9 Genes analizados por PCR a tiempo real mediante SYBR® Green de Applied Biosystems.

Gen	Longitud	Número de catálogo
HAS-2	63 bp	Hs00193435_m1
COL 1	135 bp	Hs01076777_m1
COL 3	65 bp	Hs00943809_m1
ELASTINA	71 bp	Hs00355783_m1
18S	187 bp	Hs99999901_s1

Tabla 3.10 Condiciones de ciclo de la qPCR. En detalle las rampas de temperatura y los tiempos.

Step	Conditions	Cycle repeats
Activación del Uracil-DNA Glicosilasa	2 min; 50 °C	Choque térmico ( <i>hold</i> )
Activación de la polimerasa	10 min; 95 °C	Choque térmico ( <i>hold</i> )
Desnaturalización	15 s; 95 °C	40 ciclos
Alineamiento del cebador / Extensión de la cadena	1 min; 55 °C	
Elongación final	1 min; 72 °C	
Curva de disociación	(70–95 °C; rampa 0,3°C/s)	-

### 3.6 Parte 4: estudio de seguridad en voluntarios Patch Test

En este estudio se ha comprobado la compatibilidad cutánea del GH (a una concentración de 33 ppm) después de una sola aplicación en la piel en condiciones experimentales exageradas.

Este estudio es mono-céntrico y se realizó en abierto, donde cada voluntario que participó fue su propio control al comparar la piel de la zona cubierta con el parche del tratamiento, respecto a la piel sin parche del lado opuesto. El estudio se realizó según las

condiciones generales de Evic Hispania, establecidas para la realización de este proyecto como prueba en humanos.

### 3.6.1 Voluntarios

El número de voluntarios del estudio fue 23, con un límite inferior aceptable de 19, de acuerdo con el procedimiento correspondiente. Durante la realización del estudio no se decidió ninguna exclusión. Por lo tanto, se evaluó la compatibilidad del producto en 23 voluntarios.

Todos los voluntarios fueron elegidos en función de los criterios específicos de no inclusión (ver Anexo III). Las condiciones experimentales del ensayo se detallan a continuación (Tabla 3.11).

**Tabla 3.11 Detalle de las condiciones experimentales: \* Parche semi-oclusivo -TruMed®: soporte absorbente en Webril® en el que se colocó el producto (160 µl o aproximadamente 160 mg), mantenido en posición por un adhesivo médico no tejido (superficie: 400 mm<sup>2</sup>).**

Área de aplicación	Material	Condiciones de uso experimental	Cantidad aplicada	Tiempo de contacto	Tiempo de control tras retirar el parche
Espalda	Parche semi oclusivo TruMed®	Aplicación del producto tal y como fue suministrado	160mg	48h +/- 5h	15min 24h +/- 2h

### 3.7 Parte 4: estudios de eficacia en voluntarios

La regulación europea que define el desarrollo y comercialización de los productos cosméticos hace un énfasis especial en la necesidad de demostrar la efectividad de los productos cosméticos, en un entorno en el que, debido a la prohibición de uso de

modelos experimentales animales, sólo es posible el estudio en modelos alternativos (*in silico*, *in vitro*, en cultivo, etc.) o en voluntarios sanos.

Cualquier reivindicación debe figurar en el expediente de seguridad, y puede ser demostrada a través de un test de eficacia en voluntarios sanos, aplicando el producto en zonas específicas a tratar y utilizando medidas instrumentales que recogen información sobre el aspecto de la piel antes y después de las aplicaciones del producto, demostrando de esta forma el efecto de su reivindicación. El Reglamento (UE) número 655/2013 de la Comisión (Criterios comunes a los que deben responder las reivindicaciones relativas a los productos cosméticos) establece los criterios comunes armonizados para la UE, a fin de evaluar si el uso de una reivindicación está o no justificada.

Los estudios realizados en voluntarios deben respetar las reglas éticas (Colipa Guidelines, 2008). Los productos deben haber sido previamente sometidos a una apropiada investigación de seguridad y deben realizarse en aquellos voluntarios a los que vaya destinado el producto final, definido por criterios de inclusión/exclusión. Dependiendo del objetivo del estudio, las pruebas pueden ser abiertas, simples o doble ciego.

Para comprobar la eficacia del GH en voluntarios, se han realizado dos estudios en el Instituto de Fotomedicina de la Clínica Quirón Teknon, dirigido por el Dr. Joan Ramón Garcés. El Instituto de Fotomedicina desarrolla todo tipo de técnicas de vanguardia para el análisis, diagnóstico y tratamiento de la piel. Estos estudios fueron supervisados por el Director Médico del Instituto de Fotomedicina, el Dr. Joan Ramón Garcés (Dermatólogo) y su Directora de Láser Cutáneo, Dra. Eva Ciscar (Médico Estética) y dirigidos por el investigador Gabriel Buendía Bordera.

### 3.7.1 Estudio anti-edad

El ensayo abierto es un ensayo en el que tanto el paciente como el investigador conocen la identidad de los fármacos empleados. En este caso, se realizó un ensayo abierto con voluntarios para determinar un posible efecto anti-edad. Se evaluó la aplicación combinada de dos formulaciones (sérum y crema) diseñadas para la óptima penetración y eficacia del GH al 3% como ingrediente activo. Antes de proceder a la aplicación de ambas formulaciones, se siguió un protocolo de limpieza compuesto por dos pasos: el primer paso fue eliminar las impurezas de la piel (como aceites faciales o restos de maquillaje), utilizando una leche limpiadora convencional que se aplicó a través de un masaje intenso y se eliminó con una toalla húmeda o algodón. El segundo paso se realizó aplicando un jabón muy suave activado con agua que eliminó las impurezas solubles en agua además de desinfectar la piel.

Una vez se realizó la limpieza de la cara, la piel quedó limpia y seca, y preparada para la aplicación del tratamiento compuesto por un sérum y una crema. El sérum que es absorbido por la piel rápidamente, liberaría el GH en las células durante un período muy corto de tiempo, produciendo un efecto muy intenso. Tras la aplicación del sérum se procedería a la aplicación de la crema. Su función sería complementaria al sérum. La crema liberaría el GH en las células de manera progresiva. La intensidad del efecto no sería tan alta como la del sérum, pero sostenida durante todo el día, potenciando el efecto del sérum.

Participaron en el estudio 23 mujeres sanas de edades comprendidas entre los 35 y 50 años y la edad promedio del grupo fue de 39,61 años. Estableciendo como criterios de inclusión que ninguna de ellas fuera fumadora, ni estuviera embarazada, ni fuera menopáusica, ni tampoco estuviera bajo ningún tipo de tratamiento hormonal. Todas las voluntarias debían presentar señales de envejecimiento visibles (arrugas, manchas y flacidez), así como una condición de melasma facial. A las voluntarias se les prohibió el uso de cualquier producto cosmético o realizar cualquier tipo de procedimiento estético en su cara durante la duración del estudio.

El diseño del estudio requirió que las voluntarias se aplicaran dos veces al día (mañana y noche) tanto el suero como la crema en todo el rostro durante un período total de 28 días.

La evaluación de la eficacia en la textura, las arrugas y el análisis de la matriz extracelular epidérmica / dérmica se realizó a través de los datos cuantitativos recogidos durante dos visitas: la línea de base o día 0 y a los 28 días de seguimiento. Además, se realizaron mediciones de la humedad de la piel el día de inicio del ensayo y el último día del ensayo. La evaluación de la textura de la piel y de las arrugas se realizó mediante topometría 3D, la condición de la matriz extracelular epidérmica y dérmica se evaluó a través de Ultrasonidos de Alta Frecuencia de 50 MHz y la piel. La humedad se midió a través de una sonda de capacitancia dieléctrica.

### **3.7.1.1 Estudio fotográfico**

Se tomaron fotografías de la cara a  $0^\circ$  y  $\pm 45^\circ$  con una Nikon D300 sobre una estructura específicamente diseñada en un banco de captura, el Visio 4D (Eotech, Francia) (Figura 3.6), para asegurar que la altura de la cámara, el ángulo y la distancia a las voluntarias fuera constante durante el estudio. Se obtuvo una iluminación difusa y polarizada homogénea a través de dos flashes Elinchrom StyleRX 600 y filtros de gel de polarización lineal. En algunas ocasiones se añadió otro filtro de polarización lineal a la lente de la cámara para conseguir la misma intensidad de luz en la sala.



**Figura 3.6 Banco de posicionamiento Visio 4D utilizado para capturar las imágenes 3D de la textura y topometría de la piel.**

### **3.7.1.2 Estudio de la hidratación**

La evaluación de la humedad de la piel se realizó con una sonda de capacitancia dieléctrica MY-808S (Scalar, Japan) (Figura 3.7) tomando 3 medidas en ambas mejillas, en el área periocular y en la frente y promediándolas para obtener una representación global de la humectación de la piel. Se establece el 38% como valor estandarizado de referencia para una piel normalmente húmeda. Sin embargo, como la condición de la piel, la climatología y la estación del año, la edad, la hora del día, etc., pueden tener un gran impacto, se estableció una nueva referencia interna comparando los datos obtenidos con una voluntaria externa al estudio (control interno), usuaria del mismo producto desde un año antes del estudio; de esta manea, esta referencia se consideraba que era el efecto máximo alcanzable (control positivo). De esta manera se normalizaron los datos respecto

a la referencia interna. Los resultados de la referencia interna fueron 43% en la línea de base y 41% después de 28 días. Los resultados se mostraron como porcentaje de humedad.



**Figura 3.7** Medidor de humedad escalar (MY-808S Scalar, Japan) utilizado para la medición de la humedad de la piel.

### 3.7.1.3 Estudio topométrico de la piel con FOITS

Las capturas 3D de la textura de la piel y de la topometría se realizaron con la herramienta FOITS (Topología óptica *in vivo* rápida de la piel humana) con el banco de posicionamiento Visio4D permitiendo reposicionar tanto a las voluntarias como al sistema de proyección de franjas en el mismo lugar, altura y ángulos y con un sistema de proyección de franjas DermaTOP (Breuckmann, Alemania) (Figura 3.8). Se capturó un área de 60x80mm en ambas áreas periorbitales utilizando el objetivo de 50mm, destinado a la textura de la piel (rugosidad) y a la evaluación de las arrugas del área periorbital (Abella, 2006; Lagarde et al., 2001 & Lagarde et al., 2005; Vogelgesang et al., 2011; Sainthillier et al., 2013).



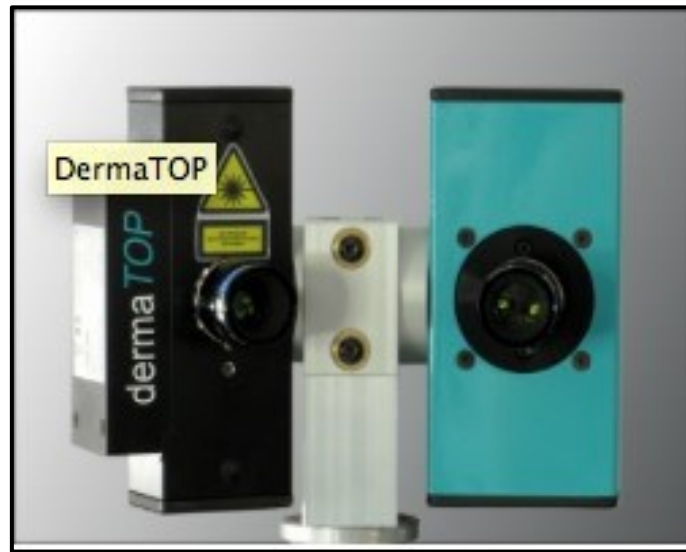


Figura 3.8 Sistema de proyección de franjas Derma TOP utilizado en el posicionamiento de las voluntarias.

Las variables métricas consideradas en el estudio 3D se definen a continuación:

**Sa (Altura promedio de la arruga)**

Es el promedio de las ordenadas del perfil de rugosidad. Se ha convertido prácticamente en una de las variables de rugosidad estándar utilizadas para controlar superficies muy finas en mediciones científicas y evaluaciones estadísticas. Se da en mm.

**St (Profundidad máxima de la arruga)**

Es la distancia vertical entre el pico más alto y el valle más bajo de la superficie. Se da en mm.

**Volumen de la arruga (mm<sup>3</sup>)**

Representa la suma de los volúmenes negativos creados por las arrugas presentes en la captura 3D.

**Circunferencia de la arruga (mm)**

Representa la suma de los perímetros de las arrugas.

**Área de la arruga (mm<sup>2</sup>)**

Representa la suma de la superficie de la piel que constituye las arrugas presentes en la captura.

**Profundidad promedio de los picos máximos de la arruga (mm)**

Representa el promedio de la distancia vertical entre las partes más bajas y más altas de las arrugas.

**Altura media de la arruga (mm)**

Representa el promedio de todas las distancias verticales presentes en todas las arrugas.

El procesamiento de estas capturas se realizó con el software AEVA 14.0 (Eotech, Francia). En cada caso se analizó un área de al menos 50x50 mm.

**3.7.1.4 Estudio de la matriz extracelular por ultrasonidos de alta frecuencia (HFUS)**

Se utilizó un sistema DUB 75 HFUS (TPM, Alemania) con una sonda abierta de 50 MHz para medir el espesor epidérmico y dérmico, así como la densidad ecogénica epidérmica y dérmica. Ambas variables se definen a continuación:

### **Grosor epidérmico / dérmico ( $\mu\text{m}$ )**

Es el promedio de las 300 distancias verticales que van desde el límite superior a inferior de la epidermis / dermis medido por la sonda durante su muestreo de 12 mm (Crisan et al., 2012; Kong et al., 2007).

### **Densidad Ecogénica epidérmica / dérmica (unidad arbitraria)**

Representa la cantidad de sonido de los ecos del tejido en función de su densidad y estructura (Milner et al., 2014). Las moléculas altamente estructuradas como el colágeno y HA y otros componentes de la matriz extracelular se encuentran entre las estructuras más ecogénicas presentes en la piel y, por lo tanto, un aumento de la densidad ecogénica está directamente relacionado con una mayor cantidad de matriz extracelular y, en consecuencia, una mayor cantidad de Colágeno y HA.

Se tomaron 40 muestras en cada mejilla durante las dos visitas a fin de tener un conjunto de datos representativos de cada mejilla. De la cantidad total de muestras presentes para cada mejilla y visita se seleccionaron a intervalos regulares y se analizaron con el software SkinScanner 5.0 (TPM, Alemania) para obtener los datos de espesor y densidad finales.

### **3.7.2 Estudio anticelulítico**

Se realizó un ensayo doble ciego aleatorizado, controlado con un grupo placebo en el que tanto las voluntarias como el investigador desconocieron la asignación a los grupos de tratamiento empleados.

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia anticelulítica *in vivo* en la reducción de los hoyuelos producidos por la celulitis. El ensayo fue doble ciego donde los sujetos fueron su propio control, utilizando dos candidatos diferentes. El tratamiento sujeto a estudio que contenía un 3% de GH y el tratamiento control, sin GH, conteniendo la misma cantidad de oligosacáridos de HA.

La evaluación se llevó a cabo detminando varios parámetros:

- **Peso de las voluntarias**
- **Circunferencia del muslo**
- **Fotografías de la piel**
- **Análisis 3D de los hoyuelos**
- **Análisis 3D de la textura**
- **Cuantificación de antioxidantes por autofluorescencia espectroscópica**
- **Evaluación de la epidermis y dermis mediante 50 MHz de alta frecuencia**
- **Biopsias de la piel**

El estudio duró 28 días a partir cd la primera aplicación de los productos. Se seleccionaron 24 sujetos para el estudio. Los sujetos seleccionados para este estudio fueron mujeres sanas, de 32 a 52 años de edad de acuerdo con los criterios de inclusión / no inclusión (ver anexo III). Todas las voluntarias aceptaron participar voluntariamente en el estudio, siendo previamente informadas y firmando el formulario de consentimiento.

### 3.7.2.1 Productos utilizados

Los productos utilizados en el ensayo fueron suministrados gratuitamente por Endor Nanotechnologies (Tabla 3.12).

Tabla 3.12 Detalle de los productos utilizados en el ensayo suministrados por Endor Nanotechnologies.

Referencia del producto	Forma	
	constituyente	Embalaje
<b>ENDOR Fórmula A</b>	Crema	Bote con etiqueta naranja
<b>ENDOR Fórmula B</b>	Crema	Bote con etiqueta azul

El bote con la etiqueta naranja contenía el GH como ingrediente activo mientras que el bote con la etiqueta azul contenía el HA.

#### 3.7.2.1.1 Aplicación del producto

La aplicación fue realizada por las voluntarias que se aplicaron los productos dos veces al día durante 28 días (mañana y tarde) en todo el muslo de acuerdo con un patrón aleatorio preestablecido. Las cantidades de aplicación se correspondieron a las condiciones normales de uso. Las voluntarias se tuvieron que lavar las manos entre la aplicación de cada producto.

### **3.7.2.2 Aleatorización de la aplicación de los productos**

Las selecciones de las áreas a tratar con cada uno de los productos se determinaron al azar para cada voluntaria. Un algoritmo diseñado para este propósito llevó a cabo esta aleatorización. Debido a un etiquetado erróneo, no hubo sujeto 11.

### **3.7.2.3 Medición del peso**

La medición del peso se realizó con una balanza digital BC-545 Inner Scanner (Tanita, Japan). El peso corporal no es constante debido a las fluctuaciones en base a la hora del día, la actividad física, la menstruación, etc. Los cambios alrededor de  $\pm 1000$  gramos no se consideraron ganancia de peso.

### **3.7.2.4 Medición de la circunferencia del muslo**

Cada voluntaria se colocó en el banco de medición Visio 4D (Eotech, Francia) que aseguraba la misma posición, ángulo y altura cada vez. Una línea láser verde horizontal señaló la región de interés. La circunferencia del muslo se midió con una cinta métrica colocada sobre la línea láser verde.

Pequeñas fluctuaciones del peso, así como pequeñas variaciones en medición con la cinta métrica podían influir en el resultado. Variaciones de  $\pm 0,5$  cm no se consideraron como un cambio de circunferencia real.

### **3.7.2.5 Fotografía Clínica**

Se tomaron fotografías de alta resolución de la parte inferior posterior del cuerpo a 0°, 180°, 90° y  $\pm 45^\circ$ , en condiciones de iluminación reproducibles, con luz difusa para producir sombras que permitieran evaluar la apariencia de la piel.

Las fotografías se tomaron con una cámara Nikon D300 (Nikon Corp., Japan) usando una lente Nikkor Pro 60mm (Nikon Corp., Japan). La iluminación se consiguió a través de dos linternas Elinchrom estilo 600 RX (Elinca SA, Suiza). El trípode de la cámara y los flashes estuvieron en una posición fija durante todo el estudio. Para que las fotografías fueran altamente reproducibles y consistentes a través del estudio, se estableció una alfombrilla de posicionamiento fijo en el suelo para las voluntarias. Las voluntarias, vestidas con prendas de vestir clínicas desechables, su propia ropa interior y una camiseta blanca, estuvieron de pie con los brazos cruzados sobre una alfombra donde se indicaron los diferentes ángulos de estudio. Se mantuvo un período de aclimatación de 15 minutos en la habitación con cada sujeto antes de la adquisición de las fotografías. La evaluación se realizó en una sala con paredes grises, bajo temperatura controlada y humedad relativa (temperatura  $23,8^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , higrometría:  $43\% \pm 10\%$ ).

### **3.7.2.6 Cuantificación de antioxidantes por autofluorescencia espectroscópica**

Este estudio se realizó en los dos muslos de las coluntarias, que se situaron de pie en el banco de adquisición Visio 4D para que tanto las medidas como la ubicación en los diferentes puntos de la cinética fueran reproducibles.

La cuantificación de los antioxidantes se evaluó con la ayuda de un dispositivo específico llamado Biozoom. El Biozoom mide los carotenoides presentes en la piel mediante técnicas de fluorescencia (autofluorescencia de la piel). Contiene múltiples

fuentes de luz que iluminan la piel. Esas luces excitan los  $\beta$ -carotenos en el tejido, que hacen que emitan luz a una longitud de onda diferente. La banda de longitud de onda utilizada para la emisión es de 440-480 nm y la banda de longitud de onda de la muestra obtenida por fluorescencia fue de 390-970 nm.

De cada sitio analizado se obtuvo una medición con la autofluorescencia de los carotenoides. El dispositivo se conectó a un PC a través de un cable USB. Los datos del dispositivo se transfirieron a los servidores de Biozoom donde se procesaron y luego se devolvieron como un índice de autofluorescencia de carotenoides mostrado en la pantalla. La autofluorescencia de los carotenoides se dio en una escala arbitraria de 0 a 10.

### **3.7.2.7 Evaluación de la epidermis y dermis mediante HFUS de 50 MHz.**

Para realizar este estudio, las voluntarias se tumbaron boca abajo en una camilla y se realizaron las mediciones en ambos muslos. La localización se determinó mediante una marca realizada durante las mediciones de la circunferencia. Los ultrasonidos de alta frecuencia (HFUS) se realizaron con un sistema DUB 75 HFUS (TPM, Germany). Se utilizó una sonda abierta de 50 MHz con una penetración de 4 mm y una resolución de 31  $\mu\text{m}$  para permitir una medida fiable del espesor epidérmico y dérmico, así como la densidad ecogénica epidérmica y dérmica.

Se registraron doce capturas por cada punto de piel de 12mm escaneado. Se seleccionaron 3 capturas con una relación de señal óptima y se calculó el promedio. El software analizó la longitud de los picos de señal a través del A-Scan y estableció el grosor de la piel, que se expresó en  $\mu\text{m}$  y se subdividió en dos parámetros: espesor epidérmico y espesor dérmico. El software proporcionó la densidad ecogénica media de la epidermis y la dermis (en unidades arbitrarias) de los 12 mm de piel escaneada en cada captura. El aumento en la densidad ecogénica caracterizó un efecto de aumento de la matriz extracelular en la zona. Por tanto, un aumento en la densidad ecogénica muestra



una mejora de la matriz extracelular relacionada con un aumento de colágeno y ácido hialurónico.

### **3.7.2.8 Análisis 3D de los hoyuelos y de la textura**

La técnica FOITS (Fast Optical *In vivo* topometría de la piel humana) permitió objetivar las modificaciones de la topografía cutánea. Las mediciones se realizaron con un sistema óptico dedicado a la metrología del relieve de la superficie cutánea. Este sistema incluyó un sensor de medición que asoció un proyector y una cámara CCD de alta resolución (sistema de Dermatop (Breuckmann, Alemania - EoTech, Francia), campo de visión: 50 x 60 mm) – vinculados a un software de adquisición Optocat (EoTech, Francia). Las resoluciones axial y lateral promedio fueron de 10  $\mu\text{m}$ .

La evaluación se realizó en un cuarto oscuro. Las voluntarias se vistieron con prendas de vestir desechables clínicas, ropa interior y una camiseta blanca, manteniendo los brazos apoyados en la pared frontal y mirando hacia adelante. El posicionamiento del sensor y de los sujetos se facilitó con el uso de un banco de medición (Visio4D) que permitió mantener el cuerpo en la misma posición y un posicionamiento reproducible del sensor. Para ello, cada voluntaria colocó sus pies sobre dos marcas en forma de pie en una plataforma circular. Esta plataforma se elevó entonces hasta que una línea de láser horizontal de posición fija alcanzó la región de interés. La altura de elevación se anotó en el CRF con el fin de colocar a cada sujeto en la misma posición en la siguiente visita. Una estructura cuadrada que giraba alrededor de la plataforma sostenía el sistema óptico. Una regla permitió colocar a cada voluntaria exactamente a la misma altura y en el mismo ángulo cada vez. La altura fue de 36 cm y los ángulos fueron  $\pm 30^\circ$ . Se seleccionó la celulitis del muslo justo debajo de las nalgas como área de estudio. Se tomó una adquisición del área. La visualización en pantalla de la medición inicial (T0), aseguró un buen reposicionamiento del área estudiada.

El análisis de la topografía cutánea de la superficie consistió en calcular la forma y el tamaño de los "objetos" (en este caso las grandes depresiones de la piel conocidas como hoyuelos) para obtener su volumen, área, circunferencia, profundidad máxima y profundidad mínima. También implicó el cálculo de parámetros de rugosidad típicos utilizados en metrología.

En la piel con celulitis, los parámetros de rugosidad no sólo se correlacionaron con la calidad intrínseca de la piel, sino también con los nódulos asociados con la textura de la piel de naranja que caracteriza a la celulitis. Concretamente, rugosidad media (SA), rugosidad con respecto a la variación cuadrática de la media (SQ) y amplitud máxima del relieve (Stm). Todos estos parámetros se extrajeron de una superficie de 50 x 60 mm (30 cm<sup>2</sup>).

**SA:** Rugosidad media (mm): Promedio de las variaciones de la amplitud del relieve integrado en la superficie estudiada.

**SQ:** Rugosidad con respecto a la variación cuadrática media (mm): Media de la raíz cuadrada de las variaciones de amplitud del relieve integrado en la superficie estudiada. La interpretación de SQ es la misma que SA. Este parámetro es menos sensible a los artefactos.

**Stm:** amplitud máxima del relieve (mm): El área de 50 x 60 mm se subdividió en 25 áreas. En cada uno se midió la amplitud entre el pico más alto y el valle más bajo. Estas 25 amplitudes se sumaron y promediaron con el fin de obtener el valor de Stm.

Se obtuvo un valor numérico de cada una de las variables de cada voluntaria, muslo y tiempo. Los resultados se recogieron en tablas distintas para la Fórmula A y para la Fórmula B. Se calcularon los promedios y las desviaciones estándar. Las áreas con hoyuelos se detectaron después del uso de varios filtros y una corrección polinómica para eliminar la forma local y aplacar la Región de Interés (ROI).

Una disminución en cualquiera de las variables de rugosidad caracteriza un efecto antienvjecimiento. Una disminución en cualquiera de los volúmenes, profundidad máxima y profundidad media caracteriza un efecto de firmeza del producto. Una disminución en el área y la circunferencia caracteriza un efecto tensor del producto.

### **3.7.2.9 Biopsias de piel**

Se realizaron biopsias de piel de las voluntarias con la finalidad de estudiar la restructuración dérmica de la matriz extracelular y cuantificar el HA y colágeno de las zonas tratadas con la formulación que contenía un 3% de GH en comparación con las zonas tratadas con la formulación placebo. Se utilizó un bisturí circular «punch» de 4 milímetros de diámetro específico para biopsias diagnósticas de zonas cosméticamente delicadas (Elenitsas & Halpern, 1997). La punción se realizó tras la inyección de un anestésico local y se obtuvo un fragmento de piel cilíndrico. Se produjo una herida quirúrgica de pequeño diámetro que se cerró por segunda intención. Se tomó una muestra al inicio del estudio que se utilizó como nivel basal de HA y colágeno que se comparó con una segunda muestra adquirida al final del estudio de la zona tratada con la formulación que contenía el 3% de GH y de la zona tratada con el placebo.

Las muestras de piel se fijaron en una solución de formalina al 10% durante 24 horas, se incluyeron en bloques de parafina y se procedió a su tinción. Posteriormente se cortaron en secciones de 8  $\mu\text{m}$  y se incluyeron en portaobjetos recubiertos con gelatina (Highet & Champion, 1980). Cada muestra obtenida se dividió en dos partes, una para teñir el HA y otra para teñir el colágeno. La valoración del HA se hizo mediante la tinción con azul alcían y las fibras colágenas se visualizaron mediante la tinción tricrómica Masson.

Se fotografiaron las muestras en un fotomicroscopio Leica Eclipse-55i equipado con una cámara digital Leica DC200, con el objetivo 40X y adquiridas con el software ImagePro Plus. En cada muestra se fotografió la misma sección dérmica. Estas imágenes se procesaron con el software ImageJ. Se cuantificó el marcaje de HA y colágeno, el resultado se expresó como porcentaje respecto la muestra tomada al inicio del estudio como referente del nivel basal de HA y colágeno.

### **3.8 Parte 5: formulación final, especificaciones y registro europeo**

Una vez completados con éxito los estudios de síntesis y caracterización química del ingrediente activo GH, la finalización de los estudios de viabilidad celular y seguridad *in vitro*, de la realización los estudios de seguridad en voluntarios y completada la eficacia en voluntarios, Endor Nanotechnologies lanzó al mercado *Y.en Effect* <https://www.yen-effect.com/index.html>

En las siguientes tablas se muestran las especificaciones del GH (Tabla 3.13), la formulación final del sérum antiedad *Y.en Effect* (Tabla 3.14), la formulación final de la crema antiedad *Y.en Effect* (Tabla 3.15) lanzada al mercado por Endor Nanotechnologies, así como la ficha de registro europeo del sérum (Figura 3.16) y la ficha de registro europeo de la crema (Tabla 3.17).

Tabla 3.13 Especificaciones del ingrediente activo GH.

<b>Criterios del GH</b>	<b>Especificación</b>
Apariencia	Líquido
Color	Rojo burdeos
Tamaño de la Nanopartícula (por TEM)	12 nm +/- 3 nm
Tamaño del GH (por DLS)	20 nm +/- 5 nm
Condición de las Nanopartículas en solución	No-agregadas
Pico de absorción (por UV-Visible)	522 +/- 2 nm
Contenido de en ppm (por ICP-MS)	28ppm+/-3ppm
Ph a temperatura ambiente	5 – 8

Tabla 3.14 Formulación final del sérum antiedad *Y.en Effect* <https://www.yen-effect.com/index.html>


<b>COMPOSICIÓN SÉRUM ANTIEDAD</b>	
<b>INGREDIENTES</b>	
AGUA	
GLYCERINE	
TRITICUM VULGARE GERM EXTRACT	
GOLD THIOETHYLAMINO HYALURONIC ACID (GH)	
METHYLSILANOL HYDROXYPROLINE ASPARTATE	
GLYCERIN, GLYCERYL POLYCARYLATE	
PEG-40 HYDROGENATED CASTOR OIL	
PECTIN, HYDROLYZED VEGETABLE PROTEIN, SERINE, ARGININE, PROLINE, XANTAN GUM	
TOCOPHERYL ACETATE	
GLYCINE SOJA PROTEIN	
TRIETHANOLAMINE	
PROPYLENE GLYCOL, PHENOXYETHANOL, ETHYLHEXYLGLYCERIN	
PARFUM	
LIMONENE	
HEXYL CINNAMAL	
BUTYLPHENYL METHYLPROPIONAL	
LINALOOL	
ALPHA-ISOMETHYLIONONE	
CITRONELLOL	

Tabla 3.15 Formulación final de la crema antiedad *Y.en Effect* <https://www.yen-effect.com/index.html>


<b>COMPOSICIÓN CREMA ANTIEDAD</b>	
<b>INGREDIENTES</b>	
AGUA	
PROPYLENE GLYCOL	
CAPRYLIC/CAPRIC TRIGLYCERIDE	
GOLD THIOETHYLAMINO HYALURONIC ACID (GH)	
ISONONYL ISONONANOATE	
ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE	
BENZOPHENONE 3	
PECTIN, HYDROLYZED VEGETABLE PROTEIN, SERINE, ARGININE, PROLINE, XANTAN GUM	
SODIUM POLYACRYLATE, ETHYLHEXYL STEARATE, TRIDECETH-6	
GLYCINE SOJA PROTEIN	
BISABOLOL	
PHENOXYETHANOL, ETHYLHEXYLGLYCERIN	
PARFUM	
LIMONENE	
HEXYL CINNAMAL	
BUTYLPHENYL METHYLPROPIONAL	
LINALOOL	
ALPHA-ISOMETHYLIONONE	
CITRONELLOL	

Tabla 3.16 Ficha de registro a la unión europea de la crema antiedad *Y.en Effect*.

Ficha de registro general a la unión europea del sérum antiedad		
<b>CPNP Reference:</b> 1005290		
<b>Industry Reference:</b> N/A		
<b>Version:</b> 1		
<b>Last modification date:</b> 14/06/2012 16:21:23		
Product Name	Shades (if applicable)	Language
Y-En Effect Serum	N.A.	Multilingual
<b>Product specifically intended for children under 3 years of age:</b> No		
<b>Responsible person:</b> Endor Nanotechnologies		
<b>Responsible person address:</b> Baldiri Reixac 12 08028 Barcelona Spain		
<b>Phone:</b> 0034 934020468		
<b>Product ready to go on the market or product already on the market</b> Yes		
<b>Product imported in the Community:</b> No		
<b>Member State of first placing on the market:</b> Spain		



Tabla 3.17 Ficha de registro a la unión europea de la crema antiedad *Y.en Effect*.

Ficha de registro general a la unión europea de la crema antiedad		
<b>CPNP Reference:</b> 1010419		
<b>Industry Reference:</b> N/A		
<b>Version:</b> 1		
<b>Last modification date:</b> 14/06/2012 16:20:09		
Product Name	Shades (if applicable)	Language
Y-En Effect Cream	N.A.	Multilingual
<b>Product specifically intended for children under 3 years of age:</b> No		
<b>Responsible person:</b> Endor Nanotechnologies		
<b>Responsible person address:</b> Baldiri Reixac 12 08028 Barcelona Spain		
<b>Phone:</b> 0034 934020468		
<b>Product ready to go on the market or product already on the market</b> Yes		
<b>Product imported in the Community:</b> No		
<b>Member State of first placing on the market:</b> Spain		

### 3.9 Parte 6: análisis estadístico

Los análisis estadísticos de los estudios *in vitro* se realizaron utilizando los programas GraphPad Prism y Statgraphics. Los resultados se expresan como media y desviación estándar. Se utilizó un análisis One-way ANOVA seguido del test de Dunnett o la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p \leq 0,05$ .

Los métodos estadísticos utilizados para procesar los datos de los ensayos con voluntarias fueron la prueba Smirnov-Kolgorov para una distribución normal (ND), la prueba t de Student para muestras pareadas y, en algunos casos, como la normalidad no pudo ser probada, se utilizó la prueba Wilcoxon para una distribución con muestras pareadas. Se consideró significancia estadística en aquellas pruebas cuando  $p < 0,05$ . En muy pocos casos se consideró que un  $p < 0,1$  era significativo para evaluar algunas tendencias aparentes de los datos.



# RESULTADOS

---



## 4. RESULTADOS

La sección de resultados de esta tesis se divide en seis partes principales:

**Parte 1:** Caracterización química de las AuNPs y el GH, así como de los ensayos de calidad y estabilidad.

**Parte 2:** Estudios de viabilidad celular *in vitro*.

**Parte 3:** Estudios de seguridad *in vitro*.

**Parte 4:** Estudios de eficacia *in vitro*.

**Parte 5:** Estudio de seguridad en voluntarios.

**Parte 6:** Estudios de eficacia en voluntarios.

## 4.1 Caracterización fisicoquímica de las AuNPs y del GH

### 4.1.1 Microscopía electrónica de transmisión

La caracterización de las AuNPs utilizadas en la fabricación del GH por TEM se hizo con la finalidad de analizar su tamaño-rango y dispersidad. El HA al ser una molécula orgánica no puede observarse directamente por TEM, aunque se apreció una sombra alrededor de las AuNPs. La distribución de tamaños de las AuNPs fue determinada por GraphPad Prism. Las AuNPs no conjugadas tuvieron un tamaño de  $11,93 \pm 2,87$  nm y el diámetro medio de las AuNPs del GH fue  $12,03 \pm 2,98$  (Figura 4.1).

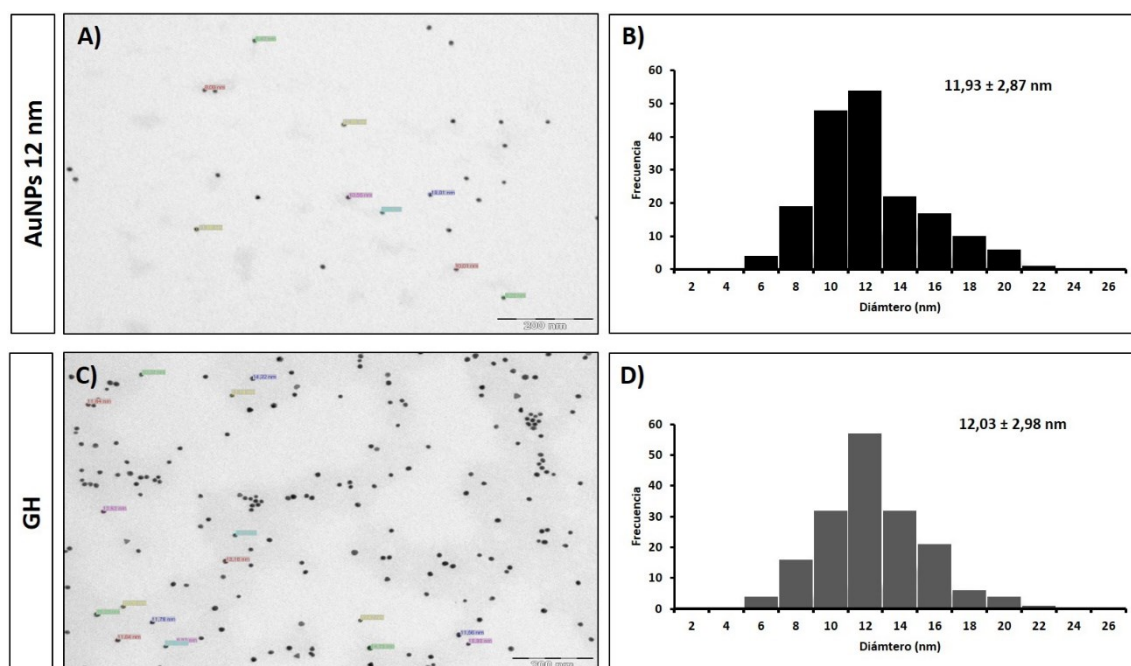


Figure 4.1 A) Imagen obtenida por TEM de las AuNPs de 12 nm en dispersión. B) Histograma correspondiente a la distribución por tamaños de las AuNPs analizadas por GraphPad Prism. C) Imagen obtenida por TEM de las AuNPs después de sintetizar el GH. D) Histograma correspondiente a la distribución por tamaños de la AuNPs, después de sintetizar el GH, analizadas por GraphPad Prism.

### 4.1.2 Dispersión de luz dinámica

La distribución de tamaños de las AuNPs y del GH fue confirmada por DLS además del TEM. El tamaño promedio de las AuNPs fue de  $11,87 \pm 2,3$  nm; en cambio, el tamaño del GH tuvo una media de  $20,00 \pm 5$  nm de diámetro (Figura 4.2).

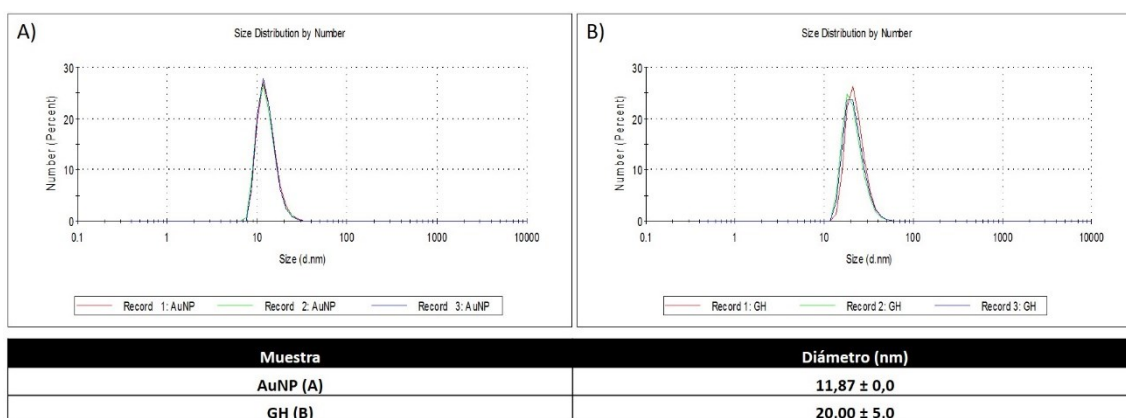


Figura 4.2. A) Caracterización obtenida por DLS de las AuNPs de 12 nm en dispersión con un tamaño promedio de  $11,87 \pm 0$  nm. B) Caracterización obtenida por DLS del GH con un tamaño promedio de  $20,00 \pm 5$  nm. Las muestras fueron analizadas por Malvern Nano ZSizer de la serie *nano ZS* (Malvern Instrument, UK).

### 4.1.3 Potencial Z

Al estudiar el Potencial Z de las AuNPs dispersas en solución y del GH, se compararon sus cargas superficiales. La carga superficial de las AuNPs fue de  $-37,30 \pm 1,3$  mV y se mantuvo sin cambios cuando las AuNPs se conjugaron al HA para formar el GH, con una carga superficial de  $-37,10 \pm 1,8$  mV (Figura 4.3).



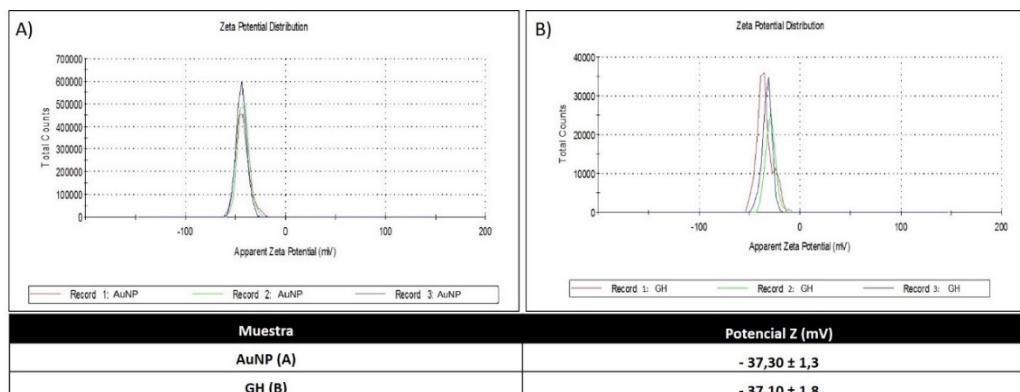


Figura 4.3 A) Caracterización obtenida por DLS de las AuNPs de 12 nm en dispersión con una carga superficial de  $-37,30 \pm 1,3$  mV. B) Caracterización obtenida por DLS del GH con una carga superficial de  $-37,10 \pm 1,8$  mV. Las muestras fueron analizadas por Malvern Nano ZSizer de la serie *nano ZS* (Malvern Instrument, UK).

#### 4.1.4 Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo

El ICP-MS se utilizó para cuantificar la cantidad de oro en solución y por lo tanto el número de nanopartículas de oro. Se determinó la concentración de oro en solución de la síntesis de AuNPs 3X (100 ppm), la concentración de oro del GH 1X (33 ppm) y la concentración de las AuNPs-PEG 1X (33ppm) (Tabla 20).

Tabla 4.1 Comparación de las concentraciones teóricas y obtenidas por ICP-MS de las AuNPs (Stock 3X), del GH (1X) y de las AuNPs-PEG (1X).

Muestra	Concentración teórica	Concentración por ICP-MS
AuNPs 3X	100 ppm (0,1 mg/ml)	$96,83 \pm 2,19$ ppm
GH	33 ppm (0,033 mg/ml)	$28,01 \pm 3,14$ ppm
AuNPs-PEG	33 ppm (0.033 mg/ml)	$29,23 \pm 0,91$ ppm

#### 4.1.5 Análisis elemental orgánico del GH

Se estudió la cantidad de moléculas de HA por AuNPs del GH a 100 ppm (3X, para facilitar un análisis cuantitativo más preciso), para demostrar que el núcleo de la nanopartícula es capaz de unir un elevado número de moléculas HA (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2 Análisis elemental orgánico de dos lotes diferentes de GH (GH.01 y GH.02). Detalle de los valores obtenidos en porcentaje de N, C y S, así como de los microgramos totales de HA, el número de total moléculas de HA, el número total de AuNPs de cada lote de GH y finalmente, el número de moléculas de HA por AuNP.**

	<b>GH.01</b>	<b>GH.02</b>
<b>Volumen (ml)</b>	2,00	2,00
<b>%N</b>	2,31	2,31
<b>%C</b>	26,22	26,28
<b>%S</b>	0,18	0,22
<b>µg HA</b>	3745,09	3802,29
<b>Nº Molec. HA</b>	1,96E+17	1,99E+17
<b>Nº AuNPs</b>	1,23E+14	1,23E+14
<b>Molec. HA/AuNP</b>	1,59E+03	1,62E+03

#### 4.1.6 Calidad y estabilidad

Se estudió la estabilidad de las AuNPs y del GH en solución salina para demostrar que el recubrimiento con HA protege a las AuNPs de la agregación y las hace más biocompatibles en medios fisiológicos.

##### 4.1.6.1 UV-VIS

Las AuNPs y el GH fueron comparados por UV-VIS en solución acuosa. Las AuNPs mostraron el típico pico de absorbancia a 520 nm, y el GH mostró un ligero desplazamiento hacia la derecha, con un pico a 524 nm (Figura 4.4).

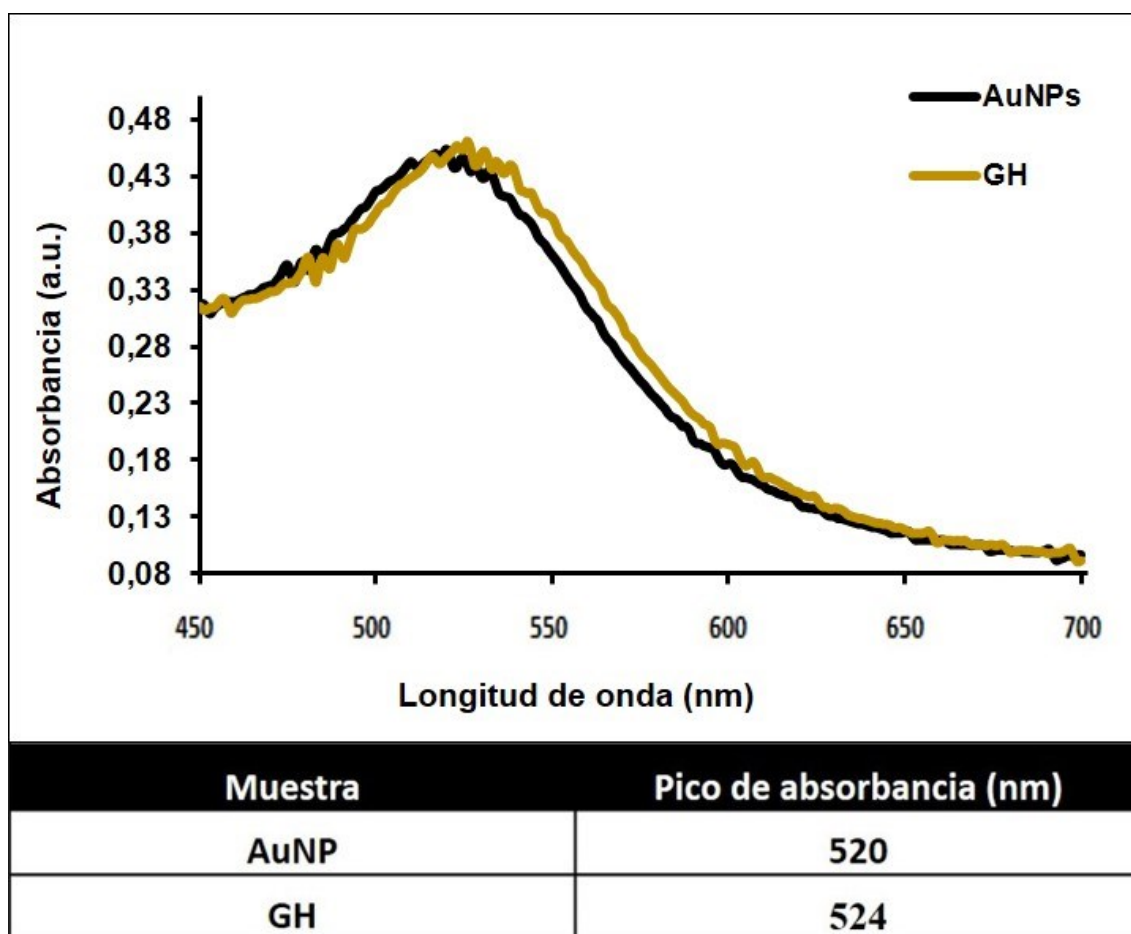


Figura 4.4 Espectro UV-VIS de las AuNPs (pico máximo de absorción de 520 nm) y del GH (pico máximo de absorción de 524 nm) en solución acuosa.

Cuando se estudió el espectro UV-VIS de las AuNPs y del GH en medio salino (PBS), el pico de absorción de las AuNPs agregadas se ensanchó y se desplazó hacia la derecha con un pico de 542 nm mientras que el pico de absorción del GH permaneció sin cambios a 524 nm (Figura 4.5).

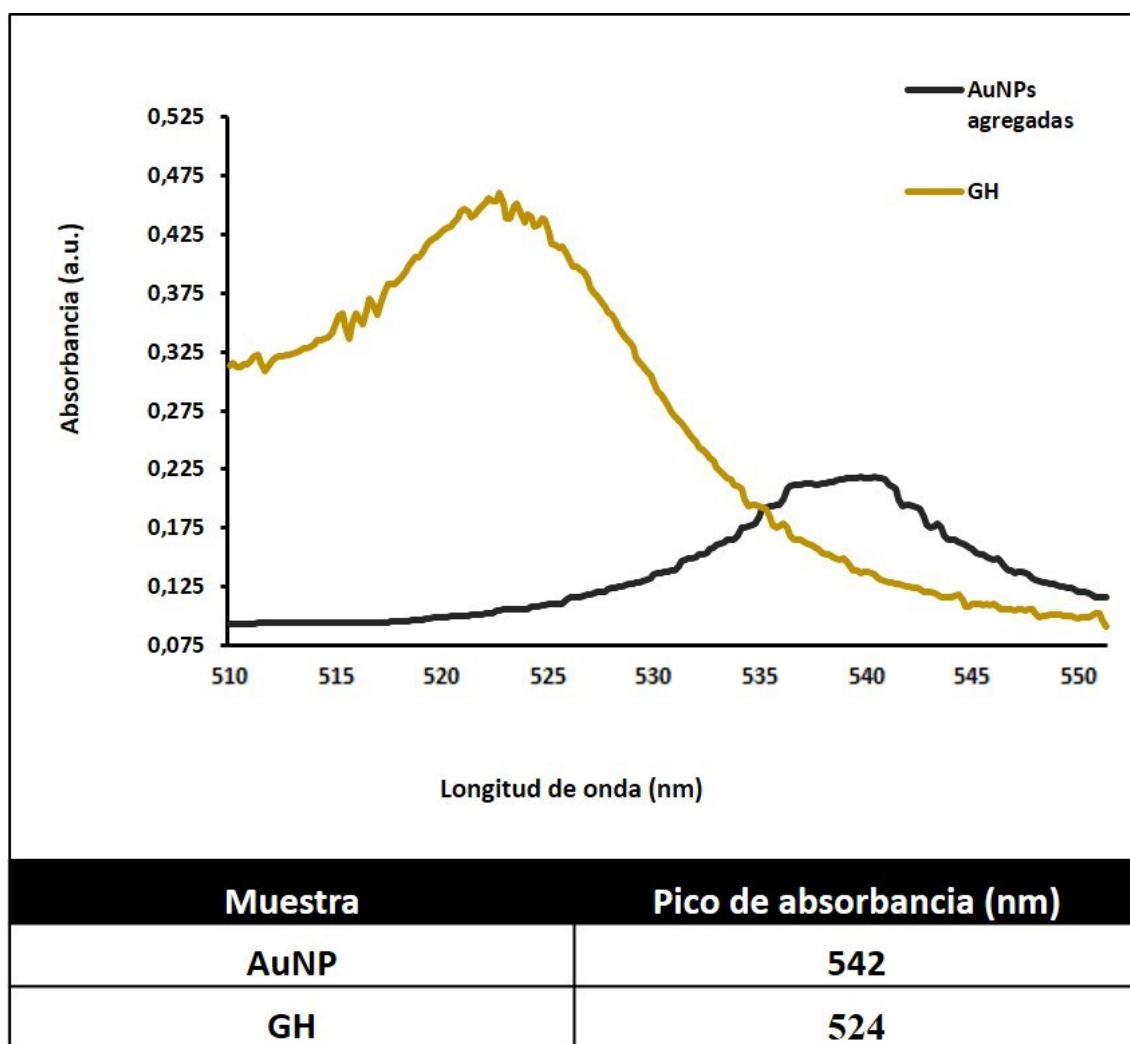
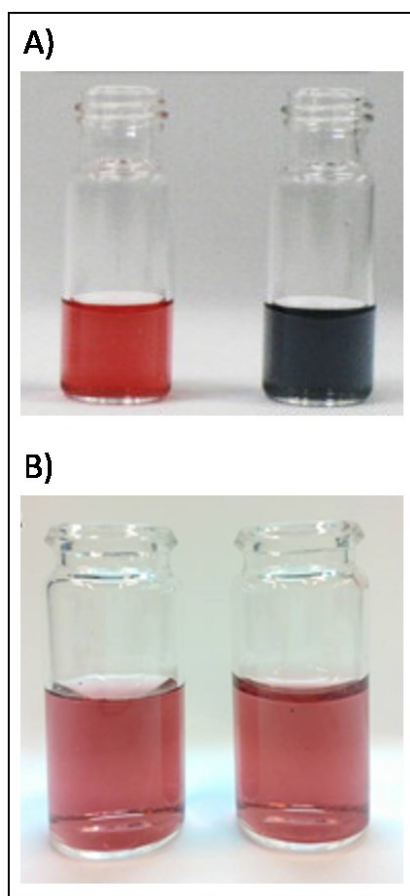


Figura 4.5 Espectro UV-VIS de las AuNPs agregadas (pico máximo de absorbancia de 542 nm) y del GH (pico máximo de absorbancia de 524 nm) en solución salina (PBS).

#### 4.1.6.2 Examen visual

Las AuNPs y el GH se diluyeron en H<sub>2</sub>O y PBS, y se estudiaron visualmente los cambios producidos por la agregación. Las AuNPs agregaron en la solución salina y se detectó por el cambio de color de rojo burdeos a azul, mientras que el GH se mantuvo en estado disperso y no se observó cambio de color (Figura 4.6).



**Figura 4.6 A) AuNPs en solución acuosa de color rojo burdeos (izquierda) y AuNPs en solución salina de color azul oscuro (derecha). B) GH en solución acuosa de color rojo burdeos (izquierda) y GH en solución salina de color rojo burdeos (derecha).**

## **4.2 Estudios de viabilidad celular**

Además de estimular una respuesta endógena a nivel celular, el GH ha de ser seguro y no puede tener efectos tóxicos por sí mismo. Además de la caracterización química del GH, se realizaron experimentos de toxicidad, genotoxicidad y mutagénesis para determinar el perfil toxicológico *in vitro*, como futuro ingrediente activo.

### **4.2.1 Ensayo de toxicidad *in vitro***

El objetivo del ensayo de citotoxicidad fue comprobar si el GH era tóxico a nivel celular. Tanto los HDF como los HaCat fueron tratados con medio de cultivo celular que contenía siete concentraciones de GH (1%, 3%, 10%, 25%, 50%, 75% y 100%). El GH fue previamente liofilizado y resuspendido en medio de cultivo completo a la concentración 1X. En ninguna de las concentraciones testadas se obtuvieron valores significativos de mortalidad (Figura 4.7).

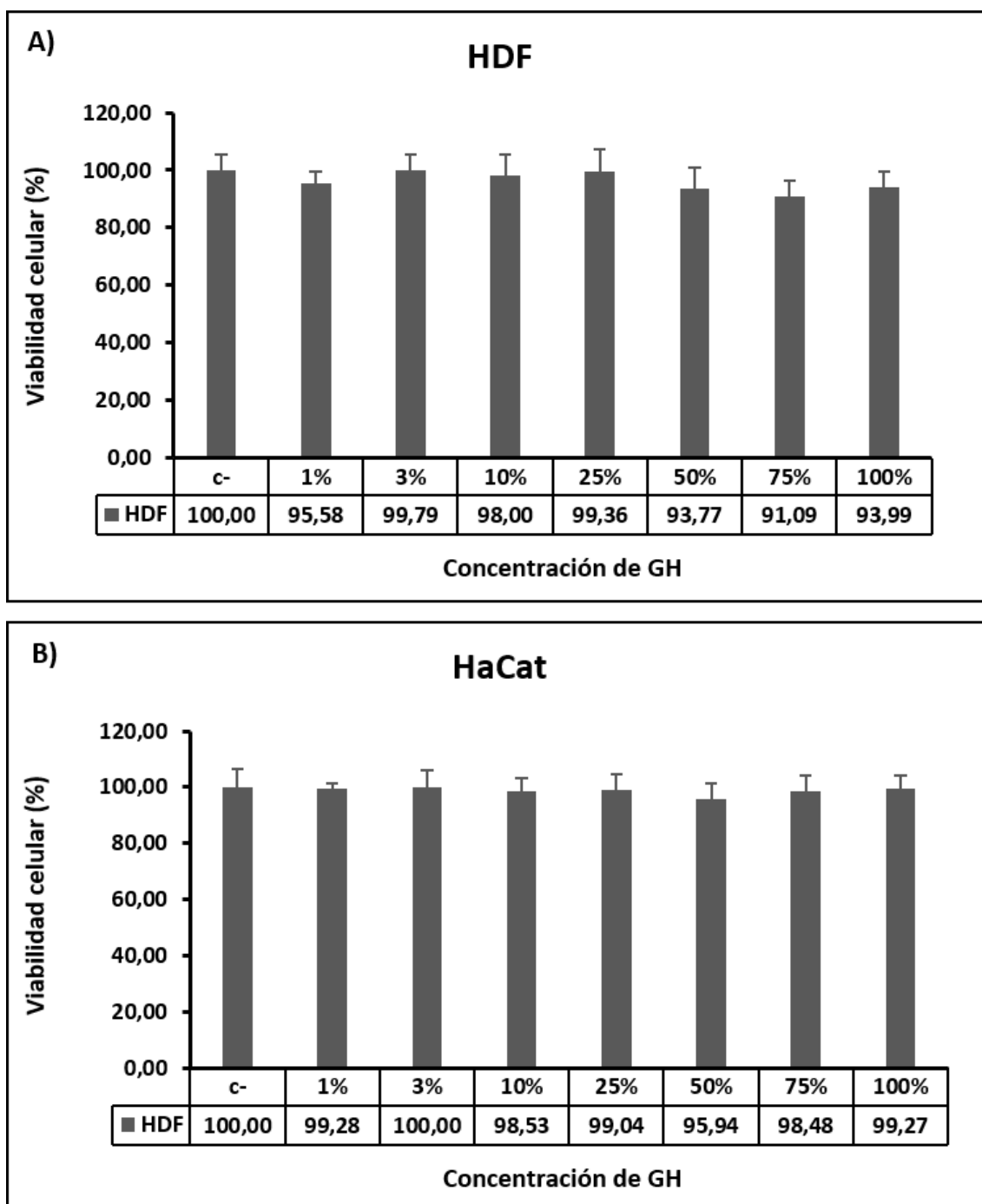


Figura 4.7 A) Porcentajes de viabilidad celular obtenida en HDF en comparación con un control negativo sin tratamiento (C-) después de haber sido tratados con medio completo al 1% (0,33 ppm), 3% (1 ppm), 10% (3 ppm), 25% (8 ppm), 50% (17 ppm), 75% (25 ppm) y 100% (33 ppm) de GH. B) Porcentajes de viabilidad celular obtenida en HaCat en comparación con un control negativo sin tratamiento (C-) después de haber sido tratados con medio completo al 1% (0,33 ppm), 3% (1 ppm), 10% (3 ppm), 25% (8 ppm), 50% (17 ppm), 75% (25 ppm) y 100% (33 ppm) de GH.

#### 4.2.2 Ensayo de mutagénesis Ames

Se estudiaron las posibles propiedades mutagénicas del GH mediante el ensayo de mutagenicidad de Ames. Para realizar este ensayo, tres cepas de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100 y TA1535) y una cepa de *Escherichia coli* (WP2 uvrA) se sometieron al tratamiento con GH. Posteriormente se evaluó la velocidad de mutación inversa causada por el tratamiento. Las características de las diferentes cepas se verificaron por análisis genético. El GH no mostró mutagenicidad en ninguna de las cuatro cepas bacterianas testadas a ninguna de las concentraciones en comparación con el control negativo (frecuencia de mutación espontánea detallada en la tabla 4.3), (Figura 4.8). Se usó como control negativo de este ensayo las AuNPs-PEG ya que las AuNPs solas hubiesen agregado en el medio.

Tabla 4.3. Frecuencia espontánea de mutación de las cepas bacterianas utilizadas (media (SD)).

Cepa bacteriana	Frecuencia espontánea de mutación
<i>S. typhimurium</i> TA98	13,5 ± 5,5
<i>S. typhimurium</i> TA100	190,7 ± 34,7
<i>S. typhimurium</i> TA1535	21,5 ± 6,4
<i>E. coli</i> WP2uvrA (pKM101)	16,3 ± 3,2



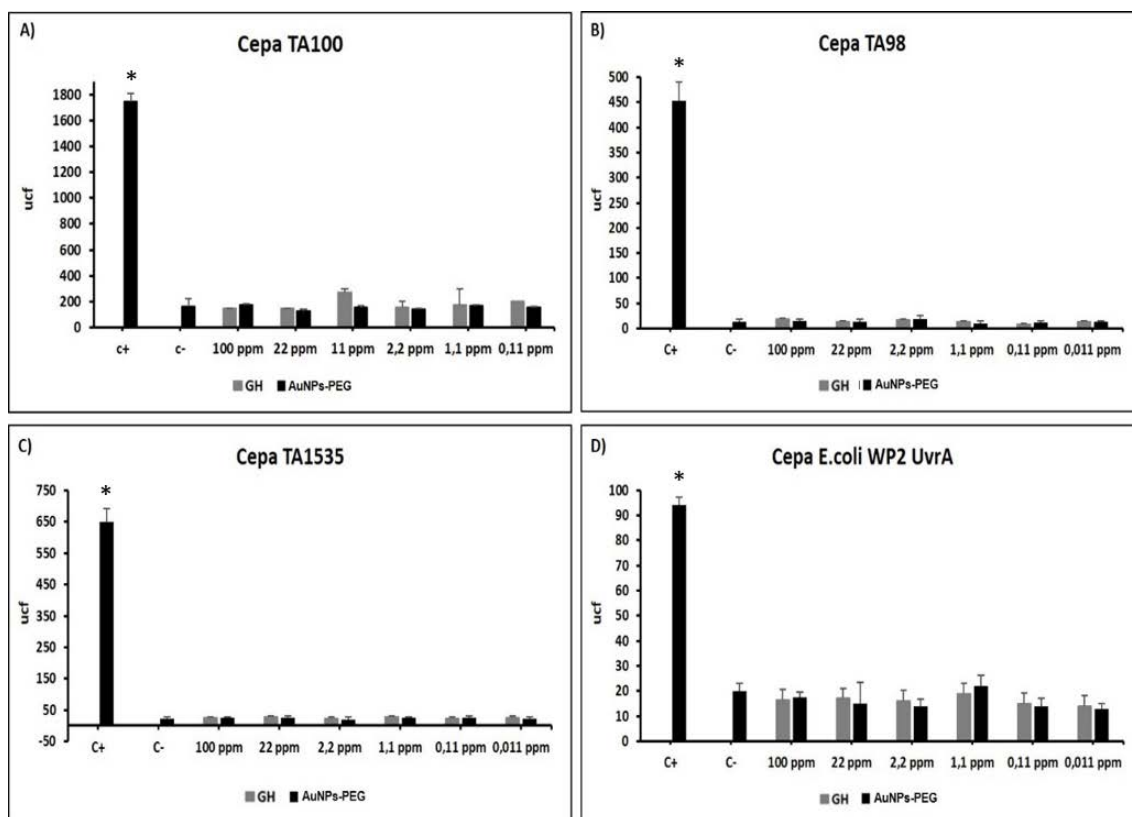
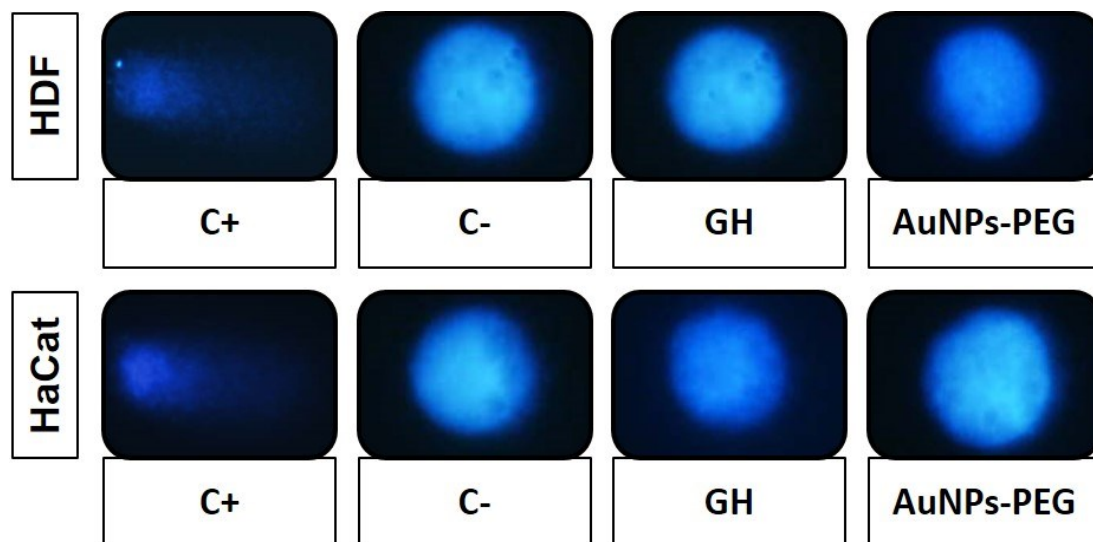


Figura 4.8 Ensayo de mutagénesis Ames realizados en *S. Typhimurium* TA100, TA98, TA1535 y *E. Coli* WP2 UvrA (media (SD)).

### 4.2.3 Ensayo de genotoxicidad del cometa

El ensayo del cometa se realizó tanto en HDF como HaCat y se utilizaron dos controles internos del ensayo; como control negativo se usó medio de cultivo completo y como control positivo se utilizó una solución a 100 mM de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ). También se usaron AuNPs-PEG como control de nanopartículas. No hubo evidencias de daño en el ADN después de tratar las células con el GH a la máxima concentración (Figura 4.9).

A)



B)

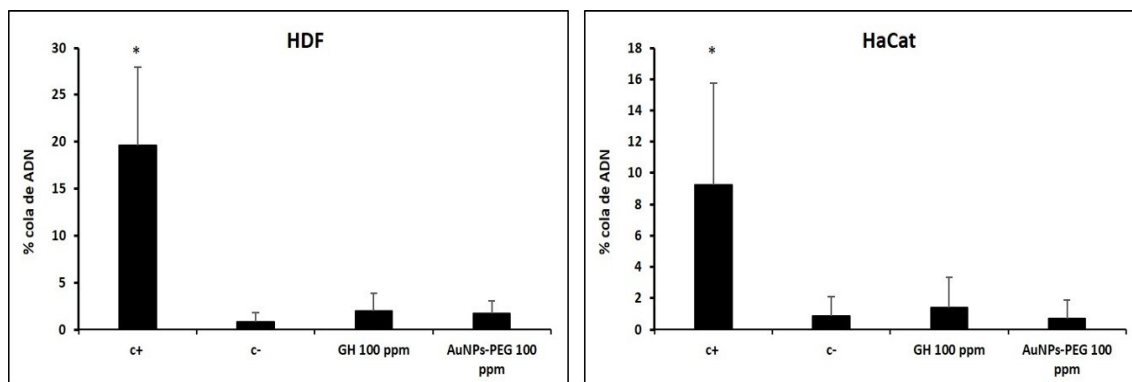


Figure 4.9 A) Imágenes representativas del núcleo celular de cada grupo de tratamiento sujeto al ensayo del cometa, en HDF y HaCat. B) Porcentaje medio de la cola de ADN después de analizar 50 células HDF y HaCat de cada grupo de tratamiento, con el *Comet Assay Software Project* (media (SD)). Análisis estadístico por Kruskal-Wallis (\*  $p < 0,05$ ).

### 4.3 Estudios de seguridad *ex vivo*

Se realizó la evaluación *ex vivo* de la seguridad del GH. El primero de los dos aspectos evaluados fue estudiar la capacidad de penetración del GH en la piel a través de un ensayo de absorción transdérmica. El segundo de los aspectos que se estudió fue el potencial irritante del compuesto.

#### 4.3.1 Absorción transdérmica

Tras exponer la piel en la membrana de difusión al GH durante 24 horas, se determinó su distribución en los diferentes estratos (estrato córneo, epidermis y dermis). También se evaluó el exceso de oro en la superficie de la piel y el contenido de GH en el líquido receptor de las 6 celdas utilizadas.

Los resultados medios obtenidos en la distribución cutánea de la solución de GH durante el proceso de absorción percutánea se indican en la Tabla 4.4 expresada en ng/cm<sup>2</sup> y en % de oro respecto la dosis total aplicada.

Tabla 4.4 Distribución en la piel del oro contenido en una solución de GH tras 24 horas de exposición (media (SD)).

Compartimento	Contenido de oro (ng/cm <sup>2</sup> )	% de oro respecto la dosis aplicada
Superficie de la piel	111.28 ± 4.97	87.69 ± 3.92
Estrato córneo	2.30 ± 0.72	1.81 ± 0.57
Epidermis	0.32 ± 0.25	0.25 ± 0.20
Dermis	0.11 ± 0.11	0.09 ± 0.08
Líquido receptor	n.d.	n.d.
Cantidad recuperada	114.01 ± 3.91	89.84 ± 3.08
Aplicación total	126.91	100

También se calculó la cantidad total de oro absorbido percutáneamente (epidermis, dermis y fluido receptor) y expresado en ng/cm<sup>2</sup> y en % de oro respecto la dosis total aplicada (Tabla 4.5).

Tabla 4.5 Contenido de oro de la solución de GH absorbido percutáneamente tras 24 horas de exposición (media (SD)).

Muestra analizada	Contenido de oro (ng/cm <sup>2</sup> )	% de oro respecto la dosis aplicada
GH (33 ppm)	0.43 ± 0.27	0.34 ± 0.21

### 4.3.2 Test de irritación HET-CAM

El test de irritación HET-CAM se realizó con la finalidad de evaluar el potencial irritante del GH. Se evaluó la hiperemia, hemorragia y coagulación en cuatro huevos embrionados de gallina. Los resultados de las puntuaciones obtenidas en función del tiempo se muestran a continuación (Tabla 4.6).

Tabla 4.6 Resultados de la cuantificación de los parámetros evaluados en los cuatro huevos en función del tiempo (en segundos).

ID	Hiperhemia		Hemorragia		Coagulación		Puntuación final
	Tiempo (s)	Puntuación	Tiempo (s)	Puntuación	Tiempo (s)	Puntuación	
1	28	5	37	5	0	0	10
2	27	5	42	5	0	0	10
3	29	5	49	5	0	0	10
4	29	5	44	5	0	0	10
Media		5.0		5.0		0	10

#### **4.4 Estudios de eficacia *in vitro***

Se estudió la eficacia *in vitro* para poder determinar los posibles efectos regenerativos del GH en comparación con el HA en HDF y HaCat. En primer lugar, se evaluó la eficacia del GH con un ensayo de migración celular. A continuación, se estudió el potencial proliferativo del GH. Finalmente, se evaluó el nivel de expresión génica de cuatro moléculas implicadas en la regeneración en HDF: ácido hialurónico, colágeno tipo I y III y elastina tras el tratamiento con GH. En HaCat sólo se analizó la expresión génica de ácido hialurónico tras el tratamiento con GH.

##### **4.4.1 Ensayo de migración celular**

Para estudiar la migración celular, los HDF y HaCat se trataron con dos soluciones de GH al 3% y 10% tras realizar una herida con una punta de pipeta sobre la monocapa de células. Como control se utilizó la misma concentración de HA (3% y 10%). Se tomaron imágenes a tiempo cero justo al inicio del tratamiento y pasadas 12 horas de incubación (Figura 4.10). El potencial migratorio se expresó como porcentaje tras ser procesado con ImageJ (Figura 4.11).

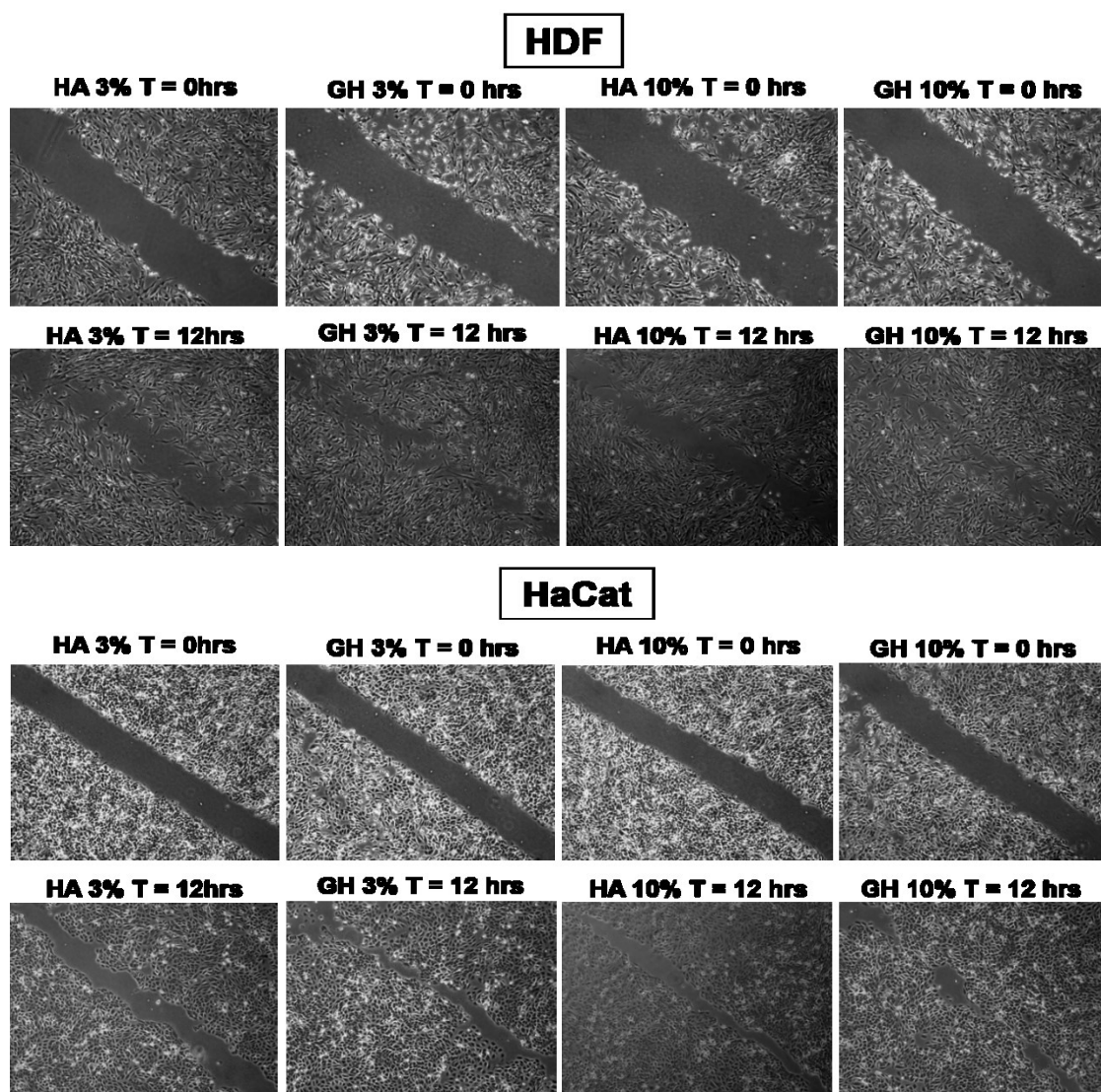


Figura 4.10 Imágenes de la migración celular en HDF (arriba) y HaCat (abajo) a tiempo cero y tras 12 hrs de incubación con 3% y 10% de HA y GH respectivamente. Imágenes tomadas con un microscopio de luz invertida (Nikon E600) utilizando el objetivo 40x.

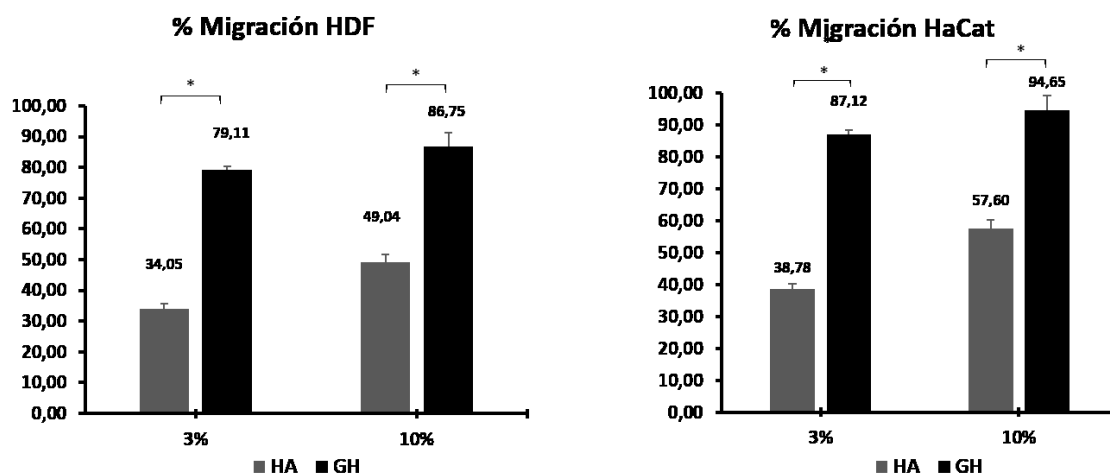


Figura 4.11 Porcentaje de migración celular en HDF (izquierda) y HaCat (derecha) tras 12 hrs de incubación con 3% y 10% de HA y GH respectivamente. Análisis realizado tras tomar las imágenes a 0 hrs y después de 12 hrs de incubación, con *FIJI Software* (media (SD)). Análisis estadístico por One-way ANOVA (\*  $p < 0.05$ ).

#### 4.4.2 Ensayo de proliferación celular

Para estudiar la proliferación celular, los HDF y HaCat se trataron con cuatro soluciones de GH al 1%, 3%, 5% y 10% con la finalidad de evaluar una posible correlación dosis-efecto. Como control se utilizó la misma concentración de HA (1%, 3%, 5% y 10%). La capacidad proliferativa se expresó como porcentaje respecto al control negativo y se evaluó tras 12 horas de incubación (Figura 4.12).

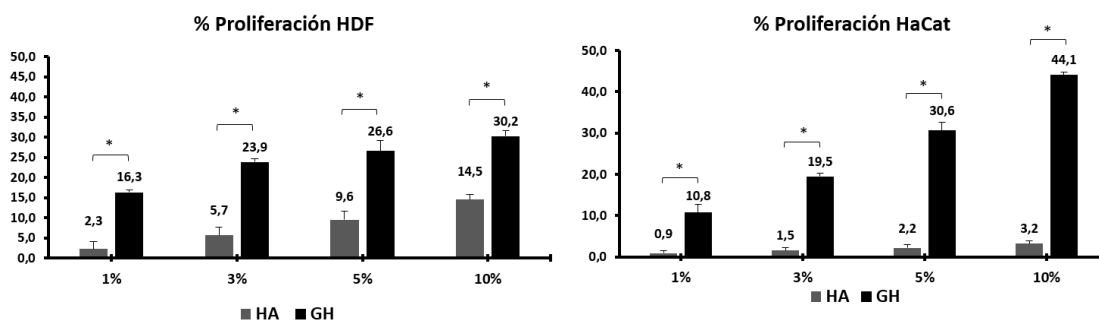


Figura 4.12 Porcentaje de proliferación celular en HDF (izquierda) y HaCat (derecha) tras 48 hrs de incubación con 1%, 3%, 5% y 10% de HA y GH respectivamente. Análisis estadístico por One-way ANOVA (\*  $p < 0.05$ ).

#### 4.4.3 Ensayo de expresión génica

Se evaluó la expresión génica de HAS 2, COL 1, COL 3 y Elastina a nivel de ARN mensajero en HDF (Figura 4.13). También se estudió la expresión génica de HAS 2 a nivel de ARN mensajero en HaCat (Figura 4.14). Los tiempos de incubación fueron 24 y 48 horas. El porcentaje de tratamiento fue 3% y 10%. Como control se utilizó HA a la misma concentración que el GH (3% y 10%). Los resultados se normalizaron en relación al gen 18S rRNA endógeno, a través del software *StepOne* de *Applied Biosystems*.



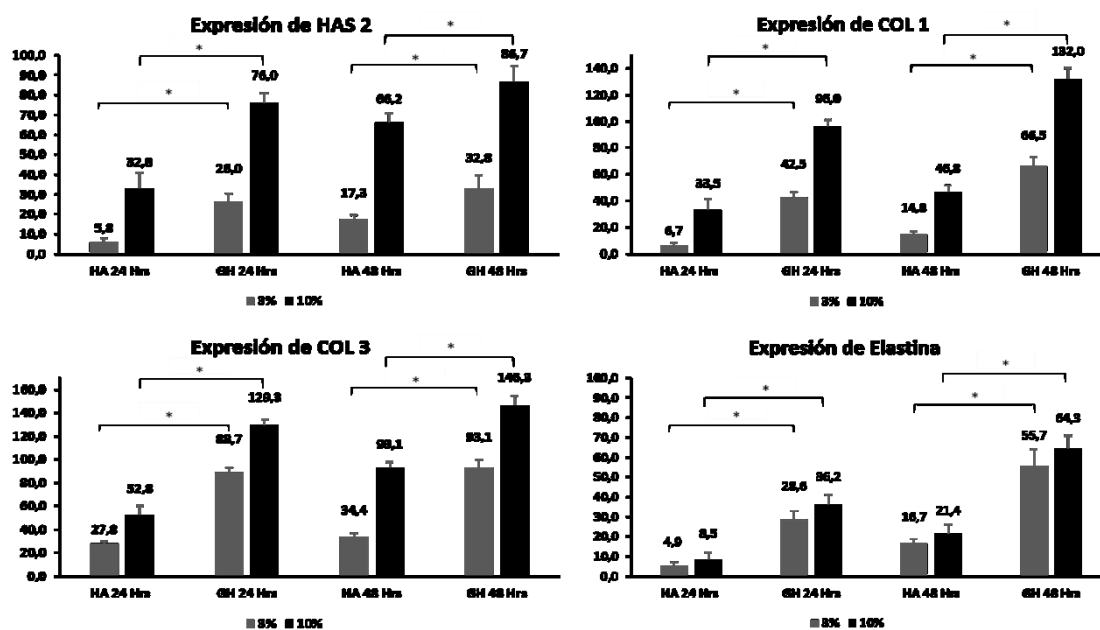


Figura 4.13 Porcentaje de expresión génica a nivel de RNAm (HAS 2 arriba a la izquierda, COL 1 arriba a la derecha, COL 3 abajo a la izquierda y Elastina abajo a la derecha) analizado por PCR cuantitativa en HDF tras 24 hrs y 48 hrs de incubación con 3% y 10% de HA y GH respectivamente y normalizados en relación al gen 18S rRNA endógeno. Análisis estadístico por One-way ANOVA (\* p < 0.05).

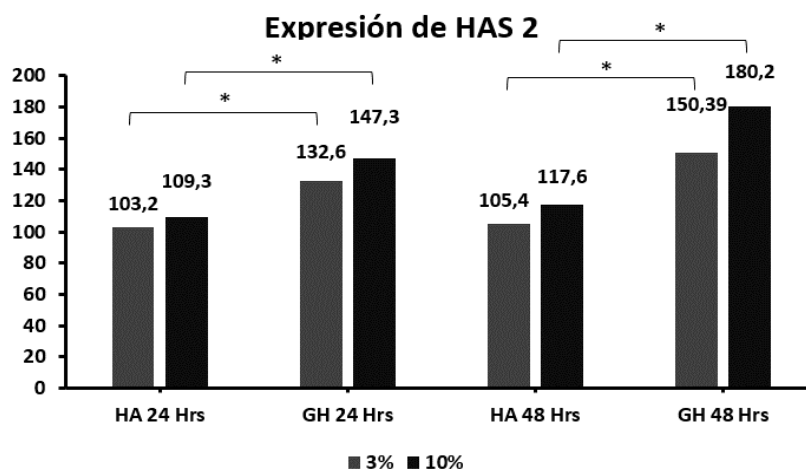


Figura 4.14 Porcentaje de expresión génica de HAS 2 a nivel de RNAm analizado por PCR cuantitativa en HaCat tras 24 hrs y 48 hrs de incubación con 3% y 10% de HA y GH respectivamente y normalizados en relación al gen 18S rRNA endógeno. Análisis estadístico por One-way ANOVA (\* p < 0.05).

#### 4.5 Estudio de seguridad en voluntarios Patch Test

Se comprobó la compatibilidad cutánea del GH (1X, a una concentración de 33 ppm) después de una sola aplicación del producto al 100% en la piel de 23 voluntarios en condiciones experimentales exageradas (Tabla 4.7).

**Tabla 4.7 Resultados obtenidos tras evaluar el potencial irritante del GH a una concentración de 33 ppm en 23 voluntarios.**

Tiempo transcurrido hasta la evaluación tras quitar el parche	Voluntarios reactivos al parche	Tipos de reacción	Puntuación media de irritación	% de voluntarios reactivos
15 minutos	0	-	0	0%
24 horas	0	-	0	0%
<b>Puntuación media máxima de irritación</b>				<b>0</b>
<b>% de voluntarios reactivos a 15 minutos o 24 horas</b>				<b>0%</b>

#### 4.6 Estudios de eficacia en voluntarios

Se realizó un ensayo anti-edad y un ensayo anticelulítico con la finalidad de estudiar la eficacia de dos formulaciones (sérum y crema) de GH. Los dos ensayos se realizaron con grupos representativos de la población a la que iba a ir destinado el producto.

#### 4.6.1 Estudio facial anti-edad

De las 23 voluntarias iniciales, 22 asistieron a la visita de seguimiento de los 28 días. La hidratación de la piel se midió con una sonda de capacitancia dieléctrica MY-

808S en las mejillas izquierda y derecha, en la zona periocular izquierda y derecha y en la frente. Se tomaron 3 muestras para cada zona estudiada y luego se promedió el total (Figura 4.15). Tras normalizar los datos obtenidos con los valores basales y realizar el promedio en porcentaje se obtuvo un porcentaje de mejora general del 15,64% ( $p < 0,0001$ ).

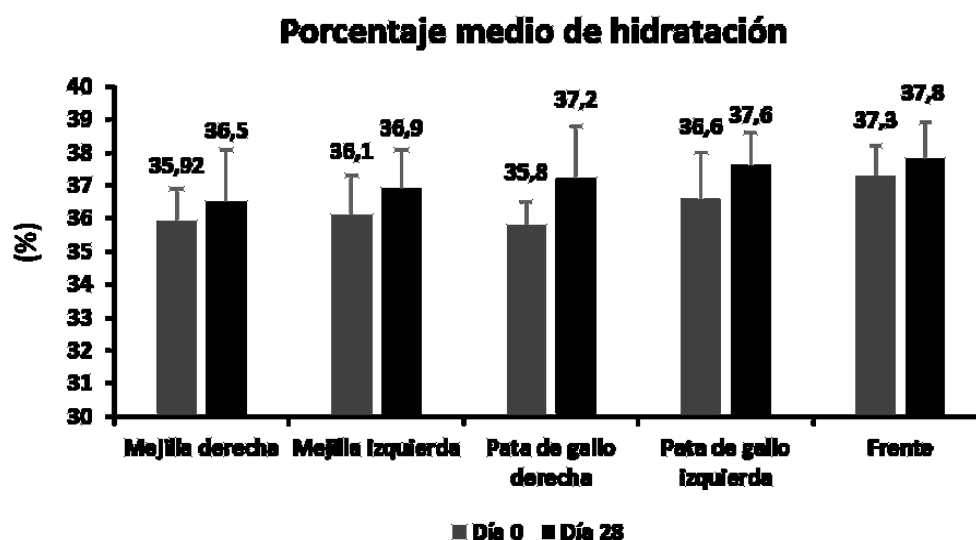


Figura 4.15 Promedio de los valores de hidratación expresados en porcentaje de cada área estudiada a día 0 (inicio del estudio) en comparación con el día 28 (finalización del estudio). Tras normalizar los datos obtenidos y hacer el promedio de los porcentajes de cada área tratada, se obtuvo una mejora general del 15,64%. Análisis estadístico por Kruskal Wallis ( $p < 0.0001$ ).

A continuación, se analizó la textura 3D de la piel en la zona periocular izquierda y derecha. Se cuantificaron y analizaron dos parámetros:

- La altura promedio de la arruga en la superficie.
- La profundidad máxima de la arruga.

También se realizaron medidas topométricas 3D junto con las mediciones de textura en ambas zonas (área periocular izquierda y derecha). Se midió y cuantificaron los siguientes parámetros:

- El volumen promedio de las arrugas.
- La circunferencia de las arrugas.
- El área de las arrugas.
- Rugosidad: promedio de la profundidad máxima y altura media de las arrugas.

Los parámetros de la textura 3D de la piel fueron evaluados en un área de 50 x 50 mm (Figura 4.16).

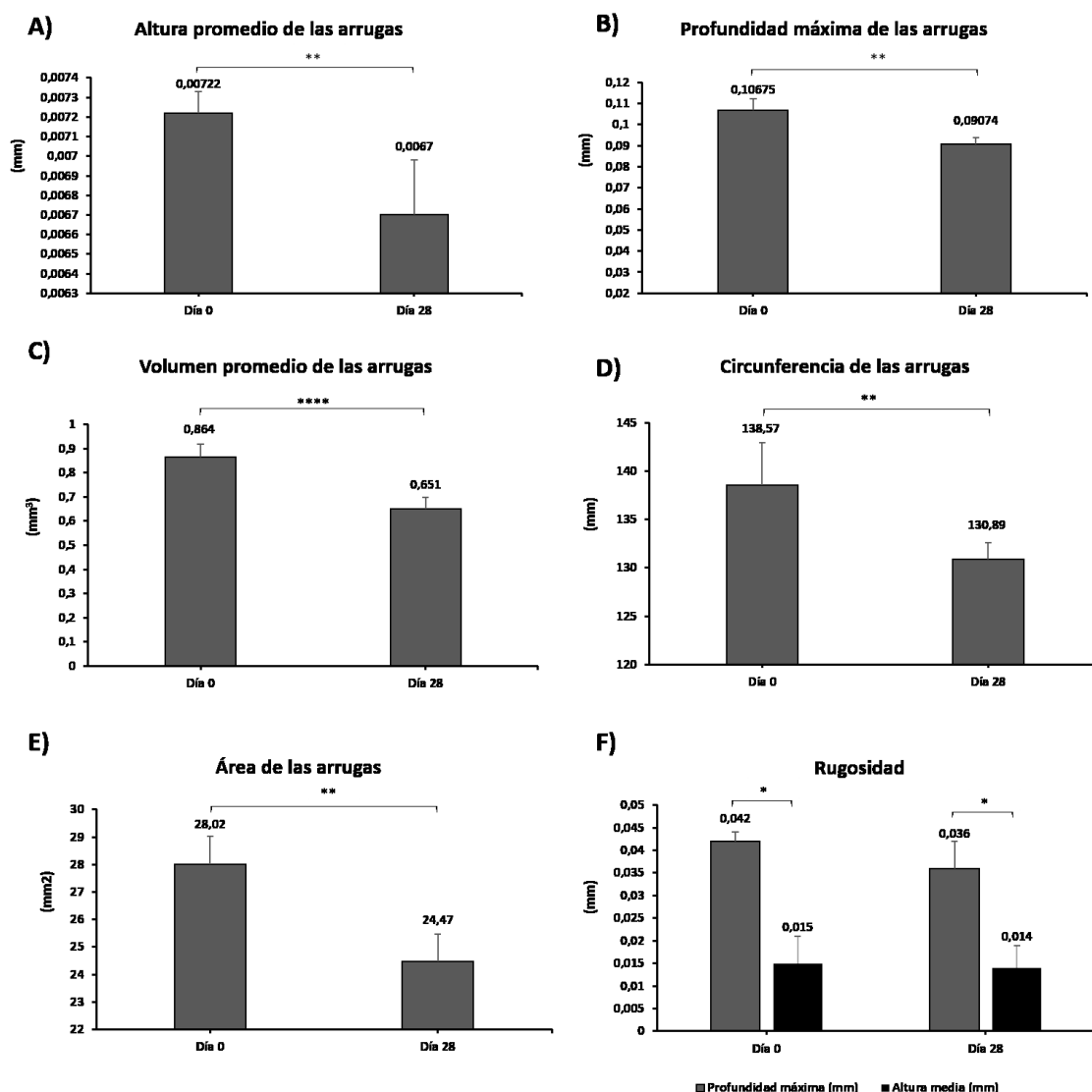
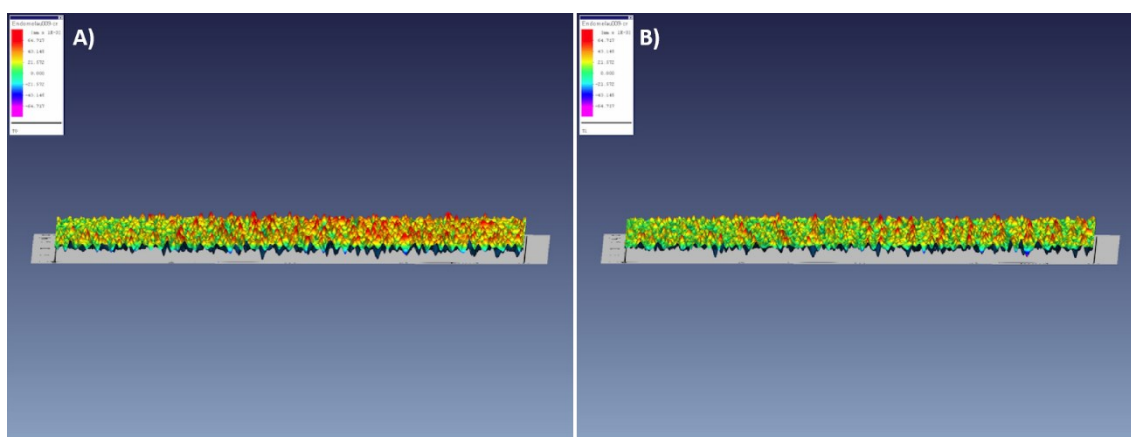


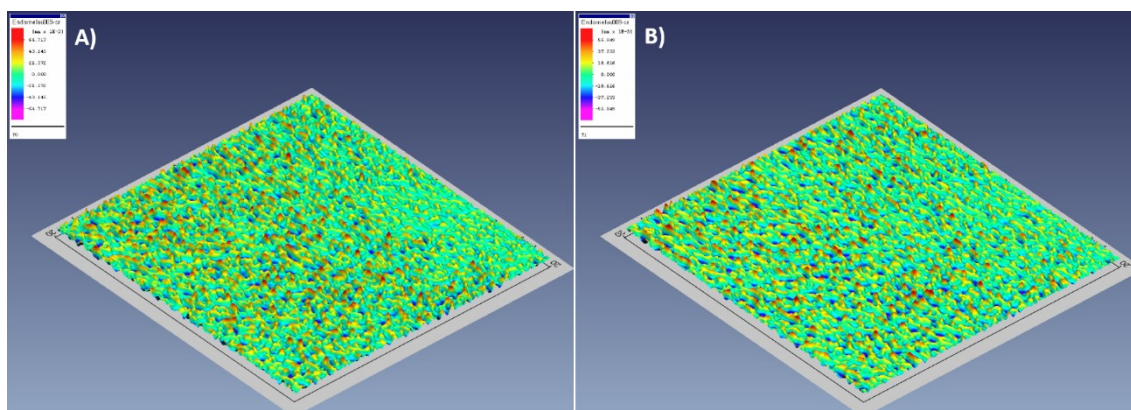
Figura 4.16 A) Altura promedio de las arrugas (mm). Análisis estadístico por t-Student (\*\* p < 0.01). B) Profundida máxima de las arrugas (mm). Análisis estadístico por t-Student (\*\* p < 0.01). C) Volumen de las arrugas (mm<sup>3</sup>). Análisis estadístico por t-Student (\*\*\*\* p < 0.0001). D) Circunferencia de las arrugas (mm). Análisis estadístico por t-Student (\*\* p < 0.01). E) Área promedio de las arrugas. Análisis estadístico por t-Student (\*\* p < 0.01). F) Rugosidad: profundidad máxima y altura media de las arrugas. Análisis estadístico por t-Student (\* p < 0.05).

A continuación, se muestran las imágenes topométricas de la textura obtenidas con FOITS. La figura 4.17 muestra las imágenes del perfil de rugosidad del área periocular izquierda de la voluntaria ILA09 al inicio y al final del estudio. La figura 4.18 muestra las imágenes oblicuas de rugosidad del área periocular izquierda de la voluntaria ILA09 al inicio y final del estudio.

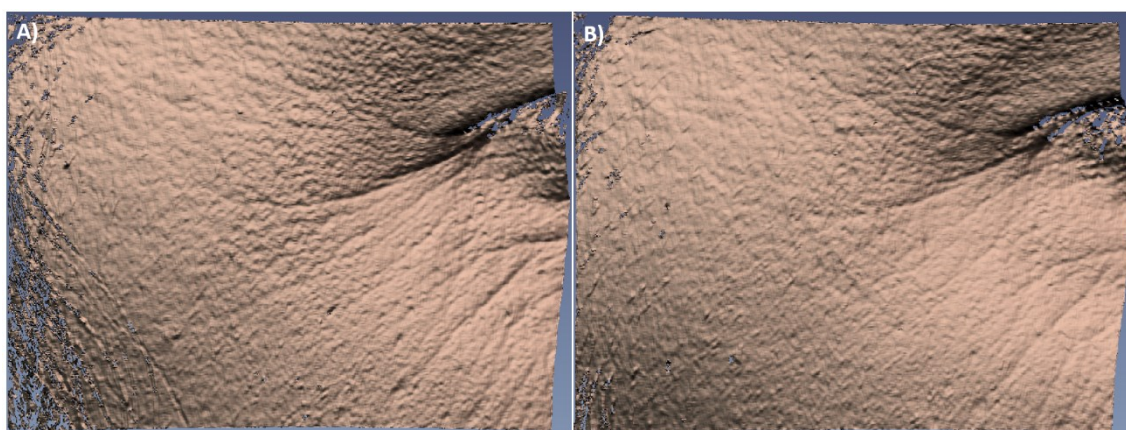
La figura 4.19 muestra las imágenes 3D del área periocular derecha de la voluntaria MSE10 al inicio y final del estudio. La figura 4.20 muestra las imágenes del perfil de las arrugas de la zona periocular derecha de la voluntaria MSE10 al inicio y final del estudio. Y la figura 4.21 muestra las imágenes oblicuas de las arrugas de la zona periocular derecha de la voluntaria MSE10 al inicio y final del estudio.



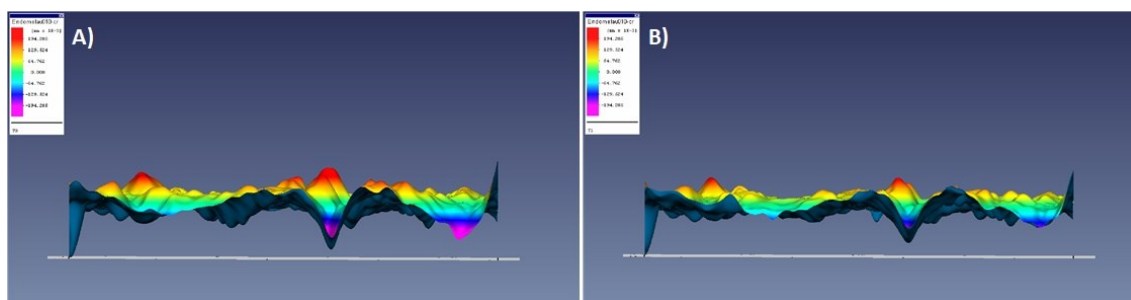
**Figura 4.17 A) Imagen del perfil de la rugosidad de la zona periocular izquierda, de la voluntaria ILA09 al inicio del estudio. B) Imagen del perfil de la rugosidad de la zona periocular izquierda, de la voluntaria ILA09 tras 28 días de tratamiento con las dos formulaciones de GH (sérum y crema).**



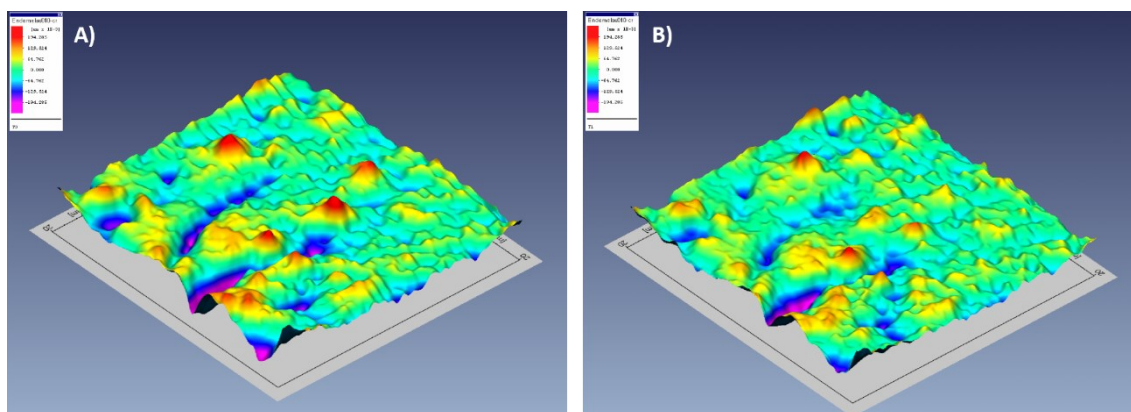
**Figura 4.18 A) Imagen oblicua de la rugosidad de la zona periocular izquierda, de la voluntaria ILA09 al inicio del estudio. B) Imagen oblicua de la rugosidad de la zona periocular izquierda, de la voluntaria ILA09 tras 28 días de tratamiento con las dos formulaciones de GH (sérúm y crema).**



**Figura 4.19 A) Imagen 3D del área periocular derecha de la voluntaria MSE10 al inicio del estudio. B) Imagen 3D del área periocular derecha de la voluntaria MSE10 tras 28 días de tratamiento con las dos formulaciones de GH (sérúm y crema).**



**Figura 4.20 A) Imagen del perfil de las arrugas de la zona periocular derecha, de la voluntaria MSE10 al inicio del estudio. B) Imagen del perfil de las arrugas de la zona periocular derecha, de la voluntaria MSE10 tras 28 días de tratamiento con las dos formulaciones de GH (sérum y crema).**



**Figura 4.21 A) Imagen oblicua de las arrugas de la zona periocular derecha, de la voluntaria MSE10 al inicio del estudio. B) Imagen oblicua de las arrugas de la zona periocular derecha, de la voluntaria MSE10 tras 28 días de tratamiento con las dos formulaciones de GH (sérum y crema).**

Los resultados del grosor epidérmico y dérmico y la densidad ecogénica epidérmica y dérmica cuantificados mediante HFUS a 50 MHz son el promedio de 3 muestras para cada mejilla y se muestran en la Figura 4.22.



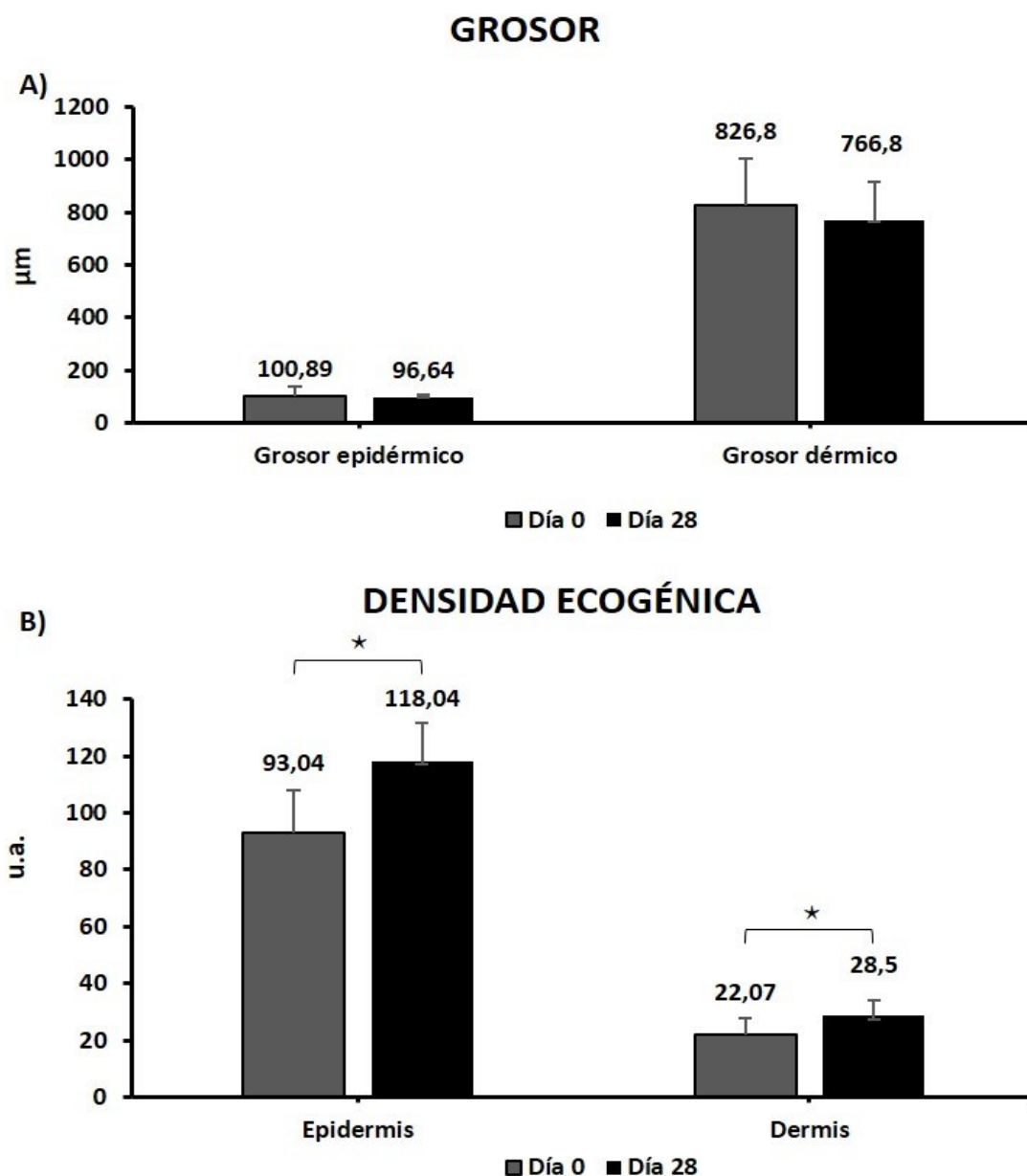


Figura 4.22 A) Comparativa del grosor epidérmico y dérmico al inicio y final del estudio. Análisis estadístico por t-Student ( $p > 0.01$ ). B) Comparativa de la densidad ecogénica epidérmica y dérmica al inicio y final del estudio. Análisis estadístico por t-Student (\*  $p < 0.05$ ).

A continuación, se muestra una imagen de la densidad ecogénica dérmica antes y después del tratamiento, obtenida con ultrasonidos de alta frecuencia (Figura 4.23).

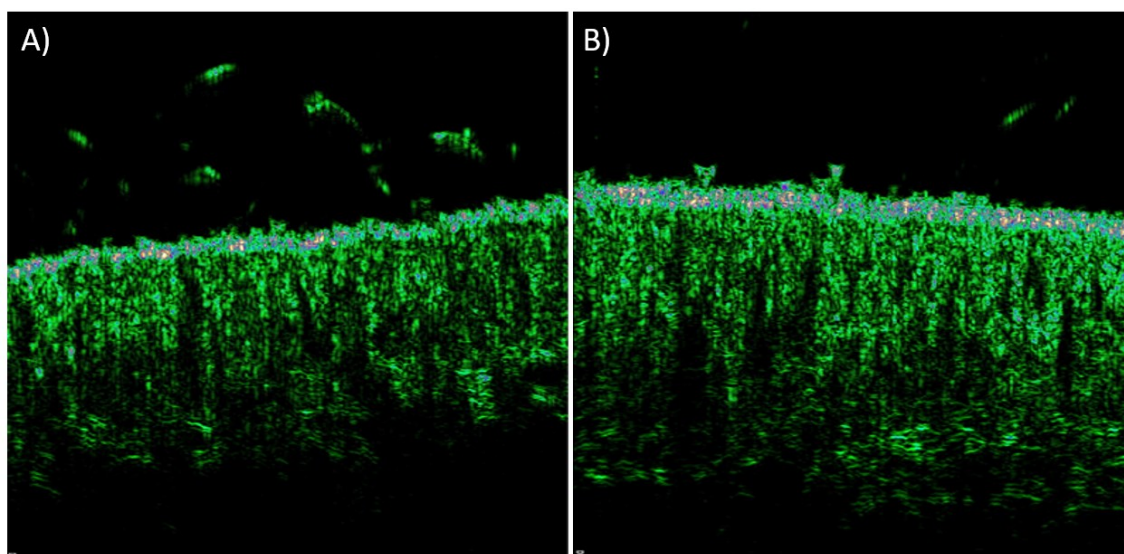


Figura 4.23 A) Imagen de la parte lateral izquierda de la cara de la voluntaria ZF017 obtenida con ultrasonidos de alta frecuencia de la densidad ecogénica dérmica antes de ser tratada con GH (sérum y crema). B) Imagen de la parte lateral izquierda de la cara de la voluntaria ZF017 obtenida con ultrasonidos de alta frecuencia de la densidad ecogénica dérmica después de ser tratada GH (sérum y crema) durante 28 días.

Tabla 4.8 Tabla resumen de los resultados obtenidos en el estudio con voluntarias en porcentaje tras evaluar el potencial del GH en una formulación de sérum y otra de crema como ingrediente antiedad.

Parámetros analizados	Porcentaje
Altura promedio de las arrugas	-5,25%
Profundidad máxima de las arrugas	-21,89%
Volumen promedio de las arrugas	-24,69%
Circunferencia de las arrugas	-6,91%
Área de las arrugas	-12,11%
Rugosidad: profundidad máxima	-9,36%
Rugosidad: altura media	-7,03%
Grosor epidérmico	2,13%
Grosor dérmico	-4,95%
Densidad ecogénica epidérmica	30,04%
Densidad ecogénica dérmica	37,40%

**4.6.2 Estudio anticelulítico**

Se realizó un ensayo de doble ciego con el objetivo de evaluar la eficacia anticelulítica *in vivo* de una formulación que contenía un 3% de GH (fórmula A) en comparación con una segunda formulación que contenía la misma cantidad de oligosacáridos de ácido hialurónico (fórmula B), y donde los sujetos fueron su propio control. Todas las voluntarias mostraron un grado 1 o 2 de celulitis en ambos muslos (escala de Müller). Dos de las voluntarias reclutadas al inicio del estudio no acabaron el estudio y no se pudieron tomar sus datos (voluntaria 2 y voluntaria 9). De esta manera se analizaron 22 voluntarias. Además, por problemas técnicos, no se pudo realizar la evaluación de antioxidantes en una de las voluntarias que completaron el estudio (voluntaria 1), ni los datos FOITS obtenidos a día 0 de otra voluntaria (voluntaria 9). También por problemas técnicos, en una de las voluntarias (voluntaria 17), el análisis de la parte izquierda FOITS tuvo que ser realizado en un área de 42 x 65 mm en lugar de 50 x 60 mm. Esta información se tuvo en cuenta en la expresión de los resultados, en cada tipo de examen y para cada técnica (Tabla 4.9).

**Tabla 4.9 Técnicas y número de voluntarias que realizaron las pruebas el día de inicio del estudio (D0) y el día de finalización del estudio (D28).**

		<b>D0</b>	<b>D28</b>
<b>Peso de las voluntarias</b>	<b>Formula A</b>	24	22
	<b>Formula B</b>	24	22
<b>Circunferencia del muslo</b>	<b>Formula A</b>	24	22
	<b>Formula B</b>	24	22
<b>Fotografías clínicas</b>	<b>Formula A</b>	24	22
	<b>Formula B</b>	24	22
<b>Análisis 3D de hoyuelos con FOITS</b>	<b>Formula A</b>	23	21
	<b>Formula B</b>	23	21
<b>Análisis 3D de la textura con FOITS</b>	<b>Formula A</b>	23	21
	<b>Formula B</b>	23	21
<b>Cuantificación de antioxidantes</b>	<b>Formula A</b>	23	21
	<b>Formula B</b>	23	21
<b>Densidad epidérmica y dérmica por HFUS</b>	<b>Formula A</b>	24	22
	<b>Formula B</b>	24	22

El peso corporal promedio de las voluntarias no varió durante el ensayo (Figura 4.24).

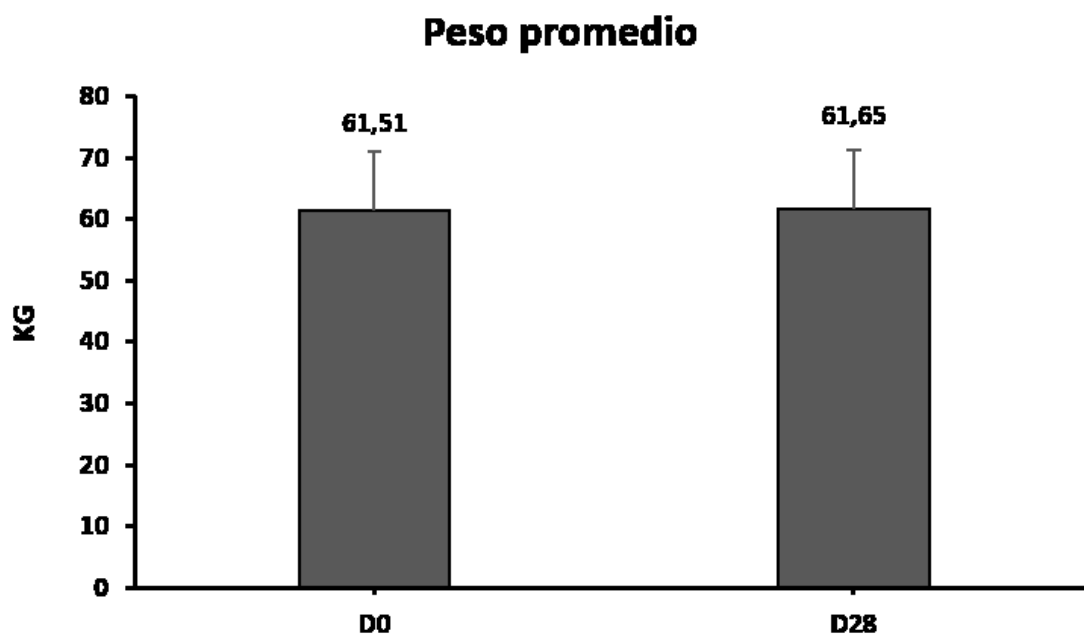


Figura 4.24 Peso promedio de las voluntarias el día de inicio del estudio (D0) y el día de finalización del estudio (D28). Análisis estadístico t-Student ( $p > 0.05$ ).

Dado que no se observan diferencias significativas en los valores del peso corporal entre D0 y D28, se continuó con la evaluación (en cm) de la circunferencia del muslo. También se midió la cantidad de antioxidantes a través de la cuantificación de carotenoides autofluorescentes a D0 y D28 para los dos lados tratados con el producto A y el producto B. También se analizaron las medidas de grosor epidérmico y dérmico, así como los valores de densidad ecogénica de la epidermis y los valores de densidad ecogénica de la dermis. Los tratamientos se realizaron con el producto A (GH) y el producto B (HA). Se analizaron estadísticamente los resultados correspondientes a la comparación de ambos lados (prueba de t-Student, dos colas para grupos pareados al 5%, después de comprobar la normalidad de las distribuciones mediante una prueba de Shapiro-Wilk). (Figura 4.25).

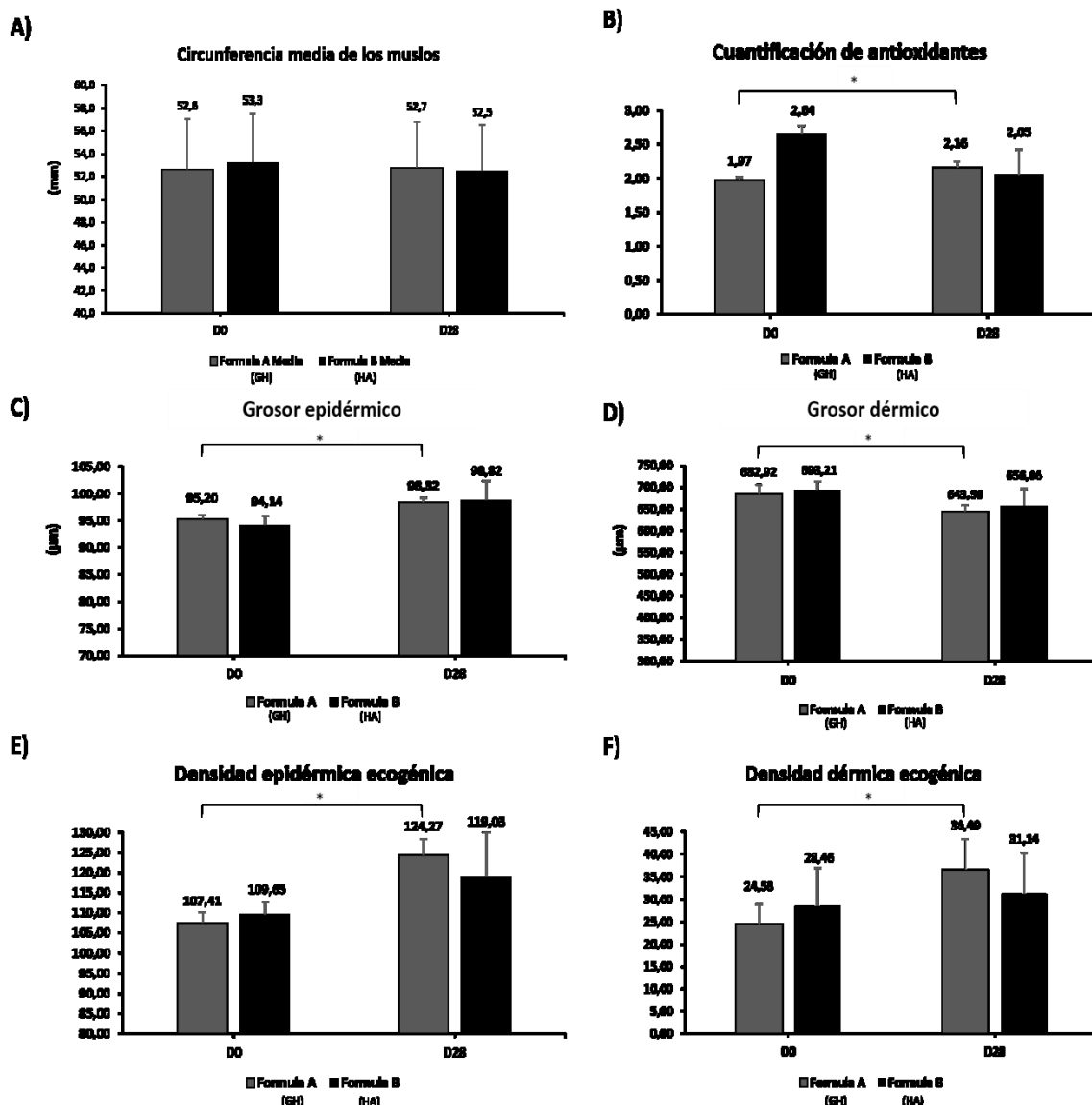
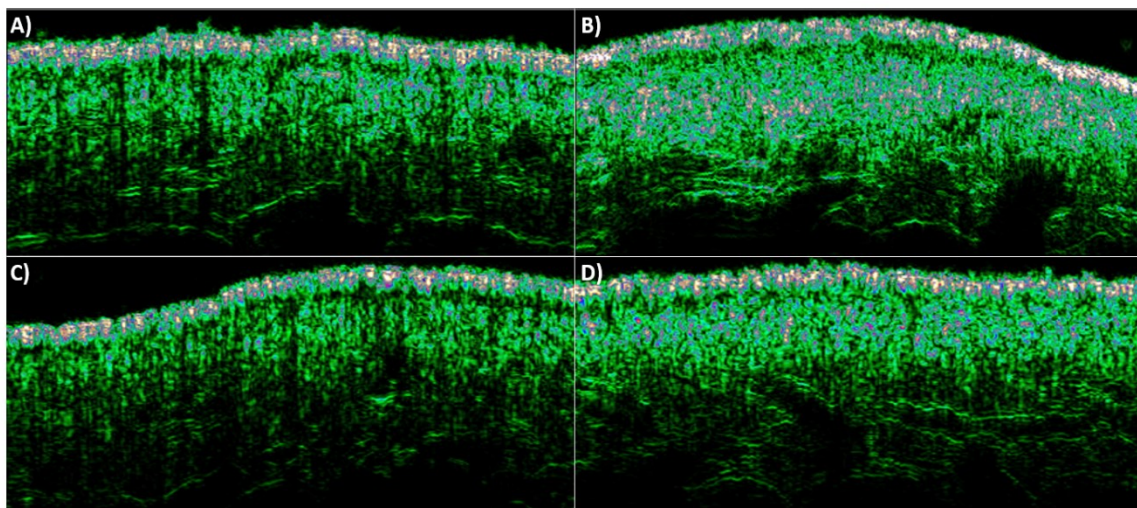


Figura 4.25 A) Circunferencia media del muslo de las voluntarias el día de inicio del estudio (D0) y el día de finalización del estudio (D28). Análisis estadístico por t-Student ( $p > 0.05$ ). B) Cuantificación de antioxidantes al inicio del estudio (D0) y al finalizar el estudio (D28) (unidad de medida arbitraria, se representan los valores de cuantificación obtenidos en la cuantificación de los carotenoides autofluorescentes). Análisis estadístico por t-Student (\*  $p < 0.05$ ). C) Variación del grosor epidérmico (mm) al inicio y final del estudio. Análisis estadístico por t-Student (\*  $p < 0.05$ ). D) Variación del grosor dérmico (mm) al inicio y final del estudio. Análisis estadístico por t-Student (\*  $p < 0.05$ ). E) Variación de la densidad epidérmica ecogénica al inicio y final del estudio. Análisis estadístico por t-Student (\*  $p < 0.05$ ). F) Variación de la densidad dérmica ecogénica al inicio y final del estudio. Análisis estadístico por t-Student (\*  $p < 0.05$ ).

Se tomaron imágenes con ultrasonidos de alta frecuencia para comparar la densidad de la piel tratada con la formulación A (GH) y la piel tratada con la formulación B (HA) (Figura 4.26).



**Figura 4.26** A) Imagen de la densidad de la piel obtenida con ultrasonidos de alta frecuencia antes de iniciar el tratamiento con la formulación A (GH). B) Imagen de la densidad de la piel obtenida con ultrasonidos de alta frecuencia tras la aplicación de la formulación A (GH) durante 28 días. C) Imagen de la densidad de la piel obtenida con ultrasonidos de alta frecuencia antes de iniciar el tratamiento con la formulación B (HA). D) Imagen de la densidad de la piel obtenida con ultrasonidos de alta frecuencia tras la aplicación de la formulación B (HA) durante 28 días.

La textura de la piel se evaluó tras analizar los siguientes parámetros: rugosidad media, variación media de la rugosidad y amplitud máxima del relieve. Se evaluó la media de los valores a D0 y D28 para los lados tratados con el producto A (GH) y el producto B (HA). Se analizaron estadísticamente los resultados correspondientes a la comparación de ambos lados (prueba de t-Student, dos colas para grupos pareados al 5%, después de comprobar la normalidad de las distribuciones mediante una prueba de Shapiro-Wilk). (Figura 4.27 y Figura 4.28).

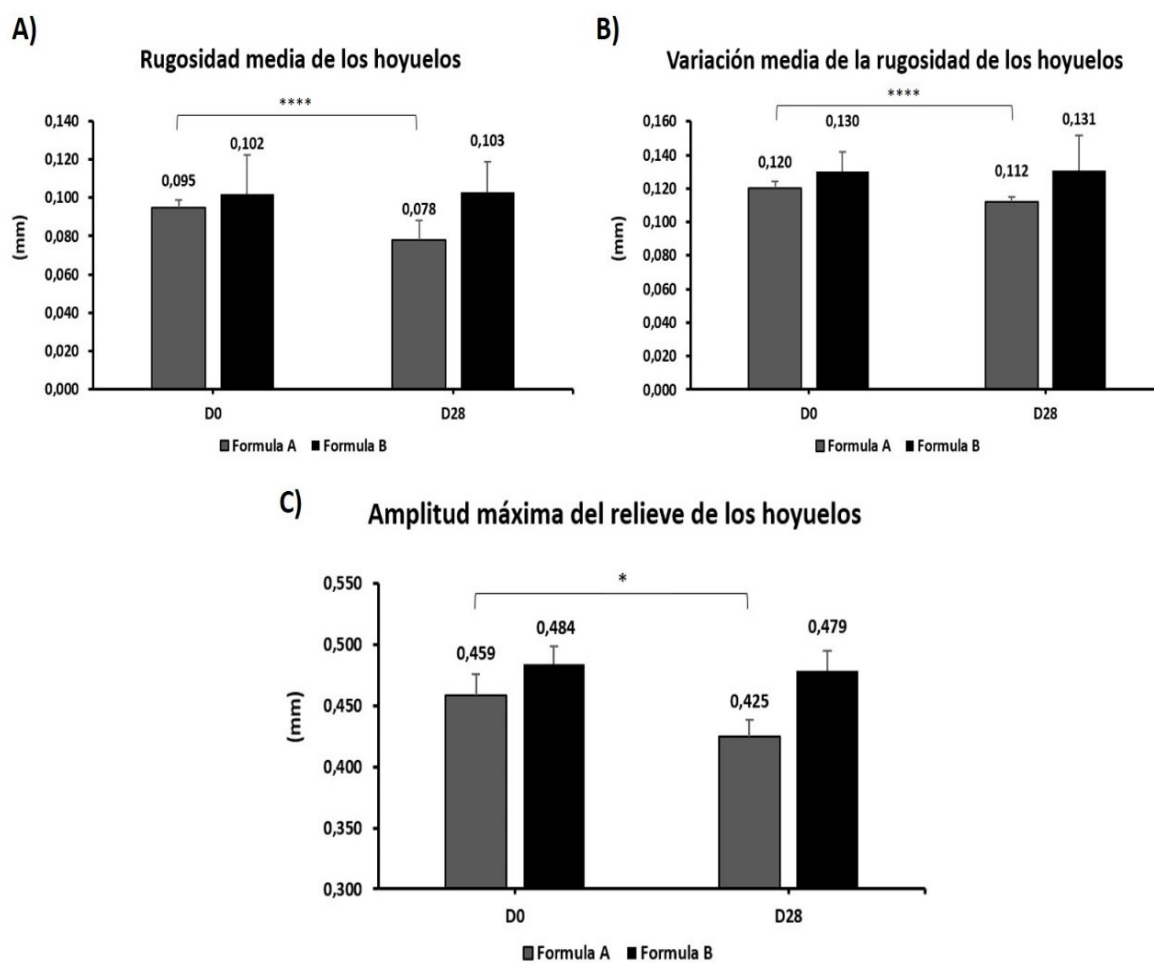
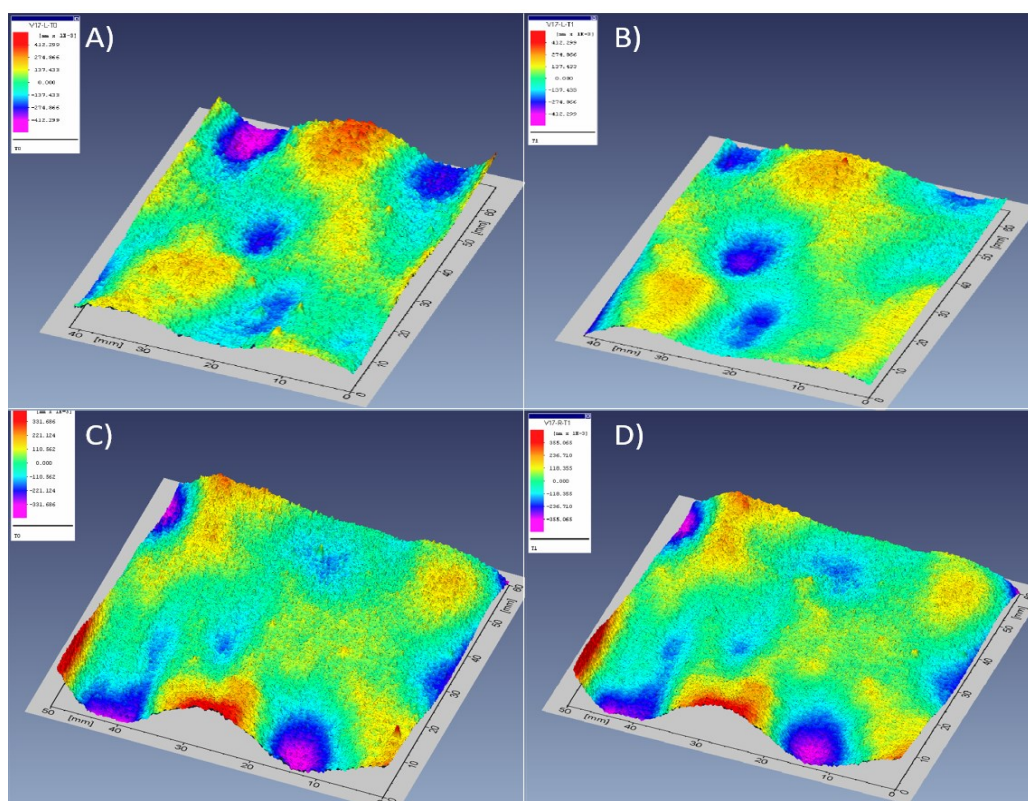


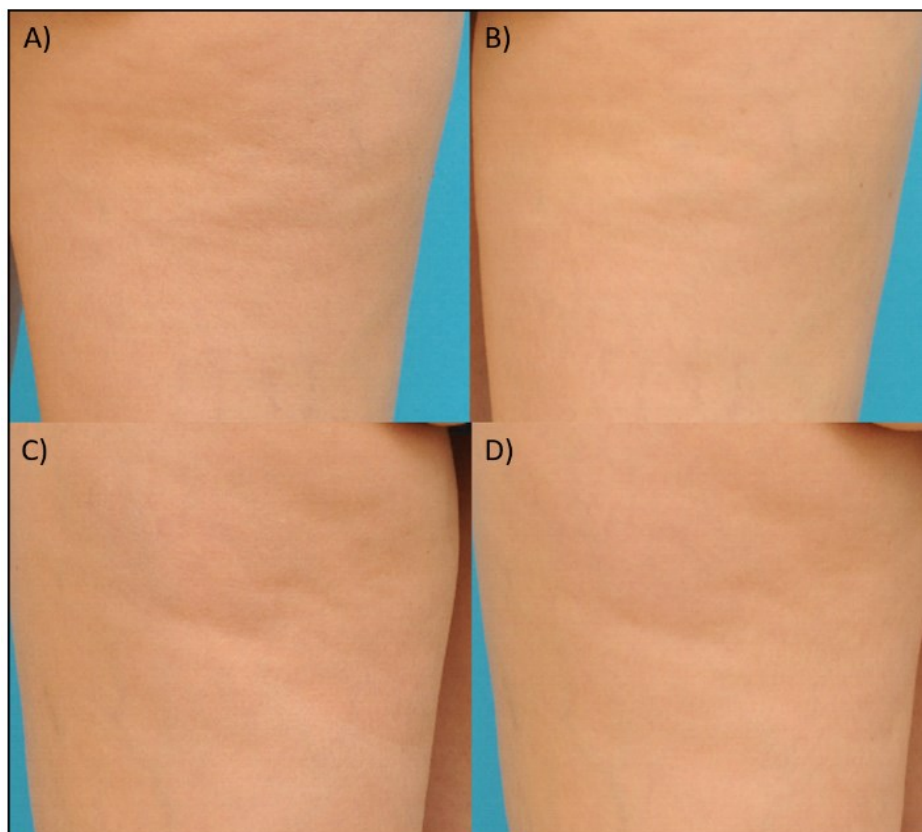
Figura 4.27 A) Promedio de la rugosidad de los hoyuelos (mm). Análisis estadístico por t-Student (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). B) Variación media de la rugosidad de los hoyuelos (mm Análisis estadístico por t-Student (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). C) Amplitud máxima del relieve de los hoyuelos (mm). Análisis estadístico por t-Student (\*  $p < 0.05$ ).



**Figura 4.28 A) Imagen de la rugosidad del área analizada antes de ser tratada con GH. B) Imagen de la rugosidad del área analizada después de ser tratada con GH durante 28 días. C) Imagen de la rugosidad del área analizada antes de ser tratada con el placebo. D) Imagen de la rugosidad del área analizada después de ser tratada con el placebo durante 28 días.**

Se tomaron fotografías de las voluntarias para tener una referencia visual antes y después del estudio. (Figura 4.29).





**Figura 4.29** A) Imagen de la pierna antes de ser tratada con la fórmula A (GH). B) Imagen de la pierna después de ser tratada con la fórmula A (GH) durante 28 días. C) Imagen de la pierna antes de ser tratada con el placebo, fórmula B (HA). D) Imagen de la pierna después de ser tratada con placebo, fórmula B (HA) durante 28 días.

También se evaluó la media (en los dos lados tratados por el producto A (GH) y por el producto B (HA)) del volumen de los hoyuelos, la circunferencia, el área, la profundidad máxima y la profundidad media a D0 y se comparó a D28. Se analizaron estadísticamente los resultados correspondientes a la comparación de ambos lados (prueba de t-Student, dos colas para grupos pareados al 5%, después de comprobar la normalidad de las distribuciones mediante una prueba de Shapiro-Wilk). (Figura 4.30).

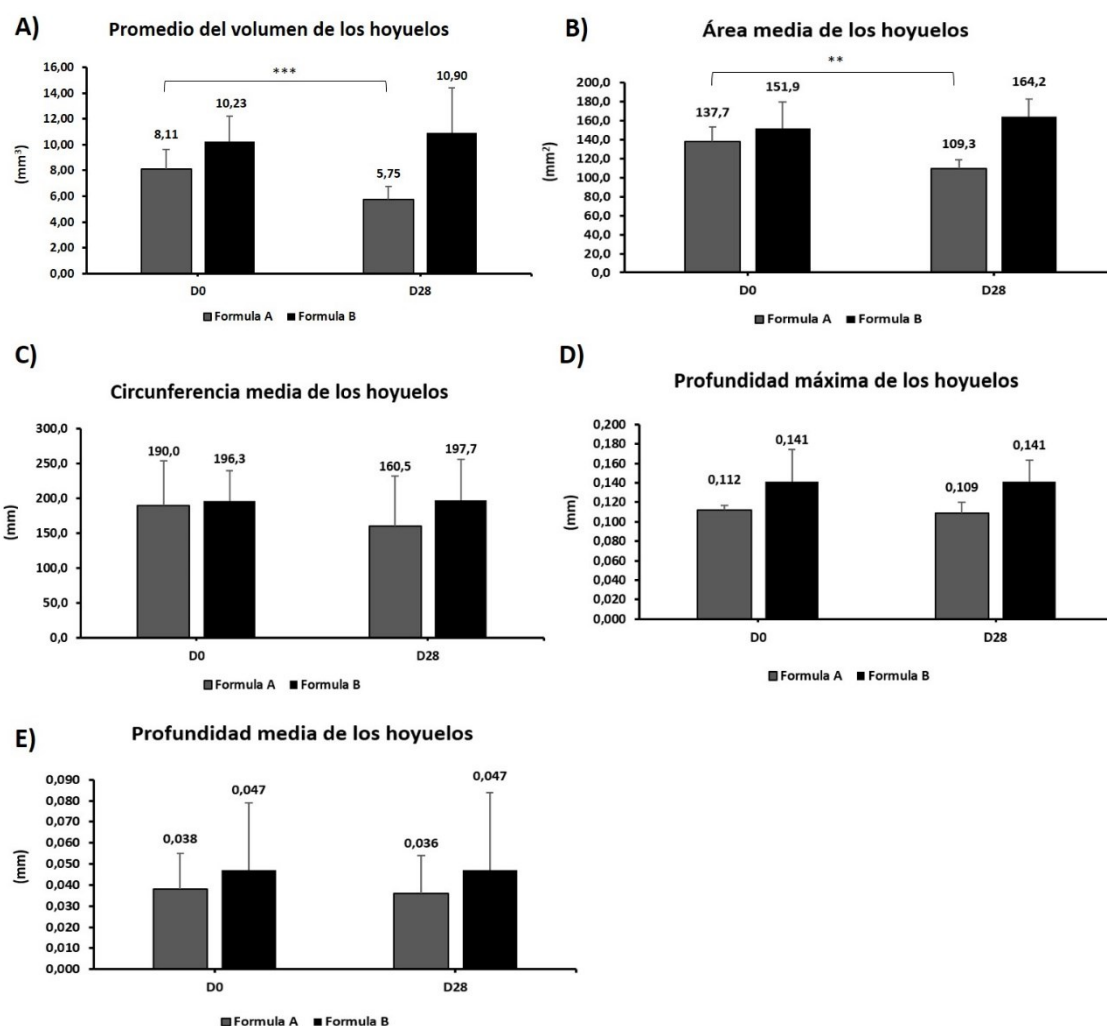


Figura 4.30 A) Promedio del volumen de los hoyuelos (mm<sup>3</sup>). Análisis estadístico por t-Student (\*\*\*) p < 0.001). B) Área media de los hoyuelos (mm<sup>2</sup>). Análisis estadístico por t-Student (\*\* p < 0.01). C) Circunferencia media de los hoyuelos (mm). Análisis estadístico por t-Student (p > 0.05). D) Profundidad máxima de los hoyuelos (mm). Análisis estadístico por t-Student (p > 0.05). E) Profundidad media de los hoyuelos. Análisis estadístico por t-Student (p > 0.05).

Por último, se muestran las imágenes de las biopsias de piel. En la Figura 4.31 A, B, y C se muestra la tinción de azul alcian que ha servido para teñir el HA. En la Figura 4.31 D, E y F se muestra la tinción tricrómica de Masson que ha servido para teñir el colágeno. En rojo se ha marcado la zona cuantificada tras realizar el análisis de imágenes histológicas computarizadas, tras las respectivas tinciones.

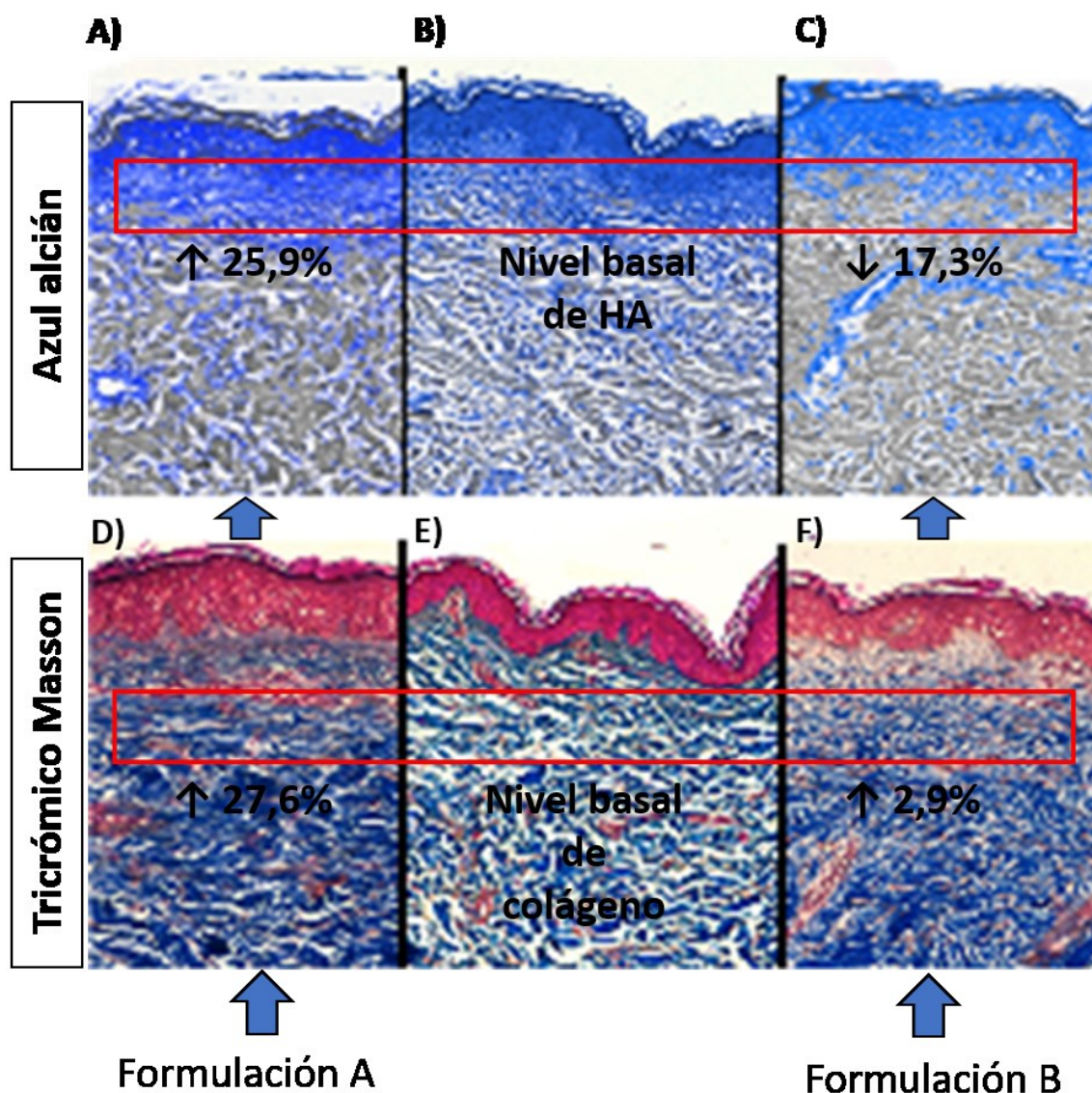


Figura 4.31 A) Muestra tratada durante 28 días con la formulación A (GH), teñida con azul alcian. Muestra un incremento de HA del 25,9% respecto el nivel basal. B) Muestra tomada al inicio del tratamiento, tomada como referencia del nivel basal. C) Muestra tratada durante 28 días con la formulación B (HA), teñida con azul alcian. Muestra una disminución del 17,3% de HA respecto el nivel basal de HA. D) Muestra tratada durante 28 días con la formulación A (GH), teñida con tricrómico Masson. Muestra un incremento de colágeno del 27,6% respecto el nivel basal. E) Muestra tomada al inicio del tratamiento, tomada como referencia del nivel basal de colágeno. F) Muestra tratada durante 28 días con la formulación B (HA), teñida con tricrómico Masson. Muestra una disminución del 17,3% de colágeno respecto el nivel basal.

Tabla 4.10 Tabla resumen de los resultados obtenidos en porcentaje en el estudio anticelulítico tras evaluar el potencial de la formulación A y la formulación B.

<b>Parámetros analizados</b>	<b>% Fórmula A</b>	<b>% Fórmula B</b>
Peso de las voluntarias	0,29%	-1,43%
Volumen de los hoyuelos	-31,16%	-1,67%
Circunferencia de los hoyuelos	-17,39%	-2,68%
Área de los hoyuelos	-22,01%	2,30%
Profundidad máxima de los hoyuelos	-3,54%	-3,48%
Profundidad media de los hoyuelos	-4,53%	-1,27%
Rugosidad media de los hoyuelos	-6,39%	-0,04%
Variación de la rugosidad de los hoyuelos	-6,47%	0,13%
Relieve de los hoyuelos	-7,17%	-1,26%
Carotenoides	17,89%	-6,05%
Grosor epidérmico	3,58%	6,87%
Grosor dérmico	-5,07%	4,88%
Densidad epidérmica	15,15%	11,79%
Densidad dérmica	51,74%	21,12%
Biopsia: HA	25,90%	-17,30%
Biopsia: colágeno	27,60%	2,90%



# DISCUSIÓN

---



## 5. DISCUSIÓN

Las AuNPs, exhiben unas excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, intrínsecas a su tamaño nanométrico. El oro como vehículo transportador a escala nanométrica no es tóxico y es químicamente biocompatible. Las AuNPs son fáciles de producir y modificar y su área superficial permite una conjugación eficaz y estable (Heather-Herd et al., 2015). Por estas razones, las AuNPs proporcionan una plataforma atractiva para los tratamientos más vanguardistas en la producción de ingredientes activos con aplicaciones dermocosméticas. La llegada de HA en grandes cantidades a las células epidérmicas puede conseguirse mediante la funcionalización de las AuNPs con cadenas modificadas de HA de tamaño mediano-pequeño (Jin et al., 2010).

Debido a su solubilidad en agua, viscoelasticidad y biocompatibilidad, se ha utilizado el HA para aumentar la estabilidad, solubilidad y biodisponibilidad de numerosas formulaciones para diversas aplicaciones. Además, se han descrito y caracterizado *in vitro* (Jeong et al., 2008; Coradini et al., 1999) que los nanosistemas constituidos por HA, se dirigen al receptor de superficie celular CD44 (Cai et al., 2008; Ossipov, 2010), implicado en procesos clave para la regeneración de la piel.

### 5.1 Caracterización fisicoquímica de las AuNPs y del GH

A lo largo de los últimos años se ha visto un rápido aumento en el desarrollo de diversos nanomateriales. Entre los numerosos nanomateriales existen grandes diferencias en las propiedades estructurales, químicas y físicas. También es un apartado de interés y constante cambio la regulación de los nanomateriales; especialmente, en lo que respecta a la seguridad identificando los peligros para la salud y el medio ambiente, dado el rápido desarrollo de nuevos productos.



La actividad biológica de los nanomateriales probablemente depende de sus características fisicoquímicas. Estas características podrían no ser consideradas en estudios de toxicidad de rutina tradicionales. Por lo tanto, es de gran importancia realizar una caracterización exhaustiva para entender los efectos que los nanomateriales pueden tener en los medios biológicos. Las propiedades de los nanomateriales que deben incluirse en los estudios de caracterización incluyen (*Assay cascade protocols, NCL*):

- **Tamaño de partícula**
- **Distribución de tamaño**
- **Estado de aglomeración**
- **Forma**
- **Composición química**
- **Área de superficie**
- **Química de superficie**
- **Carga superficial (Sae-Yeol-Rim Paik et al., 2015; Powers et al., 2009 & Oberdörster et al., 2005)**

Las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales dictan su posterior captación celular, que también dependerá del tamaño que tengan las nanopartículas. Las nanopartículas con tamaños por encima de los 250 nm serán fagocitadas mientras que las nanopartículas con tamaños inferiores a 200 nm serán endocitadas. Además, la forma que tengan las nanopartículas puede afectar el tráfico intracelular y la localización citoplasmática o nuclear (Heather-Herd et al., 2015).

Una cascada detallada de caracterización puede dar información sobre la posible toxicidad del nanomaterial, así como su estado: las nanopartículas aglomeradas pueden funcionar de una manera completamente diferente en comparación con nanopartículas dispersas y los agregados podrían incluso no ser considerados nanomateriales debido a su tamaño superior.

Para comprobar el tamaño y la dispersidad de las AuNPs se utilizó TEM que nos permitió obtener imágenes y analizarlas mediante software especializado (Apartado 3.2.1). Las imágenes obtenidas de las AuNPs y del GH (Figura 4.1 A, C) mostraron que las AuNPs eran monodispersas, esféricas y no aglomeradas. El análisis informático de los valores numéricos del diámetro de las AuNPs y del GH (Figura 4.1 B y D) dieron una media de  $11,93 \pm 2,87$  nm para las AuNPs 12 nm y un valor de  $12,03 \pm 2,98$  nm para el GH, confirmando los diámetros esperados.

El tamaño del diámetro experimental de las AuNPs y del GH también se confirmó mediante el análisis por DLS (Figura 4.2), siendo los valores obtenidos para las AuNPs 12 nm de  $11,87 \pm 0$  nm y el GH de  $20,00 \pm 5,00$  nm. La comparativa de los valores por TEM (Figura 4.1 A y C) y DLS (Figura 4.2) de los diámetros son muy similares para las AuNPs, pero no para el GH ya que el DLS también mide la parte orgánica conjugada, es decir, la matriz de HA unida a la superficie de las AuNPs.

El Pot-Z realizado a las AuNPs mostró una carga superficial negativa tanto para las AuNPs 12 nm como para el GH (Figura 4.3). Las AuNPs 12 nm dieron un valor de  $-37,30 \pm 1,30$  mV, muy similar al GH con un valor de  $-37,10 \pm 1,80$  mV. Ambas muestras presentan una buena estabilidad electrostática por tener un valor de Pot-Z  $< -30$  mV ([www.malvern.com](http://www.malvern.com)).

Se cuantificó la cantidad de oro y el número de nanopartículas en solución por ICP-MS. La concentración de Au en solución (Tabla 4.1) muestra los valores esperados según la cantidad de Au utilizada en la síntesis. La concentración de Au en la solución concentrada de AuNPs 12 nm 3X ( $96,83 \pm 2,19$  ppm Au) fue la esperada en proporción al incremento de sal utilizada con respecto a las síntesis realizadas con la concentración estándar 1X, GH 1X ( $28,01 \pm 3,14$  ppm Au) y AuNPs-PEG 12 nm 1X ( $29,23 \pm 0,91$  ppm Au). Además, la concentración de Au nos permite conocer el número de AuNPs de 12 nm en la solución, un valor muy relevante a la hora de igualar soluciones y poder controlar el nanosistema.

La forma de incorporar el HA a las AuNPs para formar el GH se hizo mediante su tiolación para que el grupo funcional -SH se enlace de manera “covalent-like” a las AuNPs (Pensa et al., 2012). Se escogieron tamaños relativamente pequeños de peso molecular de HA (10 KDa) debido a la mayor facilidad de modificación sintética y para facilitar la obtención de un nanosistema (GH) suficientemente pequeño para favorecer su llegada a la epidermis. Se utilizó el AEO para cuantificar el número de moléculas de HA por nanopartícula que contiene el GH (Tabla 4.2). Se analizaron dos lotes de GH (GH.01 y GH.02) y se obtuvieron valores muy similares entre lotes. El AEO del GH.01 fue de  $1,59E^{+03}$  moléculas de HA por cada AuNP y el AEO del GH.02 fue de  $1,62E^{+03}$  moléculas de HA por cada AuNP, hecho que a su vez confirma la reproducibilidad en la síntesis de los diferentes lotes de GH.

Finalmente, la última técnica empleada para caracterizar las síntesis de las AuNPs y el GH fue el UV-Vis (Figura 4.4). Con un máximo del SPR a 520 nm y 524 nm respectivamente, se corroboró la longitud de onda descrita en la bibliografía (Klar et al., 1998; Link et al., 1999).

El método visual, además de las técnicas de caracterización fisicoquímicas empleadas en esta tesis, es un buen indicador de la alteración de las AuNPs (Figura 4.6 A y B). La agregación visualmente se detecta en el cambio de color rojo burdeos a azul e incluso pueden llegar a verse precipitados en la solución cuando las NPs están agregadas (Apyari et al., 2012; Lee et al., 2008). La completa caracterización nos confirma que la síntesis produce AuNPs esféricas de 12 nm, estables en agua y un tamaño y carga determinados que mejoran su estabilidad una vez conjugadas a HA para formar el GH.

Los estudios de caracterización química demostraron que la síntesis del GH estuvo bien controlada. El recubrimiento de HA confirió a las AuNPs mayor estabilidad y las hizo biológicamente compatibles en medios fisiológicos evitando la agregación. A través de ICP-MS pudimos cuantificar la concentración de Au de los stocks de AuNPs y de los lotes de GH.

Los exámenes de calidad visual y UV-VIS nos permitieron certificar que los lotes fabricados estaban en condiciones óptimas para iniciar los estudios de toxicidad y eficacia.

## 5.2 Viabilidad celular

Cuando se trata de nanomateriales, es fundamental realizar una exhaustiva caracterización biológica que incluya una profunda evaluación de la seguridad ya que la falta de información entorno a ellos se produce debido a la contemporaneidad del campo. Las mismas características que dan a las AuNPs su gran potencial en biomedicina, también pueden contribuir a su posible toxicidad. El uso de las AuNPs como vehículos transportadores a nanoescala podrían incrementar la eficacia en los tejidos diana y reducir los efectos secundarios, pero no hay que olvidar que su tamaño también puede conducir a efectos toxicológicos inesperados. Por eso es muy importante estudiar los posibles efectos toxicológicos de los nanomateriales diseñados para aplicaciones biomédicas (Nyström & Fadeel, 2012).

Los efectos tóxicos de las nanopartículas dependen considerablemente de las modificaciones de su superficie (Chompoosor et al., 2010, Das, Debnath, Mitra, Datta y Goswami, 2012; Kim, Saha, Kim y Rotello, 2013). La toxicidad del GH *in vitro* fue estudiada en una batería de diluciones del 1%, 3%, 25%, 50%, 75% y 100% en dos líneas celulares, HDF y HaCat. Tras analizar los resultados, la toxicidad del GH se mantuvo muy baja, por debajo del 9% en todas las concentraciones, sin diferencias significativas respecto el control negativo sin tratamiento, tanto en HDF como en HaCat (Figura 4.7). Además, existe en la bibliografía una publicación en colaboración con nuestro grupo que demuestra que un nanosistema constituido por una AuNPs de 12 nm conjugado a moléculas HASH de rangos comprendidos entre 5-15 kDa no presenta toxicidad en la línea 3T3 de fibroblastos (Di Guglielmo et al., 2012).

La exposición del GH sobre las tres cepas de Salmonella y la cepa de E. Coli no alteró la frecuencia espontánea de mutación (Tabla 4.3) evidenciando una significativa diferencia respecto al control positivo mutagénico (Figura 4.8). En los estudios de genotoxicidad consideramos esencial el uso de un control de AuNPs, pero debido a la fácil agregación de las AuNPs en solución salina y la pérdida de su dispersidad en medios biológicos, optamos por usar AuNPs-PEG (ver apartado 3.3.3). El ensayo del cometa se usó para investigar si el GH podía causar daños en el ADN de fibroblastos (HDF) y

queratinocitos (HaCat) humanos. El GH y las AuNPs se estudiaron a una concentración de 100 ppm (concentración 3X). A pesar de que la sal de oro induce daños en el ADN (Di Guglielmo et al., 2012), el GH no indujo daños en el ADN en ninguna de las dos líneas celulares testadas; las AuNPs-PEG que fueron usadas como control de AuNPs (Figura 4.9) tampoco mostraron daño en el ADN, como era de esperar (Liu, 2007).

Los estudios *in vitro* demostraron que el GH no disminuye la viabilidad celular; además, no causa efectos mutagénicos ni genotóxicos. Por lo tanto, los resultados presentados aquí muestran que el GH no es citotóxico, ni mutagénico ni genotóxico, avalando estudios previos realizados con nanopartículas de oro (Lopes et al., 2012 & Wang et al., 2012). Por tanto, se concluyó que el GH era seguro para seguir adelante con los estudios como posible ingrediente activo en dermocosmética.

### 5.3 Seguridad *ex vivo*

Cuando se pretende aplicar un nuevo activo en la piel, una de las primeras pruebas a realizar será determinar si el activo podrá en primer lugar penetrar la piel y cuál de sus capas será capaz de alcanzar, y en segundo lugar si causará irritación de la piel. Además, incluso siendo un producto dermocosmético de aplicación exclusivamente tópica, la prueba de irritación ocular será necesaria debido a la posibilidad de exposición inadvertida a los ojos (Oilman, 1982).

#### 5.3.1 Absorción transdérmica

El estudio de la seguridad a través del test de absorción percutánea *ex vivo* fue descrito con detalle anteriormente (Bronaugh et al., 1982, 1991; Diembeck et al., 1999; ECETOC, 1993; Franz, 1975; Howes et al., 1996; Scott et al., 1992a) y ha demostrado ser una herramienta muy útil al evaluar la exposición sistémica de los ingredientes activos en desarrollo que irán destinados a aplicaciones dermocosméticas. Asegurar que la barrera de la piel (epidermis) mantiene su integridad, es un factor esencial en el desarrollo de cualquier producto dermocosmético, tal y como se especifica en la directriz del ensayo OCDE 428 (OCDE, París 2004).

Después de realizar el ensayo, los resultados obtenidos han confirmado que la recuperación del oro de la solución de GH (100 ppm) en las 6 celdas fue aceptable ( $89,84 \pm 3,08$  ppm). Parece que no se produjo ninguna pérdida apreciable del GH durante el desarrollo del ensayo. Un exceso de oro quedó en la superficie de la piel después de un tiempo de exposición de 24 horas (aproximadamente un 88% de la solución de GH).

El contenido de oro encontrado en el estrato córneo fue del 1,81% ( $2,30 \text{ ng} / \text{cm}^2$ ). En cuanto a la epidermis y la dermis, el contenido de oro es  $0,32 \pm 0,25$  y  $0,11 \pm 0,11 \text{ ng} / \text{cm}^2$ , respectivamente ( $0,25 \pm 0,20\%$  y  $0,09 \pm 0,08\%$  de la dosis aplicada). No se detectaron trazas de oro en el líquido receptor durante el proceso de absorción.

En términos globales, la cantidad de oro absorbida percutáneamente (considerando los compartimentos de la epidermis, la dermis y el líquido receptor) fue del  $0,43 \pm 0,27$  ng / cm<sup>2</sup> o  $0,34 \pm 0,21\%$  de la dosis aplicada.

La mayor parte del oro de la solución de GH permaneció en la superficie de la epidermis debido a las importantes características de la función barrera del estrato córneo. Sin embargo, una cierta cantidad de oro fue capaz de penetrar en el estrato córneo. Debemos tener en cuenta que el producto fue testado sin ser mezclado con una formulación que puede favorecer la penetración a la epidermis.

### **5.3.2 Test de irritación HET-CAM**

En la mayoría de los casos, la aceptación de HET-CAM por las autoridades nacionales está relacionada con la identificación de irritantes oculares graves. Además, la prueba HET-CAM es una técnica ampliamente establecida y utilizada para fines de cribado dentro de la industria cosmética. La principal preocupación en el desarrollo de un nuevo cosmético es la tolerancia de la piel, especialmente cuando se usan nuevos sistemas de administración como nanopartículas (Somasundaran et al., 2007). Aunque el componente que las recubra sea biodegradable (como el HA), se debe evaluar su tolerabilidad y toxicología (Souto et al., 2007).

Como consecuencia, la prueba HET-CAM puede considerarse una alternativa que está conduciendo a una reducción de experimentos con animales. Sin embargo, aunque se reconoce ampliamente que la gama de criterios de evaluación cubiertos por la prueba ocular de conejo Draize (Draize et al., 1944), no puede ser reemplazada por ninguna prueba *in vitro* única, hoy en día hay una mayor aceptación reguladora de la prueba HET-CAM gracias al establecimiento de protocolos de trabajo estandarizados, así como a la incorporación de criterios estandarizados de validación, como por ejemplo la inclusión de controles internos de referencia conocidos (Steiling et al., 1994; Hagino et al., 1999),

para desarrollar un método de puntuación objetiva, en lugar de utilizar el método subjetivo actual (Christian et al., 1999).

El GH es un ingrediente activo de tamaño nanométrico en una solución salina que tiene un pH compatible con la aplicación cutánea. La estabilidad del GH favorece el desarrollo del ensayo de seguridad *in vitro* HET-CAM, sustituyendo, entonces, los ensayos en animales para cosméticos. Se analizó la solución de GH que contenía nanopartículas esféricas de oro, conjugadas a moléculas de HA. El ensayo HET-CAM demostró que la solución de GH que contenía citrato trisódico dihidratado, ácido cloroáurico y hialuronato sódico presentaba un potencial detectable de irritación ocular dentro de los parámetros aceptables de ingredientes activos destinados a dermocosmética (Draize et al., 1944). Con una puntuación final de 10, el GH se situó en el grupo de productos cosméticos irritantes en la membrana corioalantoidea de huevos embrionados de gallina, representados en el 40% del total de ingredientes activos del mercado. No obstante, el HA no presenta irritación por sí mismo (McKenzie et al., 2015) ni las nanopartículas tampoco muestran signos de irritación (Araújo et al., 2009), de modo que la irritabilidad de GH puede ser debida al citrato trisódico dihidratado en solución y no al nanosistema en sí mismo. Además, al añadir sólo un pequeño porcentaje de activo (GH) en la formulación final, la irritación producida por la sal desaparece.

La seguridad quedó garantizada por las pruebas *ex vivo* tanto en el ensayo de absorción transdérmica como en el ensayo de irritabilidad ocular, ya que los resultados obtenidos estuvieron dentro de los parámetros establecidos por la regulación vigente. De manera que los posteriores ensayos de irritación cutánea en voluntarios pudieron llevarse a cabo sin riesgo potencial de irritación o sensibilización con la finalidad de evaluar la compatibilidad cutánea del GH.



#### 5.4 Eficacia *in vitro*

El HA es muy abundante en la piel humana y representa el 50% del HA total del cuerpo (Juhlin, 1997; Tzellos et al., 2009). La expresión génica del HA en la piel está regulada por HAS-1 y HAS-2 en la dermis y HAS-2 y TGF- $\beta$ 1 en la epidermis (Wilkinson et al., 2004), lo que indica que hay una regulación diferencial en función del estrato y por lo tanto la función del HA es diferente en la dermis y la epidermis (Stuhlmeier & Pollascheck, 2004; Stern & Maibach, 2008).

Tanto en HDF como HaCat, HAS-2 es la isoforma predominante que proporciona la maquinaria sintética del HA a nivel dérmico (Tammi et al., 2005). La síntesis y acumulación de HA de tamaño intermedio en la dermis y epidermis estimula la respuesta migratoria y proliferativa de los HaCat, que junto a los HDF, cooperan en la cicatrización de heridas (Karvien et al., 2003). Además, se ha demostrado que la expresión de HAS-2 aumenta significativamente después de una lesión cutánea, lo que conduce a un incremento de la síntesis de HA epidérmico (Tammi et al., 2005). También se ha demostrado *in vitro* que los HDF son los responsables mayoritarios de regular la síntesis de colágeno dérmico, en cooperación con los HaCat (Gessin et al., 1993).

Existen evidencias de que tanto el envejecimiento de los fibroblastos celulares como la estimulación defectuosa en el tejido envejecido contribuyen a la reducción de la síntesis de HA y colágenos 1 y 3 en la piel. No obstante, hay evidencias de que puede ser, al menos en parte, reversible ya que se ha demostrado que agentes tales como el ácido retinoico pueden estimular la producción de HA y colágeno en la piel envejecida (Varani et al., 2006). Por lo tanto, la respuesta de HDF y HaCat debe ser objetivo de estudio para mejorar la hidratación y estimular el rejuvenecimiento de la piel (Pienimaki et al., 2001). Por ese motivo, en la presente tesis estudiamos la eficacia del GH en HDF y HaCat a fin de evaluar su potencial efecto *in vitro*.

En primer lugar, evaluamos la migración celular de los HDF y HaCat a través del ensayo de la herida (ver apartado 3.5.1). Los resultados obtenidos al incubar los HDF y HaCat con dos soluciones de GH (3% y 10%) y compararlos con los resultados obtenidos al tratar con dos soluciones de HA comercial (3% y 10%) se resumen en las Figuras 4.10 y 4.11. Tras 12 horas de incubación, los HDF tratados con un 3% de HA migraron un 34,05% mientras que los HDF tratados con GH al 3% migraron un 79,11%. El HA al 10% estimuló la migración de HDF un 49,04% mientras que el GH al 10% produjo una migración de HDF del 86,75%. En paralelo estudiamos el efecto del HA al 3% en HaCat y produjo una migración del 38,78% respecto al 87,12% del tratamiento con GH al 3%. El efecto del HA al 10% en HaCat fue del 57,60 mientras que al ser tratados con una solución de GH al 10% la migración fue del 94,65%. El HA produjo una clara respuesta migratoria en HDF y HaCat, no obstante, el GH mostró una eficacia muy superior a la del HA comercial. Si bien estos datos fueron sorprendentes, corroboraron la teoría de Karvien et al., (2003).

En segundo lugar, evaluamos el posible potencial proliferativo del GH en HDF y HaCat (ver apartado 3.5.2). HDF y HaCat se trataron con cuatro soluciones de GH al 1%, 3%, 5% y 10% y se compararon con cuatro soluciones que contenían el mismo porcentaje de HA comercial (Figura 4.12). Las diferencias, entre el control de HA y el tratamiento con GH fueron claramente significativas en ambas líneas celulares. En HDF, un 2,3% frente a un 16,3% fue el porcentaje de proliferación de los HDF tratados con HA 1% y GH 1% respectivamente. Los tratamientos al 3% fueron del 5,7% para el HA y 23,9% para el GH. Un 9,6% respecto a un 26,6% fue el porcentaje de proliferación de los HDF tratados con HA 5% y GH 5% respectivamente. Finalmente, el tratamiento de los HDF al 10% produjo un 14,5% de proliferación en el tratamiento con HA y un 30,2% de proliferación en el tratamiento con GH. La proliferación de los HaCat fue también muy diferenciada según su tratamiento. El porcentaje de proliferación fue del 0,9% para el tratamiento de HA al 1% y del 10,8% para el tratamiento con GH al 1%. Cuando el tratamiento fue del 3%, el HA produjo un porcentaje de proliferación del 1,5% mientras que el GH al 3% dio un porcentaje de proliferación del 19.5%.

Obtuvimos un 2,2% de proliferación al tratar los HaCat con una solución al 5% de HA mientras que al tratarlos con una solución de GH al 5%, el porcentaje de proliferación fue del 30,6%. Finalmente, cuando tratamos los HaCat con un 10% de HA obtuvimos un 3,2% de proliferación celular mientras que el tratamiento con un 10% de GH produjo un porcentaje de proliferación celular del 44,1%. Una vez más, los datos obtenidos confirmaron la teoría de Karvien et al., (2003). El HA produjo una clara respuesta proliferativa en HDF y HaCat; no obstante, el potencial del GH quedó demostrado una vez más con una eficacia muy superior a la del HA comercial.

Finalmente, comparamos el nivel de expresión génica de HAS2 en HDF y HaCat, COL 1, COL 3 y Elastina en HDF tras 24 y 48 horas de incubación con HA y GH al 3% y 10% respectivamente (ver apartado 3.5.3). La expresión de HAS 2 en HDF tras 24 horas de tratamiento con HA al 3% fue del 5,8% frente al 26,0% del GH al 3%; en cambio, la expresión de HAS 2 en HDF tras tratarlos 24 horas con HA al 10% fue del 32,8% mientras que tras tratarlos con GH al 10% la expresión subió al 76%. A las 48 horas, la expresión de HAS 2 fue del 17,3% en las células tratadas con HA 3% mientras que las células tratadas con GH al 3% mostraron una expresión del 32,8%. El tratamiento con HA al 10% tras 48 horas produjo un nivel de expresión génica del 66,2% mientras que el GH al 10% produjo un nivel de expresión génica del 86,7%.

La expresión de COL 1 en HDF a las 24 horas fue del 6,7% para el tratamiento con HA al 3% y 42,5% para el tratamiento con GH al 3%. El HA al 10% produjo una expresión del 33,5% frente al 96% del GH al 10%. A las 48 horas, el tratamiento de HA al 3% produjo una síntesis de COL 1 del 14,8% frente al 66,5% del GH al 3%, mientras que el HA al 10% produjo una expresión del 46,8% el GH al 10% produjo una expresión del 132%.

La expresión del COL 3 a las 24 horas fue del 27,8% para el HA al 3% mientras que el GH al 3% tuvo un nivel de expresión del 88,7%. El HA al 10% tuvo una expresión del 52,8% frente al 129,3% del GH al 10%. A las 48 horas de tratamiento, el HA al 3% produjo una expresión génica del 34,4% frente al 93,1% del GH al 3%. El HA al 10% mostró un nivel de expresión de COL 3 del 93,1% frente al 146,3% del GH al 10%.

La expresión de Elastina en HDF tras 24 horas de tratamiento fue del 4,9% para el HA al 3% frente al 28,6% del GH al 3%. Estos valores se vieron incrementados al tratar con HA al 10%, con un nivel de expresión génica del 8,5% frente al 36,2% del GH al 10%. Al tratar las células 48 horas, el nivel de expresión del HA al 3% subió al 16,7% frente al 55,7% del GH al 3%, mientras que el HA al 10% mostró un 21,4% frente al 64,3% del GH al 10%.

El nivel de expresión génica de HAS 2 en HaCat tras 24 horas de tratamiento fue del 103,2% frente al 132,6% del GH 3%, mientras que el HA al 10% mostró un nivel de expresión de HAS 2 del 109,3% frente al 147,3% del GH al 10%. Tras 48 horas de incubación, la expresión génica de HAS 2 en HaCat fue del 105,4% para HA al 3% frente al 150,39% del GH al 3%; la expresión del HA al 10% fue del 117,6% frente al 180,2% del GH al 10%. Los datos obtenidos confirmaron la teoría de Karvien et al., (2003) y aunque el HA produjo un aumento evidente en la síntesis de Has2, COL 1, COL 3 y Elastina en HDF el GH superó significativamente los niveles de expresión del HA. De la misma manera que en HaCat vimos un estímulo evidente al tratar con HA, el potencial del GH quedó nuevamente demostrado con una eficacia muy superior a la del HA comercial.

## 5.5 Estudio de seguridad en voluntarias: Patch Test

Las AuNPs son cada vez más utilizadas en tratamientos de belleza y cosméticos antiedad. En 2010, se demostró a través de un ensayo in vitro que las AuNPs aplicadas en una mascarilla facial antiarrugas maximizaba el contacto del ingrediente activo con la piel (Fathi-Azarbayjani et al., 2010). Actualmente son muchas las marcas que han lanzado al mercado cremas antiarrugas y regeneradoras con nanopartículas de oro.

A pesar de la baja toxicidad inherente de las nanopartículas de oro (Connor et al., 2005), McKenna et al., (1995) realizó un estudio Patch-Test a 278 pacientes sospechosos de tener dermatitis de contacto con las AuNPs. El 4,6% tuvieron respuesta alérgica positiva. Los pacientes fueron mujeres, con una edad media de 37 años. La zona del cuerpo donde se produjo esta respuesta fue la cabeza y el cuello (62%). La distribución seborreica del eccema fue frecuente. El 46% tuvo afectación de las extremidades, el 15% tuvo erupciones en la zona perianal o perivulvar. La duración media del eccema en este grupo de pacientes fue de 15,8 meses. El 54% de los pacientes alérgicos al oro también fueron alérgicos al níquel. La alergia al oro es frecuente en pacientes con dermatitis eccematosa, produciéndose aproximadamente en el 10% de los pacientes sometidos al Patch-Test (Ahnlide et al., 2000).

En esta tesis se realizó un estudio de seguridad en 23 voluntarios sanos que fueron sometidos al tratamiento con GH (ver apartado 3.6.1). Pasados los primeros 15 minutos de la aplicación del parche con 160 mg de GH, se revisaron los síntomas de cada voluntario y ninguno tuvo respuesta alérgica positiva. El estudio se prolongó durante 24 horas y transcurrido ese tiempo los voluntarios se volvieron a revisar y ninguno tuvo respuesta alérgica positiva. Por lo que el estudio concluyó con un 0% de voluntarios reactivos a la exposición del GH durante 24 horas, dato que permitió avanzar con los estudios de eficacia en voluntarios (Tabla 4.7).

## 5.6 Eficacia en voluntarias

### 5.6.1 Estudio anti-edad

El ácido hialurónico (HA) desempeña un papel vital en la síntesis de moléculas de matriz extracelular y en la interacción de las células epidérmicas con el entorno circundante. Además, el HA modula la inmunidad celular evitando infecciones e impidiendo los fenómenos alérgicos. Una de sus propiedades más importantes es que puede sujetar y mantener grandes cantidades de humedad, aproximadamente 1 litro de agua en sólo 1 gr, por eso se dice que el HA podría convertirse en la solución definitiva para la retención de humedad de la piel. La piel joven está hidratada porque contiene grandes cantidades de HA en la dermis. Sin embargo, cuando llegamos a la edad adulta, esta cantidad disminuye un 5% su producción basal y a medida que envejecemos, la cantidad de HA en la piel disminuye progresivamente (Balzana et al., 1984).

Hasta hace poco, los métodos invasivos, como la biorrevitalización y la mesoterapia, se consideraban la única forma de liberar HA a través de la barrera cutánea. Pero científicos japoneses (Forlle'd Laboratories) lograron reducir el tamaño molecular del HA comercial de 3.000 nm a 5nm, sin alterar su estructura de subunidades constituyentes y permitiéndole atravesar la barrera de la piel profundamente en el nivel dérmico. Esto se midió y verificó aplicando el análisis de espectrometría de masas. Al confirmar que el tamaño del HA era nano y que físicamente podría penetrar en la piel, se realizó un estudio con voluntarios para verificar la eficacia del producto en seres humanos (Manjula et al., 2014). Actualmente hay numerosos productos que reivindican efectos rejuvenecedores o anti-edad en el mercado que llevan oro, nanopartículas de oro o ácido hialurónico, pero no hay datos publicados de productos cosméticos basados en nanopartículas de oro funcionalizadas con moléculas orgánicas. Es por eso que el ensayo llevado a cabo con las dos formulaciones de GH (sérum y crema) han sido pioneros en el estudio de la eficacia anti-edad de un producto con nanopartículas de oro funcionalizadas.

Tras completar la parte experimental del estudio y analizar los datos obtenidos, los resultados de hidratación de la piel obtenidos tras la aplicación del sérum y la crema fueron sorprendentes teniendo en cuenta que sólo el 3% de su composición corresponde al ingrediente activo GH (concentración de HA del 0,05%). Se produjo una mejora claramente visible de la firmeza de la piel tras 28 días de aplicación y se obtuvo una mejora significativa de la hidratación del 15,64% que contrasta con los resultados obtenidos en el estudio de Manjula et al., (2014) con una mejora significativa que se empezó a producir tras 54 días de aplicación o con el producto *Hyaluronic Acid Intensifier* (SkinCeuticals, 2017), con una mejora del 11% tras 12 semanas de estudio y una concentración de HA del 1,3%.

Por lo que respecta a los resultados de la textura de la piel, se produjo una reducción promedio del 5,25% en la rugosidad de la piel (altura promedio de las arrugas), considerándose un buen resultado para un producto de rejuvenecimiento. Se produjo una reducción del 21,89% de la profundidad máxima de las arrugas, este resultado es realmente infrecuente y revela que una profunda reestructuración de la piel estuvo teniendo lugar en comparación con el 18% de reducción con el *Hyaluronic Acid Intensifier* tras 12 semanas de tratamiento. Esto además se confirma con los resultados del volumen de las arrugas con una reducción del 24,69% tras los 28 días de tratamiento, claramente excepcional si lo comparamos con el producto estrella de SkinCeuticals con una reducción del volumen de arrugas del 23% tras 12 semanas de tratamiento. Acompañado con una reducción del área y la circunferencia de las arrugas del 6,91% y 12,11% respectivamente; así como una reducción en el promedio de la profundidad máxima de las arrugas del 9,36% y una reducción del 7,03% de altura media de las arrugas.

La explicación de estos resultados, sin embargo, radicó en los impresionantes resultados obtenidos en el análisis por ultrasonido. Obviamente, dadas las mejoras observadas en la rugosidad, se esperaba un aumento de la matriz extracelular, especialmente en la epidermis, ya que las AuNPs no pueden alcanzar la dermis. Este dato se confirmó con un notable aumento del 30,04% en la densidad epidérmica. No obstante, la verdadera sorpresa se produjo al obtener un aumento del 37,40% en la densidad dérmica en comparación con el 9% obtenido con el *Hyaluronic Acid Intensifier*. Con estos buenos resultados en la densidad dérmica, se evidenció que las mejoras observadas en la reducción de la rugosidad no vinieron únicamente de un fortalecimiento de la epidermis. Esta síntesis de la matriz extracelular dérmica, principalmente HA y colágeno, se activó por alguna vía de señalización desencadenada en la epidermis y tuvo el potencial de alcanzar la dermis (Babu & Wells, 2001).

Estos datos no indican un aumento del 30,04% y 37,40% de HA, colágeno y elastina en la epidermis y la dermis, sino un aumento en la densidad ecogénica. El HFUS es una técnica semicuantitativa, pero estos resultados ponen en perspectiva el potencial que muestran estas ganancias y evidencian un proceso de reestructuración en la piel. Sin embargo, fue inesperado que el grosor de la piel se mantuvo estable en la epidermis con un aumento del 2,13% y disminuyó en la dermis con una reducción del 4,95%. Aunque no aumentó el grosor de las capas, el aumento de la matriz extracelular desencadenó una reorganización y un relleno interno que produjeron cambios evidentes externamente. Estos resultados hacen del GH un prometedor candidato como nuevo estándar antiedad a base de oro cosmético funcionalizado.

### **5.6.2 Estudio anticelulítico**

Los resultados obtenidos anteriormente hacían sospechar que la extraordinaria reorganización y relleno de la dermis y epidermis podría ayudar a reducir la visibilidad de los hoyuelos producidos por la celulitis.



Tras revisar los estudios publicados sobre nanopartículas, está claro que las nanopartículas tienen el potencial de administrar eficazmente agentes activos a través de la barrera cutánea. Los liposomas convencionales, liposomas flexibles, etosomas, niosomas y liposomas ultradeformables, etc. ofrecen un valioso potencial como sistemas de administración dérmica y transdérmica de fármacos además de otras nanopartículas (Verma & Pathak, 2010). Suptijah et al., (2015) demostró *in vitro* que se podía combatir la celulitis interfiriendo con la función de barrera del estrato córneo utilizando nanopartículas de quitosano funcionalizadas con sustancias activas como la cafeína; sin embargo, no hay datos publicados a día de hoy con un ensayo anticelulítico en voluntarios con un producto cosmético basado en nanopartículas de oro funcionalizadas con moléculas orgánicas. Es por ese motivo que los estudios llevados a cabo con la formulación que contenía un 3% de GH han sido pioneros en el estudio de la eficacia anticelulítica de un producto con nanopartículas de oro funcionalizadas.

Una vez completada la parte experimental del estudio y realizado el análisis de los datos, los resultados obtenidos fueron muy prometedores. El análisis del peso corporal mostró que no hubo cambios significativos en ninguna de las voluntarias durante el período de tiempo que duró el estudio, eliminando un posible cofactor que podría afectar en los resultados, ya que, al disminuir el peso, podría disminuir la celulitis. Además, el peso corporal fue una de las medidas clave que sirvieron para determinar si las voluntarias habían seguido las directrices establecidas en el inicio del estudio de no cambiar sus hábitos deportivos ni alimentarios. Cualquier pequeño cambio en sus hábitos diarios podrían haber alterado los resultados del estudio. Así mismo, la circunferencia del muslo fue el otro parámetro que se evaluó a fin de determinar que las voluntarias del estudio estaban siguiendo las indicaciones relativas a cualquier tratamiento de adelgazamiento y los datos obtenidos fueron casi idénticos al final del estudio en comparación con la medición del inicio, demostrando que las voluntarias del estudio respetaron las condiciones del protocolo de estudio preestablecidas.

Al tratarse de un estudio doble ciego, ni las voluntarias ni los investigadores que realizaban el estudio conocían qué fórmula contenía el GH y qué fórmula contenía el HA. Tras finalizar el estudio y analizar los resultados obtenidos, el promotor (Endor Nanotechnologies) desveló que tras la formulación A se encontraba la crema con GH y tras la formulación B se encontraba el placebo.

El objetivo principal de las imágenes fue mostrar de manera gráfica qué lado se trató con GH y qué lado se trató con el control de HA. El análisis 3D de los hoyuelos mediante la técnica FOITS dio unos resultados sobresalientes, no sólo porque las tres variables principales (volumen, circunferencia y área) dieron una clara diferencia significativa en el lado tratado con la formulación A (GH), mientras que el tratamiento con la formulación B (HA) permaneció sin cambios, sino también debido a la magnitud de los cambios. Una reducción promedio del 31,1% en el volumen de los hoyuelos se considera una gran reducción, más aún tras haber realizado el seguimiento del peso y del perímetro del muslo, confirmándonos que no hubo efecto de adelgazamiento relacionado con el mismo que pudiera justificar tal disminución. Además, el volumen de los hoyuelos fue una variable fácil de captar y permitió una visualización muy rápida del tipo de mejora de la piel experimentada por las voluntarias. Algunas voluntarias lograron reducciones de volumen de hoyuelos por encima del 70%.

Al valorar en conjunto los resultados del área y la circunferencia de los hoyuelos, se observó que la aplicación de la formulación A, con GH, tenía un mayor efecto reafirmante en comparación con la formulación B, con HA. Cabe destacar que los resultados de la circunferencia de los hoyuelos mostraron un efecto reafirmante generalizado de la piel causado por la formulación A (GH) con una disminución de la circunferencia superior al 17,4% en comparación con una disminución del 2,6% de la formulación B (HA). Además, el efecto obtenido con la formulación A (GH) en la disminución de la profundidad media de los hoyuelos, pero no en la profundidad máxima de los hoyuelos sugirió que la causa que originó los hoyuelos no había desaparecido, sino que había sido mitigada por algún proceso celular que aumentó la firmeza de la piel.

Teniendo en cuenta los resultados de la eficacia *in vitro* obtenidos con el GH y los resultados obtenidos en el estudio facial, el proceso celular seguramente estuvo relacionado con un aumento en la síntesis de colágeno, ácido hialurónico y otros componentes de la matriz extracelular.

El análisis de la textura también fue muy exitoso ya que los tres parámetros probados (rugosidad media, variación media de la rugosidad y amplitud máxima del relieve de los hoyuelos) dieron resultados estadísticamente significativos. En este caso, los resultados obtenidos con la formulación A (GH) evidenciaron una reducción promedio de la rugosidad del 7% y con algunas voluntarias que incluso duplicaron ese dato superando el 14%, respecto a una reducción promedio de la rugosidad de 0,5% con la formulación B (HA).

No olvidemos que en este caso una mejora de la rugosidad no sólo indicó una mejora de las cualidades intrínsecas de la piel, sino también una reducción de la “piel de naranja” característica de la celulitis. La amplitud máxima del relieve fue quizás el parámetro más revelador en este aspecto, ya que reflejó una mejora en las estructuras rugosas más grandes, influyendo claramente en los valores promedio de la textura.

Los niveles basales de  $\beta$ -carotenos medidos en la piel de los muslos durante el inicio del estudio fue de 2, en promedio; valores sorprendentemente bajos considerando que la cantidad referenciada como aceptable era de 5. Esto hizo que el aumento experimentado en el lado tratado con formulación A (GH) fuera aún más importante en comparación con el lado tratado con la formulación B (HA). Sin embargo, el número final de antioxidantes fue modesto. No obstante, cabe destacar que los niveles de antioxidantes del lado tratado con la formulación B (HA) experimentaron una disminución durante el transcurso del estudio. El aspecto más destacable de estos resultados fue el aumento del 17,89% de la actividad antioxidante, estadísticamente significativo, que se demostró tras la aplicación de la formulación A (GH).

Los resultados obtenidos con la tecnología HFUS también fueron fundamentales para explicar y justificar los hallazgos generales de este estudio. El grosor epidérmico apenas varió durante el estudio, mostrando un leve incremento del 3,58% en la formulación A (GH) respecto a un 6,87% de la formulación B (HA). Además, el grosor dérmico disminuyó un 5,07% en la formulación A (GH) y un 4,88% en la formulación B (HA). Los resultados del grosor dérmico fueron sorprendentes ya que ambas fórmulas causaron una reducción del 5% estadísticamente significativa. Este dato sugirió que se estaba realizando un refuerzo mecánico a nivel interno responsable de la mejora de la textura que no afectó al grosor de la piel. El mecanismo fue, probablemente, un aumento en la síntesis de la matriz extracelular causada por los queratinocitos epidérmicos, que son el blanco natural de las nanopartículas de oro. Dadas las similitudes y paralelismos obtenidos, estos resultados no pueden atribuirse a las nanopartículas de oro ni al ácido hialurónico, sino a los ingredientes generales compartidos por las dos fórmulas. La causa de esa reducción es intrigante, ya que no afecta la hidratación de la piel; además, la piel de las piernas de las voluntarias se encontró en buenas condiciones durante el periodo de tiempo que duró el ensayo.

Los resultados de la densidad ecogénica epidérmica fueron moderados y no se demostró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre la densidad ecogénica epidérmica del lado de la formulación A (GH) con un aumento del 15,15% respecto a lado tratado con la formulación B (HA) con un aumento del 11,79%. Esto es clave al comparar los resultados con la densidad ecogénica dérmica del lado tratado con la formulación A (GH), con un aumento de 51,74% respecto al lado tratado con la formulación B (HA) con un aumento 21,12%. El aumento producido por la formulación B (HA), sin embargo, fue empíricamente importante a pesar de no ser estadísticamente significativo, y estos datos confirman lo que se viene reivindicando en la historia de la cosmética (Andre, 2004).

El uso tópico de los péptidos de HA en la formulación placebo produjo una leve remodelación de la matriz extracelular. Este efecto pudo estar ligado a la cantidad de péptidos de HA que se unieron a los receptores CD44 de los fibroblastos y queratinocitos, produciendo cascadas de señalización en la dermis e induciendo una discreta remodelación tisular. Este efecto, sin embargo, es mucho más potente cuando se combina con las nanopartículas de oro ya que logran una activación más potente de la matriz extracelular dérmica mientras permanecen en la epidermis. El mecanismo de esta activación sigue siendo parcialmente incierto a pesar de que algunas pruebas *in vitro* sugieren la intervención de un segundo mensajero en la activación de la vía de señalización. Esta síntesis de matriz redensifica fuertemente la dermis, tal y como se confirma en las biopsias analizadas, con incrementos del 25,9% de HA y 27,6% de colágeno, proporcionándole propiedades mecánicas mejoradas sin alterar su espesor. Esas propiedades mecánicas adquiridas permiten a la piel amortiguar parte de la reacción de empuje provocada por las protuberancias de grasa y tejido conectivo asociadas con la celulitis, logrando de este modo las mejoras observadas en la formulación A (GH) respecto la formulación B (HA).

Estos datos evidencian claramente el potencial de la formulación A con GH tras 28 días de tratamiento en comparación con los resultados publicados por Perín et al., (2000) tras realizar un ensayo de doble ciego con voluntarias durante dos meses utilizando un anticelulítico, que actualmente se comercializa por la marca de cosméticos Christian Dior. Después de dos meses de ensayo se consiguió un efecto anticelulítico del 30% y un efecto reafirmante del 3,4% frente a un efecto anticelulítico del 31,1% y reafirmante del 7,17% con la formulación que contenía el GH.

# CONCLUSIONES

---



## 6. CONCLUSIONES

### Caracterización fisicoquímica del GH.

La síntesis del GH puede realizarse de manera controlada y reproducible, obteniendo una solución estable en medios fisiológicos que contiene  $28,01 \pm 3,14$  ppm de Au en forma de nanoesferas y aproximadamente 1600 moléculas de HA por AuNP, potenciando los efectos del HA.

### Caracterización biológica del GH: viabilidad celular.

El GH no produce ningún efecto citotóxico en las células de la piel. Tampoco tiene efectos mutagénicos o genotóxicos, de manera que es un buen candidato para estudiar su potencial efecto cosmético.

### Seguridad *ex vivo* del GH.

Los estudios de seguridad *ex vivo* demuestran que el GH no es capaz de penetrar a capas profundas de la piel ni alcanzar el sistema vascular. Este dato es relevante ya que garantiza que el oro no alcanza órganos internos donde acumularse de manera indeseada. El GH no penetra en la dermis ni alcanza el sistema vascular, característica esencial para cualquier producto cosmético. No obstante, puede producir irritabilidad moderada en mucosas si es aplicado a una concentración del 100%, aspecto a tener en cuenta de cara a futuras aplicaciones cosméticas.



Eficacia *in vitro* del GH.

Los estudios de eficacia *in vitro* confirman el potencial del GH como ingrediente activo cosmético. El GH aumenta la síntesis *in vitro* de moléculas implicadas en la regeneración y el aspecto de la piel, como son el HA, el colágeno y la elastina.

Seguridad en voluntarios del GH.

El GH no produce ningún efecto irritante ni alergénico en la piel humana, característica imprescindible para el uso de este ingrediente en productos cosméticos. Este dato es muy relevante ya que permite enfocar de manera segura los estudios de eficacia con voluntarios.

Eficacia en voluntarios del GH.

Tras incorporar el GH como ingrediente activo de un sérum y una crema, los resultados obtenidos en los estudios antiedad facial demuestran el gran potencial del GH como nuevo estándar antiedad a base de oro cosmético funcionalizado, disminuyendo el volumen de las arrugas en un 24,69% y la rugosidad un 9,36%. Además, en el estudio anticelulítico se confirma nuevamente el gran potencial del GH dadas sus propiedades rejuvenecedoras y estimulantes de la matriz extracelular, capaces de enmascarar los signos típicos de la celulitis. El GH reduce el volumen de los hoyuelos un 31,1% y la circunferencia de los hoyuelos un 17,4%, aumenta el efecto antioxidante un 18%, incrementa el efecto reafirmante un 7,17% y redensifica la dermis un 52%.

Por ese motivo, al finalizar los estudios realizados en esta tesis, Endor Nanotechnologies ha lanzado al mercado la colección antiedad y anticelulítica *Y.en* [www.yen-effect.com/](http://www.yen-effect.com/)

El tratamiento completo constaba de una fase preliminar con una Base y una Mousse para proceder a una limpieza y asepsia profunda de la piel que permite la eficacia del tratamiento. La segunda parte, es el tratamiento en sí, que constaba de un sérum y una crema que actúan complementariamente sobre las células de la piel. Ambos productos llevan exactamente la misma concentración de ingrediente activo, la diferencia está en cómo cada producto lo libera en las células. El sérum penetra rápidamente en la piel y concentra todo el activo sobre las células en un breve espacio de tiempo. En cambio, la crema libera el activo en las células gradual y constantemente, manteniendo su acción durante horas.

El tratamiento anticelulítico está compuesto por una crema con un potente efecto antioxidante, que, además, regenera intensamente las capas internas de la piel, aumenta la densidad de la dermis y produce un efecto relleno que reduce los signos típicos de la celulitis.



# REFERENCIAS

---



---

## 7. REFERENCIAS

- Abella, M.L. (2006). Evaluation of anti-wrinkle efficacy of adenosine-containing products using the FOITS technique. *Int J Cosmet Sci*, 28(6):447-51.
- Acharya, C., Ghosh, S.K. and Kundu, S. (2008). Silk fibroin protein from mulberry and non-mulberry silkworms: cytotoxicity, biocompatibility and kinetics of L929 murine fibroblast adhesion. *J Mater Sci Mater Med*, 19(8): 2827-2836.
- Ahnlide, I., Björkner, B., Bruze, M., Möller, H. (2000). Exposure to metallic gold in patients with contact allergy to gold sodium thiosulfate. *Contact Dermatitis Journal*, 43(6):344-50.
- Alka, L., Anurag, V., Himanshi, J., Niti, Y., Neha, K. (2014). Nanotechnology-Based Cosmeceuticals. *ISRN Dermatology*. Review Article. Volume 2014 Article ID 843687, 14 pages
- Alkilany, A. M., & Murphy, C. J. (2010). Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *Journal of Nanoparticle Research : An Interdisciplinary Forum for Nanoscale Science and Technology*, 12(7), 2313–2333.
- Amoozgar, Z., & Yeo, Y. (2012). Recent advances in stealth coating of nanoparticle drug delivery systems. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 4(2), 219–233.
- Andre, P. (2004). Hyaluronic acid and its use as a "rejuvenation" agent in cosmetic dermatology. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 23(4):218-22.
- Araújo, J., Vega, E., Lopes, C., Egea, M. A., Garcia, M. L., and Souto, E. B. (2009). Effect of polymer viscosity on physicochemical properties and ocular tolerance of FB-loaded PLGA nanospheres. *Colloid Surface J*, 72, 48.
- Babu, M., Wells, A. (2001). Dermal-Epidermal Communication in Wound Healing. *Wounds*, 13. 183-189.
- Balasubramani, M., Kumar, T.R., Babu, M., 2001. Skin substitutes: a review. *Burns*, 27, 534-544.
- Balaza, E. A., Band, P. (1984). Hyaluronic acid: its structure and use. *Cosmetic and Toiletries*. 99:65–72.
- Bar-Ilan, O., Albrecht, R. M., Fako, V. E., & Furgeson, D. Y. (2009). Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Small Weinheim an Der Bergstrasse, Germany*, 5, 1897–1910.

- Basten, Fred E. (2008). *Max Factor: The Man Who Changed the Faces of the World*. Nueva York: Arcade Publishing. ISBN, 978-1-55970-875-3.
- Bateman T. (1836). *A Practical Synopsis of Cutaneous Diseases*. Philadelphia: Collins and Croft, p.24.
- Bennett, R.G. (1988) Selection of wound closure materials. *J Am Acad Dermatol*, 18(4): 619-637.
- Bhattacharya, R., & Mukherjee, P. (2008). Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11), 1289–306.
- Bleeker, EA., de Jong, WH., Geertsma, RE., Groenewold, M., Heugens, EH., Koers-Jacquemijns, M., Van de Meent, D., Popma, JR., Rietveld, AG., Wijnhoven, SW., Cassee, FR., Oomen, AG. (2012). Considerations on the EU definition of a nanomaterial: science to support policy making. *Regul Toxicol Pharmacol*. 65(1):119-25.
- Bodet, D., Reynoso, I., Carcamo, A. (2008). Checking in human of the skin compatibility of a test product. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 651-660.
- Bronaugh, R.L., Collier, S.W. (1991). Protocol for in vitro percutaneous absorption studies. In: Bronaugh, R.L., Maibach, H.I. (Eds.), *In Vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*. CRC Press, Boca Raton, 237–241.
- Bronaugh, R.L., Stewart, R.F., Congdon, E.R. (1982). Methods for in vitro percutaneous absorption studies 1. Animals models for human skin. *Toxicology of Applied Pharmacology*, 62, 481–488.
- Bulkley, L. D. (1898). *Manual of Diseases of the Skin*. 4th ed. New York: GP Putnam's Sons, p. 1.
- Burgess TH. (1846). *Manual of diseases of the skin: From the French of MM Cazenave and Schedel with notes and additions*. New York: J and HG Langley, p. 1.
- Cai, S., Xie, Y., Bagby, T., Cohen, M., & Forrest, M. (2008). Intralymphatic chemotherapy using a hyaluronan–cisplatin conjugate. *Journal of Surgical Research*, 147(2), 247–252.
- Cai, W., Gao, T., Hong, H., & Sun, J. (2008). Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnology, Science and Applications*, (1), 17–32.
- Chen, Y.-S., Hung, Y.-C., Liao, I., & Huang, G. S. (2009). Assessment of the In Vivo Toxicity of Gold Nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 4(8), 858–864.

- Cho, E. C., Xie, J., Wurm, P. A., & Xia, Y. (2009). Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a I2/KI etchant. *Nano Letters*, 9, 1080–1084.
- Cho, W.-S., Cho, M., Jeong, J., Choi, M., Cho, H.-Y., Han, B. S., Kim, S.H., Lim, Y.T., Chung, B.H., Jeong, J. (2009). Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236(1), 16–24.
- Cho, W.-S., Cho, M., Jeong, J., Choi, M., Han, B. S., Shin, H.-S., Hong, J., Chung, B. H., Jeong, J., Cho, M.-H. (2010). Size-dependent tissue kinetics of PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 245(1), 116–23.
- Chompoosor, A., Saha, K., Ghosh, P. S., Macarthy, D. J., Miranda, O. R., Zhu, Z.-J., Arcaro, K.F., Rotello, V. M. (2010). The role of surface functionality on acute cytotoxicity, ROS generation and DNA damage by cationic gold nanoparticles. *Small*, 6(20), 2246–9.
- Christian, M. S., Parker, R. M., Hoberman, A. M., Diener, R. M., Api, A. M. (1999). Developmental toxicity studies of four fragrances in rats. *Toxicol Lett.* 20;111(1-2):169-74.
- Clark, R., Ghosh, K., Tonnesen, M., 2007. Tissue engineering for cutaneous wounds. *Journal of Investigative Dermatology*, 127, 1018-1029.
- Collin, B., Rouach, D. (2009). Pearson Education France, ed. Le modèle l'Oréal: les strategies clés d'une multinationale française.
- Connor, E. E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C. J., & Wyatt, M. D. (2005). Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small Weinheim an Der Bergstrasse, Germany*, 1, 325–327.
- Cosmetics & Toiletries Market Overviews (2014). Database on the Internet. [http://www.export.gov/hongkong/build/groups/public/@eg\\_hk/documents/webcontent/eg\\_hk\\_089943.pdf](http://www.export.gov/hongkong/build/groups/public/@eg_hk/documents/webcontent/eg_hk_089943.pdf).
- Crisan, D., Lupsor, M., Boca, A., Crisan, M., Badea, R. (2012). Ultrasonographic assessment of skin structure according to age. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 78(4):519.
- Crissey JT, Parish LC. (1998). Two hundred years of dermatology. *J Am Acad Dermatol*, 39:1002–6.
- Dall'oglio F, Tedeschi A, Fabbrocini G, Veraldi S, Picardo M, Micali G. (2015). Cosmetics for acne: Indications and recommendations for an evidence-based approach. *G Ital Dermatol Venereol*, 150:1–11.



- Daniel, M.-C., & Astruc, D. (2004). Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews*, 104(1), 293–346.
- Das, S., Debnath, N., Mitra, S., Datta, A., & Goswami, A. (2012). Comparative analysis of stability and toxicity profile of three differently capped gold nanoparticles for biomedical usage. *Biometals*, 25(5), 1009–22.
- Desai, P., Patlolla, R., Singh, M. (2010). Interaction of nanoparticles with the skin. *Mol Membr Biol*, 27(7):247–259.
- Di Guglielmo, C., De Lapuente, J., Porredon, C., Ramos-López, D., Sendra, J., & Borràs, M. (2012). In vitro safety toxicology data for evaluation of gold nanoparticles-chronic cytotoxicity, genotoxicity and uptake. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 12(8), 6185–6191.
- Diamond, M. P., Burns, E. L., Accomando, B., Mian, S., & Holmdahl, L. (2012). Seprafilm(®) adhesion barrier: (2) a review of the clinical literature on intraabdominal use. *Gynecological Surgery*, 9(3), 247–257.
- Diembeck, W., Beck, H., Benech-Kieffer, F., Courtellemont, P., Dupuis, J., Lovell, W., Paye, M., Spengler, J., Steiling, W. (1999). Test Guidelines for in vitro assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 191–205.
- Doane, T. L., & Burda, C. (2012). The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2885–911.
- Dobrovolskaia, M. A., & McNeil, S. E. (2007). Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature Nanotechnology*, 2, 469–478. doi:10.1038/nnano.2007.223
- Draelos ZD. (2000). Colored facial cosmetics. *Dermatol Clin*, 18:621–31
- Draelos ZD. (2009). Cosmeceuticals: Undefined, unclassified, and unregulated. *Clin Dermatol*, 27:431–4.
- Dreno B, Bensadoun RJ, Humbert P, Krutmann J, Luger T, Triller R. (2013). Algorithm for dermocosmetic use in the management of cutaneous side-effects associated with targeted therapy in oncology. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 27:1071–80.
- Duncan, R., & Gaspar, R. (2011). Nanomedicine(s) under the microscope. *Molecular Pharmaceutics*, 8(6), 2101–41.
- ECETOC (1993). Percutaneous Absorption. *European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brussels*. Monograph No.20.

- Elenitsas, R., Halpern, A. (1997). Biopsy techniques. *Lever's histopathology of the skin*, p. 3-4.
- ESF (2005). A report of European Science Foundation Policy Briefing. Scientific forward look on nanomedicine. <http://www.nanopharmaceuticals.org/files/nanomedicine.pdf>
- Etheridge, M. L., Campbell, S. a, Erdman, A. G., Haynes, C. L., Wolf, S. M., & McCullough, J. (2013). The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9(1), 1–14.
- Everett, M., Alibert, J. L. (1984). The father of French dermatology. *Int J Dermatol*, 23:351–6.
- Fadeel, B., & Garcia-Bennett, A. E. (2010). Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(3), 362–74.
- Fathi-Azarbayjani, A., Qun, L., Chan, Y. W., Chan, S. Y. (2010). Novel vitamin and gold-loaded nanofiber facial mask for topical delivery. *AAPS PharmSciTech*, 11(3):1164-70.
- Finkelstein, A. E., Walz, D. T., Batista, V., Mizraji, M., Roisman, F., & Misher, A. (1976). Auranofin. New oral gold compound for treatment of rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 35, 251–257.
- Fishburn, C. (2008). The pharmacology of PEGylation: balancing PD with PK to generate novel therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1–17.
- Fitzpatrick TB. (1988). The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I through VI. *Arch Dermatol*, 124:869–871.
- Franz, T. J. (1975). Percutaneous absorption- on the relevance of in vitro data. *Journal of Investigative Dermatology*, 64, 190–195.
- Frenk, E. (1995) Treatment of melasma with depigmenting agents. *Melasma: New Approach Treat*, p. 9 - 15.
- Gessin, J., Brown, L., Gordon, J., Berg, R. (1993). Regulation of collagen synthesis in human dermal fibroblasts in contracted collagen gels by ascorbic acid, growth factors, and inhibitors of lipid peroxidation. *Experimental Cell Research Journal*, (2):283-90.
- Gold, M. (2009). The science and art of hyaluronic acid dermal filler use in esthetic applications. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 8(4), 301–307.

- Goldman L, Moraites R. S., Kitzmiller K. W. (1966). White spots in biblical times. A background for the dermatologist for participation in discussions of current revisions of the bible. *Arch Dermatol*, 93:744–53.
- Goodman. (2004). Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate chem*, 15, 897–900.
- Gu, Y.-J., Cheng, J., Lin, C.-C., Lam, Y. W., Cheng, S. H., & Wong, W.-T. (2009). Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 237, 196–204.
- Hagino, S., Kinoshita, S., Tani, N., Nakamura, T., Ono, N., Konishi, K., Iimura, H., Kojima, H., Ohno, Y. (1999). Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (2) Chorioallantoic membrane (CAM) test. *Toxicology in vitro*, 13(1); 99-113.
- Heather-Herd, G., Holt-Casper, D., Grainger, D., Ghandehari, H. (2015). Nanoparticle uptake: the phagocyte problem. *Nano Today*, 10(4): 487–51.
- Hedman K., Kurkinen M., Alitalo K., Vaheri A., Johansson S., Höök M. (1979). Isolation of the pericellular matrix of human fibroblast cultures. *J. Cell Biol*, 81:83.
- Higby, G. J. (1982). Gold in medicine: a review of its use in the West before 1900. *Gold Bulletin*, 15(4), 130–40.
- Highet, A., Champion, R. (1980). Skin biopsy. *British Medicine Journal*. 280, p. 1259-1260.
- Hillyer, J. F., & Albrecht, R. M. (2001). Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90, 1927–1936.
- Holubar K., Wallach D. (1999). History of dermatology: A bicentennial perspective. *Dermatology in General Medicine*. 5th ed. New York: McGraw-Hill, p. 5–7.
- Howes, D., Guy, R., Hadgraft, J., Heylings, J.R., Hoek, U., Kemper, F., Maibach, H., Marty, J.P., Merk, H., Parra, J., Rekkas, D., Rondelli, I., Schaefer, H., Tauber, U., Verbiose, N. (1996). *Methods for assessing percutaneous absorption, report and recommendations of ECVAM workshop*, 13- 24, 81–106.
- J Biophoton. (2015). 8, 217 - 218.
- Jin, Y., Ubonvan, T., Kim, D. (2010). Hyaluronic Acid in Drug Delivery Systems HA in Nonparenteral Delivery. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 40, 33–43.

- 
- Jin-Kyu Rhee, Ok Kyu Park, Aeju Lee, Dae Hyeok Yang and Kyeongsoon Park (2014). Glycol Chitosan-Based Fluorescent Theranostic Nanoagents for Cancer Therapy. *Marine Drugs*, 12(12), 6038-6057.
- Jones, I., Currie, L., Martin, R., 2002. A guide to biological skin substitutes. *British journal of plastic surgery*, 55, 185-193.
- Juhlin, L. (1997). Hyaluronan in skin. *Journal of Internal Medicine*, 242(1):61-6.
- Kage, M., Tokudome, Y., Matsunaga, Y., Hariya, T., Hashimoto, F. (2013). Effect of hyaluronan tetrasaccharides on epidermal differentiation in normal human epidermal keratinocytes. *Int J Cosmet Sci*, 109-115.
- Karvinen, S., Pasonen-Seppänen, S., Hyttinen, J. M., Pienimäki, J. P., Törrönen, K., Jokela, T. A., Tammi, M. I., Tammi, R. (2003). Keratinocyte growth factor stimulates migration and hyaluronan synthesis in the epidermis by activation of keratinocyte hyaluronan synthases 2 and 3. *The Journal of Biological Chemistry*, 5; 278(49):49495-504.
- Kattumuri, V., Katti, K., Bhaskaran, S., Boote, E. J., Casteel, S. W., Fent, G. M., Robertdom, D., Chandrasekhar, M., Kannan, R., Katti, K. V. (2007). Gum arabic as a phytochemical construct for the stabilization of gold nanoparticles: in vivo pharmacokinetics and X-ray-contrast-imaging studies. *Small Weinheim an Der Bergstrasse, Germany*, 3, 333–341.
- Kaya, G., Tran, C., Sorg, O. (2006). Hyaluronate fragments reverse skin atrophy by a CD44-dependent mechanism. *PLoS Med*, 3(12):493.
- Khan, J. A., Pillai, B., Das, T. K., Singh, Y., & Maiti, S. (2007). Molecular effects of uptake of gold nanoparticles in HeLa cells. *Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology*, 8, 1237–1240.
- Khlebtsov, N., & Dykman, L. (2011). Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. *Chemical Society Reviews*, 40(3), 1647–71.
- Kim, S., Saha, K., Kim, C., & Rotello, V. (2013). The role of surface functionality in determining nanoparticle cytotoxicity. *Accounts of Chemical Research*, 46(3), 681–691.
- Kim, YJ., Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, mechanism of inhibition and perspective for the future. *CMLS, Cell Molecular Life Sciences*, 62, 1707 - 1723.

- Kong, L., Caspall, J., Duckworth, M., Sprigle, S. (2007). Assessment of an ultrasonic dermal scanner for skin thickness measurements. *Medical Engineering & Physics*, 30(6):804-7.
- Kumari S, Khurana SP. (2013). Cosmeceuticals: Current trends and market preparations. *IOSR J Pharm Biol Sci*, 8:45–8.
- Lagarde, JM., Rouvrais, C., Black, D. (2015). Topography and anisotropy of the skin surface with ageing. *Skin Res Technol*, 11(2):110-9.
- Lagarde, JM., Rouvrais, C., Black, D., Diridollou, S., Gall, Y. (2001). Skin topography measurement by interference fringe projection: a technical validation. *Skin Res Technol*, 7(2):112-21.
- Laurent, T. C., Laurent, U. B., & Fraser, J. R. (1996). The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunology and Cell Biology*, 74(2), A1–7.
- Lee, D.-E., Koo, H., Sun, I.-C., Ryu, J. H., Kim, K., & Kwon, I. C. (2012). Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. *Chemical Society reviews*, 41(7), 2656–72.
- Lewinski, N., Colvin, V., & Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 4, 26–49.
- Liang, X., Chen, C., & Zhao, Y. (2008). Biopharmaceutics and therapeutic potential of engineered nanomaterials. *Current Drug Metabolism*, 9(8), 697–709.
- Liao, W., McNutt, M. A, Zhu, W.-G. (2009). The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, 48(1), 46–53.
- Liu, Y., Shipton, M. K., Ryan, J., Kaufman, E. D., Franzen, S., Feldheim, D. L. (2007). Synthesis, stability, and cellular internalization of gold nanoparticles containing mixed peptide-poly (ethylene glycol) monolayers. *Anal Chem*, 79:2221-29.
- Lopes, I., Ribeiro, R., Antunes, F.E. (2012). Toxicity and genotoxicity of organic and inorganic nanoparticles to the bacteria *Vibrio fischeri* and *Salmonella typhimurium*. *Ecotoxicology*, 21, 637–648.
- Luft, R. (1994). The development of mitochondrial medicine. *Proc Natl Acad Sci. U.S A*, 91, 8731 - 8738.
- Lundquist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cerdevall, T., Dawson, KA. (2008). Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Science*, 105(38), 14265-79.

- Lynch, I., Cerdervall, T., Lundquist, M., Cabaleiro-Lago, C., Linse, S., Dawson, KA. (2007). Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Advances in colloid and interface science*, 134-235, 167-174.
- MacNeil, S., (2007). Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*, 445, 874-880.
- MacNeil, S., (2008). Biomaterials for tissue engineering of skin. *Materials Today*, 11, 26-35.
- Madsen, J. T., Andersen, K. E. (2011). Microvesicle formulations used in topical drugs and cosmetics may affect not only product efficiency and performance but also allergenicity. *Dermatitis Journal*, 21(5):243-7.
- Manjula, S., Zabolotniaia, V., Bielfeldt, S. (2014). Efficacy of a New Topical Nano-hyaluronic Acid in Humans. *J Clin Aesthet Dermatol*, 7(3): 27–29.
- McGill, D. C. (1989). "Cosmetics Companies Quietly Ending Animal Tests". *The New York Times*.
- McKenna, K. E., Dolan, O., Walsh, M. Y., Burrows, D. (1995). Contact allergy to gold sodium thiosulfate. *Contact Dermatitis Journal*. 32(3):143-6. Tammi, R., Pasonen-Seppänen, S., Kolehmainen, E., Tammi, M. (2005). Hyaluronan synthase induction and hyaluronan accumulation in mouse epidermis following skin injury. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(5):898-905.
- McKenzie, B., Kay, G., Matthews K. H., Knott R. M., and Cairns, D. (2015). The hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test to predict the ophthalmic irritation potential of a cysteamine-containing gel: Quantification using Photoshop® and ImageJ. *Int J Pharm*, 25;490(1-2):1-8.
- Metcalfe, A., Ferguson, M., (2007a). Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. *Biomaterials*, 28, 5100-5113.
- Metcalfe, A., Ferguson, M., (2007b). Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *Journal of The Royal Society Interface*, 4, 413-437.
- Metz, O., Stoll, W., & Plenert, W. (1982). Meningosis prophylaxis with intrathecal <sup>198</sup>Au-colloid and methotrexate in childhood acute lymphocytic leukemia. *Cancer*, 49, 224–228.
- Meyer, K., & Palmer, J. W. (1934). The polysaccharide of the vitreous humor. *J.Biol.Chem*, 107, 629–634.

- Mihranyan, Albert; Ferrez, Natalia und Maria Strømme (2012). Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. *J Materials Science*, 57, 875-910.
- Millikan, L. E. (2001). Cosmetology, cosmetics, cosmeceuticals: Definitions and regulations. *Clin Dermatol*, 19:371–4.
- Milner, S., Memar, O. (2014). The histological interpretation of high frequency cutaneous ultrasound imaging. *Dermatologic Surgery*, 23(1):44-45.
- Min, B. M., Jeong, L., Lee, K. Y. and Park, W. H. (2006) Regenerated silk fibroin nanofibers: Water vapor- induced structural changes and their effects on the behavior of normal human cells. *Macromol Biosci*, 6(4): 285-292.
- Min, B.-M., Jeong, L., Nam, Y.S., Kim, J.M., Kim, J.Y. and Park, W.H. (2004a) Formation of silk fibroin matrices with different texture and its cellular response to normal human keratinocytes. *Int J Biol Macromol*, 34(5): 223-230.
- Min, B.-M., Lee, G., Kim, S.H., Nam, Y.S., Lee, T.S. and Park, W.H. (2004b) Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Biomaterials*. 25(7): 1289-1297.
- Mofid, Y., Josse, G., Gahagnon, S., Delalleau, A., Ossant, F. (2010). Mechanical skin thinning-to-thickening transition observed in vivo through 2D high frequency elastography. *J Biomech*, 43(15):2954-62.
- Mofid, Y., Ossant, F., Imberdis, C., Josse, G., Patat, F. (2006). In-vivo imaging of skin under stress: potential of high-frequency (20 MHz) static 2-D elastography. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 53(5):925-35.
- Mortelmans, K., & Riccio, E. S. (2000). The bacterial tryptophan reverse mutation assay with *Escherichia coli* WP2. *Mutation Research*, 455(1-2), 61–9.
- Mortelmans, K., & Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455(1-2), 29–60.
- Morton, L. T. (1954). Garrison and Morton's Medical Bibliography, an Annotated Check-List of Texts Illustrating the History of Medicine. 2nd ed. *New York: Argosy-Antiquarian*, p. 3980.
- Nanotechnology Characterization Laboratory: <http://ncl.cancer.gov/>
- National Cancer Institute: <http://www.cancer.gov/cancertopics/treatment/types-of-treatment>

- Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., Kolar, J. (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*, 53, (8): 397–411 Review Article.
- Nucleus Medical Media (2017). *Skin layers and functions* [Video]. Retrieved from <http://ebSCO.smartimagebase.com/skin-layers-and-functions/view-item?ItemID=71995>
- Nyström, A. M., & Fadeel, B. (2012). Safety assessment of nanomaterials: implications for nanomedicine. *Journal of controlled release*, 161(2), 403–8.
- O'Malley, C. D. (1961). Dermatological origin. *Arch Dermatol*, 83:66–75.
- Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Olin, S., Monterio-Riviere, N., Warheit, D., Yang, H. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology*, 2, 8.
- Oilman, M. R. (1982). Skin and Eye Testing in Animals. Principles and Methods of Toxicology; Hayes, A.W., Ed.; Raven Press: New York, 209–222.
- Ossipov, D. a. (2010). Nanostructured hyaluronic acid-based materials for active delivery to cancer. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7(6), 681–703.
- Otto, A1., du Plessis, J., Wiechers, JW. (2009). Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *Int J Cosmet Sci*, Feb;31(1):1-19.
- Pan, Y., Leifert, A., Ruau, D., Neuss, S., Bornemann, J., Schmid, G., Brandau, W., Simon, U., Jahn-Dechent, W. (2009). Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small Weinheim an Der Bergstrasse, Germany*, 5, 2067–2076.
- Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W., Jahn-Dechent, W. (2007). Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small Weinheim an Der Bergstrasse, Germany*, 3, 1941–1949.
- Parkkola, H (2014). Hyaluronic acid-coated gold nanoparticles as an anticancer drug delivery system – Biological characterization and efficacy (tesis doctoral). Universidad de Barcelona, España.
- Patel, A., Prajapati, P., (2011). Boghra R Summary on the application of nanoparticles in cosmetics. *Asian J Pharm Sci Clin Res*, 1, 40-55.
- Patra, H. K., Banerjee, S., Chaudhuri, U., Lahiri, P., & Dasgupta, A. K. (2007). Cell selective response to gold nanoparticles. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3, 111–119.



- Paul, W., Sharma, C., 2004. Chitosan and alginate wound dressings: A short review. *Trends Biomater. Artif. Organs*, 18, 18-23.
- Pavicic, T., Gauglitz, G. G., Lersch, P. (2011). Efficacy of cream based formulations of hyaluronic acid of different molecular weights in anti-wrinkle treatment. *J Drugs Dermatol*, 10(9):990–1000.
- Perin, F., Perrier, J., Pittet, J., Beau, P., Schnebert, S., Perrier, P. (2000). Assessment of skin improvement treatment efficacy using the photograting of mechanically-accentuated microrelief of thigh skin. *International Journal of Cosmetic Science*, 22, 147-156.
- Pernodet, N., Fang, X., Sun, Y., Bakhtina, A., Ramakrishnan, A., Sokolov, J., Ulman, A., Rafailovich, M. (2006). Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. *Small Weinheim an Der Bergstrasse, Germany*, 2, 766–773.
- Pienimaki, J. P., Rilla, K., Fulop, C., Sironen, R. K., Karvinen, S., Pasonen, S., Lammi, M. J., Tammi, R., Hascall, V. C., Tammi, M. I. (2001). Epidermal growth factor activates hyaluronan synthase 2 in epidermal keratinocytes and increases pericellular and intracellular hyaluronan. *The Journal of Biological Chemistry*, 8; 276(23):20428-35.
- Potter, B. S. (2003). Bibliographic landmarks in the history of dermatology. *J Am Acad Dermatol*, 48:919–32.
- Powers, W., Palazuelos, M., Moudgil, B. M., Stephen M. Roberts, S. (2009). Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies. *Nanotoxicology*, 42-51.
- Prajapati, S. T., Patel, C. G., Patel, C. N. (2011). Formulation and evaluation of transdermal patch of repaglinide. *ISRN Pharm*, 651909.
- Prestwich, G. (2011). Hyaluronic acid-based clinical biomaterials derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine. *Journal of Controlled Release*, 155(2), 193–199.
- Pusey WA. Huckbody E, editor. The history of dermatology. Springfield, Charles C Thomas. (1933). Dermatology throughout dark ages. *Int J Dermatol*, 19:344–47.
- Querol, J. (2012). Hyaluronic Acid: In Vitro Expression in Skin Keratynocytes. *ENDOR Nanotechnologies Report*.
- Querol, J. (2012). Transdermal Penetration of Gold Nanoparticles Conjugated to HA. *ENDOR Nanotechnologies Report*.

- Rising, A., Nimmervoll, H., Grip, S., Fernandez-Arias, A., Storckenfeldt, E., Knight, D.P., Vollrath, F., Engstrom, W. (2005) Spider silk proteins-mechanical property and gene sequence. *Zoological science*, 22(3): 273-281.
- Rodrigues, A., Saraiva Sanchez, E., da Costa, A., Moraes, Â. (2008). The influence of preparation conditions on the characteristics of chitosan alginate dressings for skin lesions. *Journal of Applied Polymer Science*, 109, 2703-2710.
- Sachs, D., Voorhees, J. (2010). Age-Reversing Drugs and Devices in Dermatology. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 89(1), 34-43.
- Sae-Yeol-Rim, P., Jong-Seok, K., Sung Jae, S., Sanghoon K. (2015). Characterization, quantification, and determination of the toxicity of iron oxide nanoparticles to the bone marrow cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9): 22243–22257.
- Sainthillier, J-M., Mac-Mary, S., Monnier, D. (2013). Exploratory study of the typology of various grades of mature skin. *Skin Res Technol*, 19(1):507-14.
- Saraf, S., Kaur, C. (2010). Phytoconstituents as new cosmetic photoprotective formulations. *Pharmacogn Rev*, (4) 1.
- Schmid, G. (2008). The relevance of shape and size of Au55 clusters. *Chemical Society Reviews*, 37, 1909–1930.
- Scott, R.C., Clowes, H.M. (1992a). In vitro percutaneous experiments: A guide to the technique for use in toxicology assessments. *Toxicology Methods*. 2, 113–123.
- Somasundaran, P., Mehta, S. C., Rhein, L., and Chakraborty, S. (2007). Nanotechnology and related safety issues for delivery of active ingredients in cosmetics. *MRS Bulletin*, 32, 779.
- Seeley, R.R., Stephens, T.D., Philip, T. (2003). *Anatomia & Fisiologia 6th Edition*, 150-169.
- Shao, Z. and Vollrath, F. (2002) Materials: Surprising strength of silkworm silk. *Nature*, 418(6899): 741-741.
- Sharma, Y. K., Shukla, P., Nayak, R., Kothari, P., Gupta, A. (2017). Association of Dermatoses with Duration and Quantum of Alcohol Intake: A Comparative Cross-sectional Study. *Indian J Dermatol*, 62(2):184-190.
- Sheetal R. D’Mello, Celia N. Cruz, Mei-Ling Chen, Mamta Kapoor, Sau L. Lee and Katherine M. Tyner. (2017). The evolving landscape of drug products containing nanomaterials in the United States. *Nature Nanotechnology*, 12, 523-529.

- Sheridan, R., Moreno, C. (2001). Skin substitutes in burns. *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries*, 27(1), 92.
- Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R. R., & Sastry, M. (2005). Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 21, 10644–10654.
- Siddiqui, A. H., Cormane, R, H. (1976). Dermatologic origins and developments down to the early twentieth century. *J Invest Dermatol.* 66:122–5.
- SkinCeuticals Laboratory: [www.skinceuticals.com](http://www.skinceuticals.com)
- Sonavane, G., Tomoda, K., & Makino, K. (2008). Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 66, 274–280.
- Soto, ML., Falqué, E., Domínguez, H. (2015). Cosmetic products. Relevance of natural phenolic compounds of grapes and derived products in the formulation of cosmetics, 2, 259 - 276.
- Souto, E. B., Almeida, A. J., and Müller, R. H. (2007). Lipid nanoparticles (SLN, ® NLC® for cutaneous drug delivery: Structure, protection and skin effect. *J. Biomed. Nanotech*, 3, 1.
- Sperling, R., & Parak, W. J. (2010). Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philosophical Transactions of the Royal Society A Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 368(1915), 1333–1383.
- Sperling, R., Gil, P., Zhang, F., Zanella, M., & Parak, W. J. (2008). Biological applications of gold nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 37(9), 1896–1908.
- Steiling, W. (1994). The Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane (HET-CAM).; *INVITTOX Protocol*, 96; 1994
- Stern, R., Maibach, H. I. (2008). Hyaluronan in skin: aspects of aging and its pharmacologic modulation. *Clinics in Dermatology Journal*, 26(2):106-22.
- Stevenson, Richard (1985). "Pantry Pride Control of Revlon Board Seen Near". *New York Times*, p. 5.
- Stuhlmeier, K. M., Pollaschek, C. (2004). Differential effect of transforming growth factor beta (TGF-beta) on the genes encoding hyaluronan synthases and utilization of the p38 MAPK pathway in TGF-beta-induced hyaluronan synthase 1 activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 5; 279(10):8753-60.

- 
- Suptijah, P., Djajadisastra, J., Saputro, C., Hidayat, T. (2015). The Characterization and Effectiveness Penetration of Caffeine Trapped and Coated Chitosan Nanoparticles as Anti-Cellulite *Journal of Nanoscience and Nanoengineering*, Vol. 1, No. 4, 198-205.
- Sutton, R. L. Jr. (1572). Diseases of the skin. Mercurialis. *Archives of Dermatology*, 94:763–72.
- Tilles, G., Wallach, D. (1999). Robert Willan and the French Willanists. *British Journal of Dermatology*, 140:1122–6.
- Tolg, C., Telmer, P., Turley, E. (2014). Specific sizes of hyaluronan oligosaccharides stimulate fibroblast migration and excisional wound repair. *PLoS One*, 9(2):88479.
- Toole, B. P., Ghatak, S., & Misra, S. (2008). Hyaluronan oligosaccharides as a potential anticancer therapeutic. *Current pharmaceutical biotechnology*, 9(4), 249–52.
- Tungate, M. (2012). Dunod, ed. *Le monde de la beauté*. p. 76.
- Turlier, V., Delalleau, A., Casas, C. (2013). Association between collagen production and mechanical stretching in dermal extracellular matrix: in vivo effect of cross-linked hyaluronic acid filler. A randomised, placebo-controlled study. *J Dermatol Sci*, 69(3):187-94.
- Tzello, T. G., Klagas, I., Vahtsevanos, K., Triaridis, S., Printza, A., Kyrgidis, A., Karakioulakis, G., Zouboulis, C. C., Papakonstantinou, E. (2009). Extrinsic ageing in the human skin is associated with alterations in the expression of hyaluronic acid and its metabolizing enzymes. *Experimental Dermatology*, 18(12):1028-35.
- Van Smeden J., Bouwstra, J. (2016). Basilea: Karger Publishers. Stratum Lipids Corneum: its role for skin barrier function in healthy subjects and patients with atopic dermatitis. *In: Skin barrier function*, vol. 49. p. 8-26.
- Varani, J., Dame, M., Rittie, L., Fligel, S., Wang, S., Fisher, G., Voorhees, J. (2006). Decreased Collagen Production in Chronologically Aged Skin: Roles of Age-Dependent Alteration in Fibroblast Function and Defective Mechanical Stimulation. *The American Journal of Pathology*, 168(6): 1861–1868.
- Venturoli, D., & Rippe, B. (2005). Ficoll and dextran vs. globular proteins as probes for testing glomerular permselectivity: effects of molecular size, shape, charge, and deformability. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 288(4), F605–613.
- Vepari, C. and Kaplan, D.L. (2007) Silk as a biomaterial. *Prog Polym Sci*, 32(8): 9911007.

- 
- Verma, P., Pathack, K. (2010). Therapeutic and cosmeceutical potential of ethosomes: An overview. *J Adv Pharm Technol Res*, 1(3): 274–282.
- Vesaratchanon, S., Nikolov, A., & Wasan, D. T. (2007). Sedimentation in nano-colloidal dispersions: effects of collective interactions and particle charge. *Advances in Colloid and Interface Science*, 134-135, 268–278.
- Villiers, C., Freitas, H., Couderc, R., Villiers, M.-B., & Marche, P. (2010). Analysis of the toxicity of gold nano particles on the immune system: effect on dendritic cell functions. *Journal of Nanoparticle Research: An Interdisciplinary Forum for Nanoscale Science and Technology*, 12(1), 55–60.
- Vivero, L (2014). Diseño y caracterización de sistemas de liberación de fármacos basados en nanopartículas metálicas y ácido hialurónico (tesis doctoral). Universidad de Barcelona, España.
- Vogelgesang, B., Bonnet, I., Godard, N., Sohm, B., Perrier, E. (2011). In vitro and in vivo efficacy of sulfocarrabiose, a sugar-based cosmetic ingredient with anti-cellulite properties. *Int J Cosmet Sci*, 33(2):120-5.
- Vyumvuhore, R., Tfayli, A., Biniak, K. (2015). The relationship between water loss, mechanical stress, and molecular structure of human stratum corneum ex vivo. *J Biophoton*, 8:217–218.
- Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A.-K., & Zweck, A. (2006). The emerging nanomedicine landscapes. *Nature biotechnology*, 24(10), 1211–7.
- Wang, S., Lawson, R., Ray, P, Yu, H. (2011). Toxic effects of gold nanoparticles on *Salmonella typhimurium* bacteria. *Toxicology and Industrial Health*, 27 (6): 547-554.
- Wang, L.-S., Chuang, M.-C., & Ho, J.-A. A. (2012). Nanotheranostics--a review of recent publications. *International journal of nanomedicine*, 7, 4679–95.
- Wang, Y., Kim, H.J., Vunjak-Novakovic, G. and Kaplan, D.L. (2006) Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials*, 27(36): 6064-6082.
- Wiechers, JW., Musee, N. (2010). Engineered inorganic nanoparticles and cosmetics: facts, issues, knowledge gaps and challenges. *J Biomed Nanotechnol*, 6(5):408-31.
- Wilkinson, T. S., Potter-Perigo, S., Tsoi, C., Altman, L. C., Wight, T. N. (2004). Pro- and anti-inflammatory factors cooperate to control hyaluronan synthesis in lung fibroblasts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 31(1):92-9.
-

Wilson, E. (1857). *On Diseases of the Skin*. 4th ed. Philadelphia: Blanchard & Lee; p. 6.

Wong, D., Chang, H. (2009). Skin tissue engineering. *The Stem Cell Research Community, StemBook*, 126(3), 858-868.

Zhou, J., Ralston, J., Sedev, R., & Beattie, D. A. (2009). Functionalized gold nanoparticles: synthesis, structure and colloid stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 331(2), 251–62.



# ANEXOS

---





## 8. ANEXOS

### **Anexo I. Introducción a la dermatología**

Ya a finales del siglo XVIII, la piel y sus trastornos eran conocidos con muchos nombres. Alguien la llamó "dermiatría", otra "dermología" y otras "dermófilos". El asunto necesitaba una solución y finalmente fue bautizado como dermatología (Holubar et al., 1999). El debate sobre la nosología en dermatología es bastante antiguo. La controversia y el debate continuaron durante siglos. El impacto de esta confusión y controversia fue inmenso. En 1898, Bulkley escribió el principio del primer capítulo de su famoso libro *Manual de Enfermedades de la Piel*.

Muchos términos fueron usados con frecuencia, pero a menudo confusos como "lepra, psora, pemphigus, lupus" que atormentaron el campo de la dermatología desde días antiguos (Burgess, 1846). Esto no sólo desconcertó a la comunidad médica, sino que también detuvo el progreso de los estudios científicos en el área debido a la falta de uniformidad en el significado y la utilidad. Para describir una lesión era necesario tener un sistema unánime de nomenclatura para que se pudiera hacer una comunicación estandarizada y significativa entre todos los miembros de la comunidad médica a nivel mundial. Por lo tanto, una taxonomía clara e inequívoca era necesaria (Sen et al., 1897; Bhisagratna, 1919).

El proceso de clasificación de los trastornos cutáneos comenzó en el mundo antiguo, tanto oriental como occidental. En la India, las enfermedades cutáneas importantes y significativas se agruparon y describieron bajo enfermedades individuales y las enfermedades de la piel con menor gravedad fueron tratadas bajo la categoría de "kshudra roga" o "desorden menor" en los primeros textos de Ayurveda, Charaka Samhita, Susruta Samhita, etc. (Sen et al., 1897; Bhisagratna, 1919).

La palabra usada para la "lepra" ha sido traducida por los traductores de la Biblia hebrea al griego, pero la palabra no representa la lepra sola y en su lugar representa muchos trastornos a partir de la lepra como vitiligo, psoriasis, leucoderma

postinflamatorio, entre otras (Goldman et al., 1966). Esto ha sucedido con las palabras "psora, liquen, pemphigus". Estos términos fueron utilizados y se mantuvieron más o menos para una serie de enfermedades de la piel con diferentes naturalezas relacionadas y no relacionadas. En cuanto a la clasificación de las enfermedades, Hipócrates, el padre de la medicina propagó la idea filosófica de "clasificación etiológica" dividiendo los trastornos en locales y constitucionales (Wilson, 1857).

En la historia de la ciencia médica occidental Galen de Pérgamo (133-200) se considera como el segundo hombre médico histórico después de Imhotep de Egipto que vivió durante el rey del período Zosar durante 3000 a. C. (Siddiqui et al., 1976). Su contribución en el sistema de clasificación sembró la semilla del "sistema topográfico" de clasificación de las enfermedades cutáneas. Galen fue el primero en dividir las enfermedades de la piel como: enfermedades de las partes velludas, y enfermedades de las partes no fibrosas (O'Malley, 1961). Este sistema influyó y permaneció hasta aproximadamente mediados del siglo XVIII. La medicina galénica había permanecido como resquicio de la medicina occidental moderna hasta el siglo XVIII o XIX.

Después de que la medicina antigua alcanzó su cenit durante el período de Celsus y de Galen, comenzó a declinar de su gloria pasada. En la historia de la medicina, del siglo IV al XIV, se consideró como un período oscuro ya que no había ocurrido un desarrollo muy significativo. Pursey dijo: "Todo el período del siglo IV al siglo XIV está marcado por una escolástica fútil que carecía de importancia científica" (Pursey et al., 1980). Si pasamos por la historia, otros 100 años pueden agregarse a este período oscuro, aunque la era del Renacimiento ya hubiera comenzado. El siglo siguiente, es decir, el siglo XVI es a menudo llamado el "primer siglo del mundo moderno". El Renacimiento alcanzó su madurez durante ese período. El período vio la actividad de viejos maestros como Leonardo da Vinci, Raphael, Michel Ángel, y muchos otros. La actividad de algunas estrellas famosas de este período como Copérnico, Cervantes, Galileo, Kepler y Shakespeare estaban en su nivel más alto (Siddiqui et al., 1976).

En este contexto histórico, Gerolamo Hieronymus Mercurialis (1530-1606) inició una nueva era de la medicina en relación con la piel y las enfermedades. Su "De Morbis Cutaneis y Omnibus Corporis Humanos Excrementis Tractatus" es considerado como el primer libro sistemático sobre las enfermedades de la piel por Garrison y Morton en la bibliografía médica de la historia médica. Mercurialis siguió la clasificación topográfica, pero la elaboró más lejos y agrupó enfermedades de la piel bajo dos encabezamientos: Los tipos de enfermedades peculiares del cuero cabelludo (había cinco tipos de tales enfermedades: defluvium, calvities prematuros, canties, alopecia, y ophiasis) y los comunes a la piel desnuda (básicamente tres tipos: los que implican el color, los que implican la textura y el bulto) (Sutton, 1966). Durante esta última parte del Renacimiento, la medicina cutánea estaba en vías de modernización y necesitaba una clasificación sencilla pero lógica. François Boissier de Sauvage de Lyon intentó propagar su propuesta, con su obra "Doctrina de morbis cutaneis", y consagrar así las enfermedades cutáneas a través de importantes ensayos de sistematización, pero sus postulados no tuvieron mucho éxito (Siddiqui et al., 1976).

Durante este período, Carolus Linnaeus (1707-1778) cambió completamente la visión del mundo biológico. Observó que la simetría existía entre diferentes organismos vivos y que un grupo formado sobre la base de estas características lo distinguía de los otros. Por lo tanto, si se conoce la característica básica de un grupo, la naturaleza de sus miembros podría predecirse de alguna manera con el uso o aplicación de una fórmula. Este sistema linneo también influyó en nuestra rama de la medicina. Charles Anne Lorry (1726-1783) de París siguió el camino morfológico, pero trató de clasificar las enfermedades de la piel de una manera Linneana, pero se convirtió en algo complicado y por lo tanto no obtuvo mucho éxito. A principios del siglo XVII, Riolanous trató de clasificar las enfermedades de la piel según la aparición de las lesiones ignorando su situación topográfica. Este sistema se convirtió en el fundamento del denominado "sistema artificial" de clasificación en los últimos años (Wilson, 1857).

La siguiente contribución importante vino de Joseph Jacob Ritter von Plenck (1738-1807) de Viena, Austria. Trajo los trastornos de la piel bajo 14 encabezados. Su sistema consideraba los síntomas externos como la base de la clasificación. Plenck en el año 1776 propuso un sistema de clasificación en su octavo latino de 128 páginas "Doctrina de Morbis Cutaneis". Su clasificación se basó principalmente en la morfología clínica. Arregló las entonces conocidas enfermedades de la piel 115 en 14 clases y todo fue un asunto de una hoja. Esta es la primera vez que se usan términos como mácula, pápula, vesícula y costras, entre otros. Por primera vez en la historia casi todas las enfermedades de la piel conocidas durante ese período encajaban en 14 encabezados (Potter, 2003). Por lo tanto, quedando muy lejos de la tradición galénica durante 1500 años clasificándolas según si había pelo o no en la zona afectada. Sin embargo, su método no era perfecto y requirió un refinamiento adicional.

Casi dos décadas pasaron después de la publicación de Plenck. Robert Willan (1757-1812) trabajaba incesantemente en dermatología en el Carey Street Public Dispensary de Londres. Tras reconocer el valor de la obra de Plenck, se encargó de proporcionar la clasificación moderna. Es por ello que fue considerado por algunas autoridades como Holubar y Wallach como el pionero de la dermatología actual (Holubar et al., 1999). La publicación de su libro "Sobre las enfermedades cutáneas" en 1808 se considera como el inicio de la dermatología moderna.

Prácticamente, la ciencia dermatológica actual comienza con Robert Willan (Crissey et al., 1998). Su idea de clasificar las enfermedades de la piel se basó principalmente en la línea de arreglos taxonómicos propagada por Carl Linnaeus para el reino botánico y animal e influenciado por la obra de Plenck. Primero reconoció siete órdenes que se subdividieron en géneros, especies y variedades. En 1798, publicó su primera orden en una cubierta de papel que nombra Papulae. Además, en 1808, publicó su autorizada obra "On cutaneous maladies vol. I" compilando las cuatro primeras órdenes, con 34 figuras de color, grabadas en cobre. Esta es la primera vez que un texto dermatológico se acompaña de ilustraciones coloreadas.

Posteriormente cayó enfermo y se trasladó a Madeira con la esperanza de recuperarse. Pero no se recuperó y murió a los 55 años el 7 de abril de 1812. No pudo completar su trabajo en otras cuatro órdenes. Esto fue subsecuentemente terminado y publicado como un libro titulado "Una Sinopsis Práctica sobre Enfermedades Cutáneas" por otro decano en dermatología, un amigo y discípulo de Willan, Thomas Bateman en 1813 (Bateman et al., 1818). Robert Willan retuvo 6 de las 14 clases de Plenck y agregó otras dos.

En el mismo período se desarrolló en Francia una nueva e innovadora forma de clasificar el trastorno dermatológico. En el famoso hospital Saint Louis (establecido por el rey Enrique IV en 1607 en París) la dermatología fue estudiada como especialidad a partir del 1801. Jean Louis Alibert (1768-1837) fue designado como jefe del hospital y en 1817 su trabajo sobre la clasificación de desórdenes médicos fue publicado como *Nosologie naturelle*. Se basó en la analogía botánica que fue propagada por su maestro Pinel y Sydenham. Su obra "Arbre des dermatoses" es una representación pictórica de su sistema de clasificación. La corteza del tronco del árbol representaba la epidermis y la dermis, las enfermedades se llamaban líquenes y micosis (Everett et al., 1984).

El sistema era muy complicado, incluso sus propios colegas Beitt, Cazenave y Schedel lo abandonaron a favor del sistema Willan más racional y simplista. Durante ese período, la clasificación de los trastornos dermatológicos llegó casi a su etapa final. Esta vez fue el turno de Viena para convertirse en la sede de la historia. Ferdinand Hebra (1816-1880) fue el hombre que finalmente sacó a luz todo el sistema morfológico de la anatomía patológica. Esto superó toda otra clasificación, ya que esta clasificación no era más meramente morfológica o macroscópica, sino que se basaba tanto en la visión de la lesión como dentro de la lesión. Fue influenciado por la anatomía patológica propugnada por el gran maestro Rokitansky. A muy temprana edad, publicó su famoso "Atlas der Hautkrankheiten". Su segundo trabajo "Lehrbuch" fue sobre la patología de la piel. Esto separó por primera vez lesiones primarias y secundarias y por primera vez se consideró la distribución de las lesiones para el diagnóstico de una enfermedad. La influencia de la

escuela vienesa se extendió gradualmente a los Estados Unidos y comenzó una era completamente nueva (Potter, 2003).

Así, el viaje de la resolución de la cuestión de la taxonomía y la nosología que comenzó con Galen, el primer gran maestro de la medicina occidental entró en la nueva era con el método Willian y finalmente se completó con el establecimiento de la dermatología moderna encabezada por Hebra y asistido por otras autoridades vienasas como Moritz Kaposi (Bateman, 1818).

## **Anexo II. Historia de la cosmética**

La palabra cosmetae se utilizó por primera vez para describir a los esclavos romanos cuya función era bañar a los hombres y las mujeres en perfumes. En Egipto, hombres y mujeres usaban aceites perfumados y ungüentos para limpiar y suavizar su piel y enmascarar el olor corporal (Stewart, 2007a, b). Se utilizaron tintes y pinturas para colorear la piel, el cuerpo y el cabello. Se enroscaron sus labios y mejillas, se mancharon las uñas con henna y se alinearon los ojos y las cejas pesadamente con kohl. El kohl era un polvo de color oscuro hecho de antimonio triturado, almendras quemadas, plomo, cobre oxidado, ocre, ceniza, malaquita, crisocola (un mineral de cobre azul) o cualquier combinación de los mismos. Se aplicaba con un palito pequeño y en los párpados superior e inferior se pintaba una línea que se extendía a los lados de la cara para un efecto estilizante. Además de reducir el brillo del sol, se creía que el kohl podría restaurar la vista pobre y reducir la infección ocular. El kohl se mantenía en una pequeña olla de fondo plano con un borde ancho y diminuto y una tapa plana en forma de disco (Stewart, 2007).

Los cosméticos eran una parte inherente de la higiene y la salud egipcias (Cowell, 1961). Aceites y cremas se utilizaban para la protección contra el sol y el viento. La mirra, el tomillo, la mejorana, la manzanilla, la lavanda, el lirio, la menta, el romero, el cedro, la rosa, el aloe, el aceite de oliva, el aceite de sésamo y el aceite de almendras proporcionaron los ingredientes básicos de la mayoría de los perfumes utilizados en los rituales religiosos. Para los labios, las mejillas y las uñas, una arcilla llamada ocre rojo fue triturada y mezclada con agua. La henna se usaba para teñir las uñas amarillas o naranja. El maquillaje se almacenaba en jarras especiales que se guardaban en cajas especiales de maquillaje. Las mujeres llevaban sus kits de maquillaje a las fiestas y los mantenían bajo sus sillas mientras que los hombres, aunque también se maquillaban, no llevaban los kits con ellos (Stewart, 2008).



Los antiguos egipcios se enorgullecían de su apariencia y limpieza. La mayoría de los egipcios se bañaban diariamente en el río o fuera de una cuenca de agua en casa. Los hogares ricos tenían un cuarto de baño donde los sirvientes echaban jarras de agua sobre su amo (equivalente a una ducha moderna). En lugar de jabón se utilizó una crema limpiadora hecha de aceite animal o vegetal mezclada con cal y perfume. La gente se frotaba a diario con aceite de ungüento perfumado que había sido empapado en madera perfumada. La mezcla se dejaba en una olla hasta que el aceite absorbía el aroma de la madera. El aceite perfumado se utilizó para prevenir la sequedad de la piel en los climas duros. En las fiestas, los sirvientes colocaban un cono de grasa perfumada en la cabeza de cada invitado. La grasa tenía un efecto de enfriamiento mientras se derretía y corría por las caras de cada huésped. Todos, sin importar edad o sexo, llevaban maquillaje y utilizaban espejos de plata y cobre para la aplicación del maquillaje (Olson 2008).

Algunos peinados eran muy similares a los de hoy. La gente común llevaba el pelo corto. Las chicas jóvenes usualmente mantenían el pelo en trenzas mientras que los niños tenían las cabezas afeitadas. Los egipcios se afeitaban la cabeza para evitar tener piojos. Las pelucas hechas de lana de oveja o cabello humano se llevaban tanto por hombres como mujeres a fiestas, funciones oficiales y/o como protección frente al calor. Cuando no estaban en uso, las pelucas se almacenaban en cajas especiales que se mostraban en un stand en casa. (Stewart, 2007b; Olson, 2008).

Refrescaban su aliento gracias a la masticación de pellets hechos de hojas de tamarisco molido. No hay evidencia de cepillos de dientes o pasta de dientes. El mal aliento y el mal olor corporal eran motivo de vergüenza. Los olores hermosos eran esenciales para la creencia egipcia de que "la limpieza es la piedad". Los egipcios habían aprendido el arte de destilar aceites esenciales hace miles de años. La ciencia egipcia de la perfumería erosionó a través de los siglos "hasta su ruptura final en la Edad Media". "El olor" era incomprensiblemente fundamental en la sociedad egipcia y la perfumería comenzó como un arte secreto en Egipto que se perfeccionó durante 2500 aC. (Stewart, 2007a). La función de la perfumería era alcanzar la perfección espiritual más que física

perfeccionando los aspectos físicos, emocionales y mentales de la existencia humana (Stewart, 2007b). Los perfumes hicieron que el cuerpo funcionara perfectamente. Ra, el Dios Sol, era la fuente de todo olor. Bajo la creencia egipcia, "oler muy bien era un signo de santidad", y sólo las personas con olor perfecto serían recibidas por los dioses cuando murieran. Egipto estaba profundamente impulsado por las preocupaciones espirituales y virtualmente todo lo inventado tenía una aplicación espiritual; por ejemplo, la ciencia de la momificación era el beneficiario inmediato de la perfumería (Cowell, 1961).

El aceite de cedro fue considerado el más sagrado de todos los aceites destilados y el principal aceite utilizado en la momificación. Los sacerdotes egipcios descubrieron el verdadero poder de los aceites y creyeron que ciertos tipos de perfumes podían aumentar su poder personal. Debido a que las civilizaciones vecinas eran percibidas como primitivas, hostiles, moralmente corruptas, espiritualmente ineptas, carentes de madurez, evolución o autocontrol para usar aceites, los sacerdotes no querían que tuvieran su conocimiento (Stewart, 2007a; Cowell, 1961; Olson, 2008).

Se creía que la esencia espiritual de las plantas tenía cualidades curativas y poder sobrenatural. La encarnación del espíritu curativo de la planta, más que la química de la planta hizo que el proceso de extracción y el aceite fueran sagrados. Los siete aceites sagrados utilizados para la momificación fueron el aceite Perfume Festivo, el aceite Hekenu, el aceite balsámico Sirio, el aceite Nechenem, el aceite de unción, el aceite de cedro y el aceite de Libia. Estos aceites también formaron el fundamento de la magia ritual egipcia. La fragancia egipcia más famosa, kyphi, que significa "bienvenida a los dioses", se dice que induce estados hipnóticos. En la ciudad del Sol, Heliópolis, se quemaban resinas por la mañana, mirra al mediodía y kyphi al atardecer en honor al Dios del Sol, Ra. Además, desde el uso religioso, el kyphi se utilizaba para aliviar la ansiedad, aumentar el sueño, eliminar el dolor, tratar el asma y actuar como un antídoto general para las toxinas. Una receta registrada incluyó una mezcla embriagadora de cálamo, henna, nardos, incienso, mirra, canela, ciprés y terebinto (resina de pistacho) y otros ingredientes (Balson, 1962).

Los cosméticos se utilizaron en Persia y lo que hoy es Oriente Medio. Después de que las tribus árabes se convirtieron al islam y conquistaran esas áreas, los cosméticos sólo se restringían si disfrazaban la apariencia real para engañar o causar un deseo incontrolado. Todas las ramas del islam establecen una serie de reglas relacionadas con la pureza y la limpieza, ya sea en su forma física o espiritual. Para algunas ramas, la regla general era establecida por el Corán, "Porque Allah ama a aquellos que vuelven a él constantemente y él ama a aquellos que se mantienen puros y limpios." Muhammad también declaró: "Allah es hermoso y ama la belleza". Por otro lado, algunas ramas fundamentalistas del islam prohíben el uso de cosméticos (Stewart, 2007a, b).

Uno de los primeros cosmetólogos fue el médico Abu'al-Qassim al-Zahrawi, o Abulcassis (936-1013 AD), que escribió la enciclopedia médica Al-Tasreef en 30 volúmenes. El capítulo 19 estaba dedicado a los cosméticos. Como el tratado fue traducido al latín, el capítulo cosmético fue utilizado en Occidente. Al-Zahrawil consideraba a los cosméticos una rama de la medicina, a la que llamó Medicina de la Belleza (Adwiyat al-Zinah). Se ocupaba de perfumes, aromas e incienso. Había esencias perfumadas y prensadas en moldes especiales, tal vez los primeros antecedentes de los actuales lápices labiales y desodorantes sólidos. Él usó sustancias aceitosas llamadas Adhan para la medicación y el embellecimiento (Stewart, 2007b).

La henna (Stewart, 2007a; Olson, 2008) se ha utilizado en la India desde alrededor de los siglos IV o V. Se utiliza como un tinte para el cabello o en el arte de mehndi, en el que los diseños complejos se pintan en las manos y los pies, especialmente antes de una boda hindú. La henna también se utiliza en algunas culturas del norte de África. Diseños de henna africana tienden a ser más audaces mientras que los diseños de la India son más complejos (Stewart, 2007a; Olson, 2008). Las mujeres en la India tampoco usaban jabón, sino que en su lugar utilizaban una crema germicida de cúrcuma compuesta de harina de trigo mezclada con leche. En ocasiones festivas, se utilizaban cosméticos de baño ampliamente utilizados, incluso hoy en día. Las preparaciones de cúrcuma han sido y son utilizadas por novias recién casadas durante su boda. Las preparaciones cosméticas que

contienen cúrcuma, almendras, sándalo, etc., a parte de las fragancias cosméticas, proporcionan buenas propiedades antisépticas (Cowell, 1961).

La India era famosa por usar Itra, similar a los olores modernos comercializados por varias compañías, pero estaba en forma concentrada. Dichos olores se hicieron de diversas fragancias de flores indias y fueron utilizados popularmente durante fiestas y celebraciones (Angeloglou, 1970).

En la edad media, las clases bajas eran las encargadas de realizar los trabajos agrícolas. La piel europea típicamente de color claro se oscureció por la exposición al sol. Las clases más altas de la sociedad que eran las que más tiempo de ocio tenían, debían guarecerse en el interior de los edificios para mantener la piel pálida como indicador de su estatus social. Así, los más altos de la sociedad europea, que podían pasar todo su tiempo protegidos del sol, frecuentemente tenían la piel clara. Como resultado, los hombres y mujeres europeos a menudo intentaban aclarar su piel directamente o usaban polvos blancos en su piel para parecer más aristocráticos. Se utilizó una variedad de productos, incluyendo pintura de plomo blanco, que, como si el plomo tóxico no fuera lo suficientemente malo, también contenía arsénico notoriamente. La reina Isabel I de Inglaterra fue una conocida usuaria de plomo blanco con la que creó una apariencia conocida como "la máscara de la juventud"; además, los retratos de la reina de Nicholas Hilliard realizados posteriormente son ilustrativos de la influencia de dicho estilo. Algunas tribus nativas americanas pintaron sus caras para los eventos ceremoniales o la batalla (Angeloglou, 1970; Cowell, 1961).

Durante los primeros años del siglo XX, el maquillaje se puso de moda en los Estados Unidos de América y Europa debido a la influencia de estrellas de ballet y teatro. Pero el nuevo desarrollo más influyente de todos fue el de la industria del cine en Hollywood. En el año 1900, la empresaria Annie Turnbo comenzó a vender tratamientos para el cabello, incluyendo alisadores de cabello, champús nutritivos y acondicionadores de cabello puerta a puerta (Angeloglou, 1970). En Los Ángeles, Max Factor comenzó a vender un maquillaje innovador a las estrellas de cine en 1904 que ni se agrietaba ni se

desquebrajaba. El año 1907, Eugene Schueller, fundador de L'Oréal inventó el primer tinte de cabello moderno y el primer protector solar en el año 1936 (Collin & Roucach, 2009).

En 1914, T J Williams fundó Maybelline, una compañía especializada en la fabricación del rímel. Después de la primera guerra mundial, la diseñadora Coco Chanel puso de moda por primera vez cosméticos como: las sombras de ojo, el lápiz labial rojo, el esmalte rojo de las uñas y el bronceado. Hasta el momento sólo los trabajadores del campo habían lucido pieles bronceada, mientras que las mujeres de la alta sociedad o las

grandes modelos habían mantenido sus pieles lo más pálidas posible. A raíz de la adopción de Chanel del bronceado, decenas de nuevos falsos productos de bronceado se produjeron para ayudar a hombres y mujeres a lograr esa tez de piel más oscura, mientras que, en Asia, el blanqueamiento de la piel continuó representando el ideal de la belleza (Tungate, 2012).

El lápiz labial fue introducido en 1915 en tubos metálicos cilíndricos. En 1922, se inventó la horquilla para sujetar el pelo corto. En 1932, Charles y Joseph Revson (distribuidores de esmaltes de uñas) y Charles Lackman (proveedor de esmalte de uñas) fundaron Revlon, que inició su actividad comercial basada en la venta de esmaltes de uñas de una amplia variedad de colores (McGill, 1989). En 1935, el maquillaje “pan cake”, fue el maquillaje profesional compacto más cubriente y utilizado en cine y teatro, que cubría cicatrices, tatuajes y vello facial. Desarrollado originalmente para parecer natural en las películas en color, fue creado por Max Factor (Basten, 2008). Los aerosoles fueron patentados en 1941, hecho que allanó el camino a los productos del cabello en dicho formato. En 1944, un farmacéutico de Miami Beach, Benjamin Green, desarrolló protectores solares para proteger a los soldados en el Pacífico Sur. Lawrence Gelb, en 1950, presentó un innovador método para teñir el cabello, “la Srta. Clairol Hair Color Bath”, que era un baño de color de fácil aplicación. El desodorante en roll-on fue lanzado en 1952. En 1958, salieron al mercado los primeros pinceles para aplicar el rímel,

eliminando la necesidad de utilizar cepillos. En 1963, Revlon ofreció el primer colorete en polvo. El desodorante en aerosol fue introducido en 1965. Durante los últimos 50 años se han ido produciendo mejoras y perfeccionamientos de dichos productos hasta conseguir la amplia gama de referencias, marcas y distribuidores de cosméticos que conocemos a día de hoy (Stevenson, 1985; Mc Gill, 1989; Basten, 2008).



### Anexo III. Patch Test.

#### Criterios específicos de inclusión

- Edad: 18 a 70 años.
- Sexo: ambos.
- Fototipo (Fitzpatrick): I a V (Tabla 3.12) (Fitzpatrick, 1988).
- Todos los tipos de piel.

Tabla 8.1 Escala dermatológica de Fitzpatrick donde se detallan los fototipos de piel en función del grado de tolerancia a la luz solar.

<b>Escala dermatológica Fitzpatrick</b>	
<b>Tipo I</b>	<b>Muy sensible a la luz solar</b>
<b>Tipo II</b>	<b>Sensible a la luz solar</b>
<b>Tipo III</b>	<b>Sensibilidad normal a la luz solar</b>
<b>Tipo IV</b>	<b>La piel tiene tolerancia a la luz solar</b>
<b>Tipo V</b>	<b>La piel es oscura y su tolerancia es alta</b>
<b>Tipo VI</b>	<b>La piel es negra y su tolerancia es altísima</b>

Todos los voluntarios correspondieron a estos criterios específicos de inclusión.

#### Criterios específicos de no inclusión

- Marcas cutáneas en el área experimental que puedan interferir en la evaluación de reacciones cutáneas (problemas de pigmentación, elementos cicatriciales, pilosidad excesivamente desarrollada, efélides y nevus en cantidad excesiva, quemaduras solares).
- Reacción eccematosa todavía visible, cicatriz o secuelas pigmentarias de ensayos previos en el área experimental.
- Alergia a la colofonia, al níquel.
- Alergia o reactividad a los productos de ensayo de la misma categoría que la probada.



- Hiperreactividad de la piel.
- Atopía.
- Reactividad al yeso adhesivo.
- Participación en más de 5 pruebas en condiciones de uso exageradas (bajo parche) dentro de los 12 meses anteriores al estudio, incluidas 3 pruebas de hipoalergenia a lo sumo.
- Exposición intensa al sol dentro del mes anterior al estudio.
- Previsión de la exposición intensa al sol o a los rayos UVA (lámparas UV) durante el período de prueba.
- Pronóstico de baño de vapor en sauna o sesiones de spa durante el período de prueba.
- La práctica intensiva o regular de uno o varios deportes cuya interrupción temporal crea dificultades.
- Tratamiento con ácido de Vitamina A o sus derivados dentro de los 3 meses previos al inicio del estudio.
- Tratamiento con corticoides tópicos en el área experimental dentro de los 8 días previos al estudio.
- Tratamiento con administración del medicamento fotoactivo (psoraleno) llamado PUVA o UVB durante el mes anterior al estudio.
- Previsión de vacunación durante el tiempo de realización de la prueba o última vacunación realizada durante las tres semanas previas al estudio.

## Anexo IV. Estudio anticelulítico

### Calendario de estudio y duración

**Pre-inclusión:** del 8 al 29 de febrero de 2016

**Comienzo del estudio:** del 7 al 11 de marzo de 2016

**Fin del estudio:** 25 de abril de 2016

A continuación, se detallan los procedimientos programados (Tabla 8.2).

Tabla 8.2 Detalle de los procedimientos programados para la realización del ensayo.

	<b>D0</b>	<b>D28 (días)</b>
<b>Medición de peso</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>Medición de la circunferencia del muslo</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>Fotografía Clínica</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>Análisis 3D de hoyuelos con FOITS</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>Análisis 3D de la textura con FOITS</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>Cuantificación de antioxidantes por autofluorescencia espectroscópica</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>Ultrasonido de alta frecuencia de 50 MHz Para evaluación de dermis y epidermis</b>	<b>X</b>	<b>X</b>

**Protocolo de estudio**

El panel de estudio se compuso de sujetos seleccionados sobre la base de su expediente médico, que accedieron a ser consultados con este fin antes del estudio, que proporciona detalles de su historial médico, posibles alergias, cuidado de la piel y los hábitos de maquillaje; así como una cierta cantidad de información administrativa.

Los procedimientos de selección se elaboraron con el fin de garantizar que los sujetos recibieran toda la información posible sobre los objetivos del estudio y las consecuencias de su participación.

**Procedimiento de selección**

Una entrevista preliminar, durante la cual se explicó a los sujetos los siguientes puntos: las modalidades del estudio, sus consideraciones prácticas, la posible recompensa, así como los posibles beneficios cosméticos, inconvenientes o riesgos potenciales. Además, se leyó el formulario de información, específico del estudio, incluyendo toda la información esencial.

También se entregó el formulario de consentimiento, que fue leído, aprobado y firmado por el sujeto para corroborar el hecho de que aceptaban libremente las condiciones del estudio, que se les había descrito. El formulario de consentimiento que fue llenado libre e intencionalmente por los sujetos les permite beneficiarse de los términos de las pólizas de seguro contratadas por el investigador y/o por el patrocinador del estudio (en este caso, Endor Nanotechnologies) tan pronto como fueron aceptados en el estudio.

Todo sujeto debió respetar las siguientes condiciones: (así como las ya mencionadas):

- Disponibilidad para toda la duración del estudio.
- Motivado a participar libremente en el estudio.
- Dispuesto a seguir el procedimiento completo de aplicación del producto.
- Capaz de justificar una dirección permanente.
- Capaz de leer los documentos de consentimiento y de aceptar las condiciones de participación.
- Beneficiarse de la cobertura médica de la Seguridad Social.

### **Criterios de inclusión**

#### **Criterios generales:**

Mujeres de entre 30 y 70 años de edad, saludables y con la piel en el área evaluada libre de psoriasis, eccema, eritema, edema, cicatrices, heridas o lesiones.

#### **Criterios específicos:**

Tener un tipo de piel de raza caucásica, con visualización de una celulitis grado 1-2 (Escala Müller) (Tabla 8.3) y haber tenido un estilo de vida estable durante los últimos tres meses.

Tabla 8.3. Escala de Müller utilizada en la clasificación de los tipos de piel de raza caucásica.

<b>Escala Müller</b>	
<b>Etapa 1</b>	No tiene hoyuelos cuando está de pie o acostada. Cuando presiona su piel, no los tiene.
<b>Etapa 2</b>	No tiene hoyuelos cuando está de pie o acostada, pero si presiona su piel, los tiene.
<b>Etapa 3</b>	Los hoyuelos están presentes espontáneamente cuando está de pie, pero no cuando está acostada
<b>Etapa 4</b>	Los hoyuelos están presentes espontáneamente cuando está de pie y acostada.

### **Criterios de no inclusión**

#### **Criterios generales:**

- Incumplimiento de los criterios de inclusión antes mencionados.
- Estar al inicio del estudio en otro examen cosmético, dermatológico o médico.
- Haber sufrido cualquier cirugía grave el año anterior o haberse sometido a una cirugía plástica en las áreas de estudio.
- Participar o tener la intención de participar en otro estudio que pueda interferir con este estudio.
- Ser diabético o asmático.
- Negarse a firmar el formulario de consentimiento.
- Estar embarazada o en periodo de lactancia durante los últimos tres meses.
- Tener la intención de quedarse embarazada durante el estudio.
- Tener la piel bronceada por el sol.

- Tener la intención de exponerse a la luz UV artificial y / o al sol durante el estudio.
- Haber cambiado sus hábitos cosméticos en los 14 días anteriores al inicio del estudio o con la intención de cambiarlos durante el estudio en las áreas afectadas.
- Tener hipersensibilidad cutánea o alergia cutánea a los productos cosméticos.
- Seguir o intentar seguir un tratamiento médico crónico que comprometa cualquiera de los siguientes productos orales: productos a base de aspirina, antiinflamatorios, antihistamínicos, cortico-terapia, antidepresivos, medicamentos contra la migraña y neurolépticos, dehidroepiandrosterona (la única medicación permitida es paracetamol).

**Criterios específicos:**

- Haber realizado una dieta de pérdida de peso o haber recibido un tratamiento cosmético en un spa en los tres meses anteriores al inicio del estudio.
- Haber comenzado, cambiado o detenido un tratamiento hormonal (Terapia hormonal de tiroides) en los últimos tres meses.
- Con la intención de iniciar, cambiar o detener un tratamiento hormonal (Terapia tiroidea) durante el estudio.
- Haber iniciado, cambiado o detenido un medio anticonceptivo oral en los últimos tres meses.
- Con la intención de iniciar, cambiar o detener un medio de anticoncepción oral durante el estudio.
- Con la intención de modificar sus hábitos deportivos durante el estudio.
- Habiendo aplicado productos reafirmantes o productos con una acción antiarrugas o antienvjecimiento o cosméticos a base de HA, ácidos de frutas, derivados o cosméticos a base de retinol en las dos semanas anteriores al inicio del estudio.

**Prohibiciones y restricciones generales**

- Cambiar los hábitos cosméticos durante el estudio.
- Los días en que se toman las mediciones, se proscribire la aplicación de cualquier otro producto cosmético y/o maquillaje, incluido el limpiador habitual y los productos ensayados a las zonas estudiadas (sólo se acepta la limpieza facial con agua).
- Durante el estudio, se proscribire la aplicación de cualquier otro producto cosmético en las áreas estudiadas (sólo se aceptan el limpiador habitual y el maquillaje para los labios, los ojos y el colorete).
- Haberse expuesto a la luz UV artificial y / o al sol durante el estudio.

**Prohibiciones y restricciones específicas**

- Haber comenzado, cambiado o detenido un tratamiento hormonal (Terapia de reemplazo hormonal de tiroides) durante el estudio.
- Haber iniciado, cambiado o detenido un medio anticonceptivo oral durante el estudio.
- Haber iniciado una dieta o tratamiento cosmético en un spa durante el estudio.
- Haber modificado los hábitos deportivos durante el estudio.

El patrón de aleatorización se detalla a continuación (Tabla 8.4).

Tabla 8.4 Patrón de aleatorización de la aplicación de cada producto en función de la voluntaria y de la pierna izquierda o derecha.

	PRODUCTO A	PRODUCTO B
<b>VOL01</b>	Izquierda	Derecha
<b>VOL02</b>	Derecha	Izquierda
<b>VOL03</b>	Izquierda	Derecha
<b>VOL04</b>	Derecha	Izquierda
<b>VOL05</b>	Izquierda	Derecha
<b>VOL06</b>	Derecha	Izquierda
<b>VOL07</b>	Izquierda	Derecha
<b>VOL08</b>	Derecha	Izquierda
<b>VOL09</b>	Derecha	Izquierda
<b>VOL10</b>	Izquierda	Derecha
<b>VOL12</b>	Derecha	Izquierda
<b>VOL13</b>	Izquierda	Derecha
<b>VOL14</b>	Derecha	Izquierda
<b>VOL15</b>	Derecha	Izquierda
<b>VOL16</b>	Derecha	Izquierda
<b>VOL17</b>	Izquierda	Derecha
<b>VOL18</b>	Derecha	Izquierda
<b>VOL19</b>	Derecha	Izquierda
<b>VOL20</b>	Derecha	Izquierda
<b>VOL21</b>	Izquierda	Derecha
<b>VOL22</b>	Derecha	Izquierda
<b>VOL23</b>	Izquierda	Derecha
<b>VOL24</b>	Derecha	Izquierda



**Consentimiento para participar en el estudio**

Se facilitó un formulario de información a cada voluntaria con todos los detalles sobre el estudio, así como:

- Objetivos, métodos, y la duración;
- Los posibles beneficios estéticos esperados, las limitaciones y riesgos potenciales;
- El período de no inclusión, el derecho de acceso a los archivos de datos y su posterior destrucción.

Esta información permitió a las voluntarias firmar su formulario de consentimiento de participación libre e inequívoca, con el conocimiento de que son plenamente conscientes de los detalles del estudio.

**Uso de la imagen**

Las voluntarias fueron informadas en el formulario de consentimiento de que el Instituto de Fotomedicina podía utilizar su imagen sin identificación directa en todo el mundo, sin límite de tiempo para este uso.

Las voluntarias también fueron informadas que el Instituto de Fotomedicina también podría proporcionar imágenes y resultados al promotor (Endor Nanotechnologies) para su publicación.

Las voluntarias que se negaron a permitir que su imagen fuera usada firmaron un formulario de rechazo de uso de imagen.

**Reglamento**

Este estudio se llevó a cabo en conformidad con las recomendaciones más recientes de la Asociación Médica Mundial (Declaración de Helsinki 1964, modificado en Seúl, Corea, 2008). Este estudio se calificó como “no intervencionista”, ya que queda fuera del código de la salud pública que define “la investigación biomédica” como cualquier investigación organizada y llevada a cabo en los seres humanos con el fin de desarrollar el conocimiento biológico y médico.

Este estudio no aplica en el ámbito de la Salud Pública relativa a la protección de los sujetos participantes en la investigación biomédica. No obstante, se ha realizado cumpliendo la ley y las Buenas Prácticas Clínicas.



## Anexo V. Soluciones

# PBS 10X

Reactivo	Concentración	Vol. (1 L)	Proveedor
NaCl	1,4 M	80 g	Sigma-Aldrich
KCl	27 mM	2 g	Sigma-Aldrich
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	102 Mm	14,4 g	Sigma-Aldrich
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mM	2,4 g	Sigma-Aldrich

Llevar el volumen ta 1L con agua destilada (dH<sub>2</sub>O) y ajustar el pH a 7,4.  
Dilución de uso: 1X.

# Viabilidad Celular

<b>Substrato HEX</b>			
Reactivo	Concentración	Vol. (100 mL)	Proveedor
HEX	7,5 Mm	0,128 g	Sigma-Aldrich
Citrato de sodio	0,1 M	1,47 g	Sigma-Aldrich
Triton-X	0,25%	250 ul	Sigma-Aldrich

Disolución del HEX & Citrato de sodio en 40 mL de dH<sub>2</sub>O.  
Se añade el Triton-X, se ajusta el pH a 5 y se lleva a volume final de 50 mL.  
El Triton-X se disuelve en los 50 mL de dH<sub>2</sub>O.  
La solución se esteriliza por filtración y se guarda a -20 °C hasta su uso.

<b>Revelador HEX</b>			
Reactivo	Concentración	Vol. (200 mL)	Proveedor
Glicina	50 Mm	0,75 g	Sigma-Aldrich
EDTA	5 Mm	0,292 g	Sigma-Aldrich

Se disuelve de la Glicina en 180 mL de dH<sub>2</sub>O y se ajusta el pH a 10,4.  
Se disuelve el EDTA en la solución de glicina y se ajusta el volumen a 200 mL.  
La solución se esteriliza por filtración y se guarda a -20 °C hasta su uso

# Ensayo de mutagénesis de Ames

<b>Medio nutritivo</b>		
<b>Reactivo</b>	<b>Vol. (200 mL)</b>	<b>Proveedor</b>
Extracto bobino	2,5 g	Sigma-Aldrich
Peptona	5 g	Sigma-Aldrich
NaCl	2,5 g	Sigma-Aldrich
Agar (para medio sólido)	7,5 g	Sigma-Aldrich

Se lleva a volumen de 500 mL de dH<sub>2</sub>O y se ajusta el pH a 7,2.  
Se autoclava y se guarda a temperatura ambiente (RT) en oscuridad.

<b>Placas de agar glucosa mínima (GM)</b>		
<b>Reactivo</b>	<b>Vol. (1 L)</b>	<b>Proveedor</b>
Agar (en 900 mL dH <sub>2</sub> O)	15 g	Sigma-Aldrich
Solución salina VB (50X)	20 mL	-
Solución de glucosa (10% v/v)	50 mL	-

Se autoclava el agar y el dH<sub>2</sub>O.  
Se añade la solución VB y la solución de glucosa estériles.  
Se dispensa en placas y se guarda a 4 °C.

<b>Placas de agar glucosa mínima (GM)</b>		
<b>Reactivo</b>	<b>Vol. (100 mL)</b>	<b>Proveedor</b>
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	1 g	Sigma-Aldrich
Ácido cítrico anhidrido	9,14 g	Sigma-Aldrich
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 g	Sigma-Aldrich
NaNH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub>	17,5 g	Sigma-Aldrich

Se añaden los ingredientes siguiendo el orden indicado en un volumen de 65 mL de dH<sub>2</sub>O.  
Se añade lleva la solución a 100 mL de dH<sub>2</sub>O.  
Se autoclava y se guarda a RT.

---

**Solución de glucosa (10%, v/v)**

<b>Reactivo</b>	<b>Vol. (100 mL)</b>	<b>Proveedor</b>
Dextrosa	10 g	Sigma-Aldrich

Se lleva la solución a 100 mL de dH<sub>2</sub>O.  
Se autoclava y se guarda a 4 °C.

---

**Solución de biotina (0,01%, m/v)**

<b>Reactivo</b>	<b>Vol. (100 mL)</b>	<b>Proveedor</b>
D-biotina	1 mg	Sigma-Aldrich

Se lleva la solución a 100 mL de dH<sub>2</sub>O.  
Se esteriliza por filtración (filtro de 0,45 µM) y se guarda a 4 °C.  
Para hacer un exceso de biotina en las placas de GM, se añaden 8 mL de la solución en la solución de GM.

---

**Solución de histidina (0,5%, m/v)**

<b>Reactivo</b>	<b>Vol. (100 mL)</b>	<b>Proveedor</b>
L-bistidina	50 mg	Sigma-Aldrich

Se lleva la solución a 100 mL de dH<sub>2</sub>O.  
Se autoclava y se guarda a 4 °C.  
Para hacer un exceso de histidina en las placas de GM, se añaden 8 mL de la solución en la solución de GM.

---

**Solución de ampicilina (0,8%, m/v)**

<b>Reactivo</b>	<b>Vol. (100 mL)</b>	<b>Proveedor</b>
Ampicilina	8 mg	Sigma-Aldrich

Se lleva la solución a 100 mL de dH<sub>2</sub>O.  
Se esteriliza por filtración (filtro de 0,45 µM) y se guarda a 4 °C.  
Para hacer las placas de GM con ampicilina, se añaden 3 mL en la solución de GM.

**Solución de triptófano**

Reactivo	Concentración	Proveedor
Triptófano	0,05 mM	Sigma-Aldrich

Se lleva la solución a 100 mL de dH<sub>2</sub>O.

Se esteriliza por filtración (filtro de 0,45  $\mu$ M) y se guarda a 4 °C.

Para hacer las placas de GM con triptófano, se añaden 3 mL en la solución de GM.

**Solución de *Top agar* suplementado con histidina/biotina**

Reactivo	Vol. (1 L)	Proveedor
Agar (en 900 mL dH <sub>2</sub> O)	6 g	Sigma-Aldrich
NaCl	6 g	Sigma-Aldrich
Solución de histidina/biotina (0,5 mM)	100 mL	-

Se autoclava el agar y el NaCl en 900 mL de dH<sub>2</sub>O.

Se añade la solución de histidina/biotina esterilizada por filtración.

**Solución de histidina/biotina (0,5 mM)**

Reactivo	Vol. (100 mL)	Proveedor
D-biotina	12,4 mg	Sigma-Aldrich
L-histidina	9,6 mg	Sigma-Aldrich

Se el hierven 100 mL de dH<sub>2</sub>O.

Se esteriliza la solución por filtración (filtro de 0,45  $\mu$ M) y se guarda a 4 °C.

**Solución cristal violeta (0,1%, m/v)**

Reactivo	Vol. (100 mL)	Proveedor
Cristal violeta	100 mg	Sigma-Aldrich

Se lleva la solución a 100 mL de dH<sub>2</sub>O.

Se esteriliza por filtración (filtro de 0,45  $\mu$ M) y se guarda a RT.

---

# Ensayo de genotoxicidad del Cometa

---

---

## Buffer de lisis

Reactivo	Concentración	Vol. (1 L)	Proveedor
NaCl	2,5 M	146,1 g	Sigma-Aldrich
Na <sub>2</sub> EDTA	0,1 M	37,2 g	Sigma-Aldrich
Tris	10 mM	1,21 g	Sigma-Aldrich

---

Se diluyen el NaCl, el Na<sub>2</sub>EDTA y el Tris en 1 L de dH<sub>2</sub>O.  
Se ajusta el pH a 10 y se guarda a 4 °C.  
Justo antes de ser usado, añadir 1 mL / 100 mL Triton-X.

---

## Electroforesis alcalina

Reactivo	Concentración	Vol. (1 L)	Proveedor
NaOH	0,3 M	12 g	Sigma-Aldrich
EDTA	1 mM	0,29 g	Sigma-Aldrich

---

Se diluyen el NaOH, el EDTA en 1 L de dH<sub>2</sub>O.  
Se ajusta el pH a 13 y se guarda a 4 °C.

---

## Buffer de neutralización

Reactivo	Concentración	Vol. (1 L)	Proveedor
Tris	0,4 M	44,88 g	Sigma-Aldrich

---

Se diluyen el Tris en 1 L de dH<sub>2</sub>O.  
Se ajusta el pH a 7,5 y se guarda a 4 °C.

---





# APÉNDICES

---



## 9. APÉNDICES

### 9.1 Apéndice I. CV

**RAFAEL MIÑANA PRIETO**

Nacido el 18 de Mayo de 1987 en Amposta (Tarragona)

Calle Corbera nº 5, 08758 Cervelló (Barcelona)

651479498

[rafael.minyanaprieto@gmail.com](mailto:rafael.minyanaprieto@gmail.com)



#### FORMACIÓN ACADÉMICA

**Doctorado en Biomedicina, Biología Molecular y Bioquímica (Defensa de tesis octubre 2017).** Nanosistemas Avanzados para aplicaciones cosméticas y dermatológicas.

Universidad Autónoma de Barcelona.

**2012 Máster en Genética Avanzada.** Universidad Autónoma de Barcelona.

**2011 Licenciado en Biología.** Genética Molecular y Biología Celular.

Universidad Autónoma de Barcelona.

#### PERFIL PROFESIONAL

Doctorando en nanobiomedicina aplicada a la cosmética y dermatología por la Universidad Autónoma de Barcelona. Manager de laboratorio en descubrimiento de fármacos a través de pez cebra. Amplios conocimientos en el campo bioquímico, concretamente en la producción, caracterización y calidad de principios activos para aplicaciones biomédicas, dermatológicas, cosméticas y textiles. Experiencia en ensayos toxicológicos preclínicos.

Me considero una persona versátil, con aptitud de liderazgo y con capacidad para trabajar en equipo.

#### EXPERIENCIA PROFESIONAL

Noviembre 2015 – Actualidad. Cargo: **Laboratory Manager "Drug Discovery"**.

Empresa: **ZELUNCS SL**. Parc de Recerca Biomédica de Barcelona (PRBB).

● **Responsable de laboratorio:**

Responsable de la gestión del laboratorio y soporte del Director de I+D en la coordinación del equipo científico para la realización de ensayos preclínicos.

Supervisión, diseño y aprobación de técnicas aplicadas a ensayos preclínicos.

Realización y gestión de informes, reportando los resultados al Project Manager y al director de I+D.

Realizando formación como director de estudios GLP.

Junio 2012 – Octubre 2015. Cargo: **Estudiante de doctorado y responsable de validación in vitro: área cosmética y dermatológica.** Empresa: **ENDOR**

**NANOTECHNOLOGIES.** Parc Científic de Barcelona.

● **Desarrollo de principios activos para aplicaciones cosméticas y dermatológicas:**

Estudios in-vitro/in-vivo de toxicidad, absorción dérmica, irritabilidad, eficacia y acumulación.

Monitorización y supervisión estudios clínicos de seguridad y eficacia en voluntarias.

Elaborar, reportar y gestionar las guías de fabricación y calidad de los productos sintetizados cumpliendo la legislación vigente.

Realización protocolos de ética animal para investigación científica.

Realización de dosieres de registro a nivel nacional y europeo (EMA) y FDA.

● **Nanomateriales:**

Producción, escalado, trazabilidad y calidad de principios activos para aplicaciones biomédicas, dermatológicas y cosméticas. Modificación de moléculas orgánicas y conjugación a Nanopartículas metálicas.

**Técnicas caracterización y técnicas analíticas:** RMN, ICP-MS, CG, AEO, DLS, UV-Vis, IR, espectrofotometría, Potencial Zeta, liofilización, electroforesis en gel de agarosa, dialización y microscopía óptica, electrónica y fluorescencia.

Octubre 2011 – Junio 2012. Cargo: **Investigador en formación**. Empresa: **HOSPITAL UNIVERSITARIO VALL D'HEBRON**. CIBBIM Nanomedicina - Drug delivery and targeting.

- Estudios de preclínica no regulada in-vitro/in-vivo con Células Madre Cancerígenas (CSC).
- Ensayos de Citotoxicidad, Citometría de flujo, formación de Colonias, Transfección, IC50.
- Cultivos de CSC (líneas de colon y mama).
- Análisis de resultados y estudios estadísticos.

09/2009 a 04/2010 Cargo: **Dirección del departamento de calidad**. Empresa: Laboratorios **BIOSKIN & COSMETICS** (Cerdañola del Vallés).

- Control de calidad de la producción: producto acabado y producto envasado.  
Análisis: Físicoquímicos, Organolépticos y microbiológicos.
- Trazabilidad y Realización de certificados bajo normativa GMP.

## **PUBLICACIONES**

- **ZeGlobalTox: An Innovative Approach to Address Organ Drug Toxicity Using Zebrafish.**  
*Carles Cornet, Simone Calzolari, Rafael Miñana-Prieto, Sylvia Dyballa, Els van Doormmalen, Helma Rutjes, Thierry Savy, Davide D'Amico, and Javier Terriente.*  
*Int. J. Mol. Sci. 2017, 18(4), 864; doi:10.3390/ijms18040864*
- **Fluorescent CSC models evidence that targeted nanomedicines improve treatment sensitivity of breast and colon cancer stem cells.**  
*Petra Gener, Luis Pleno Gouveia, Guillem Romero Sabat, Diana Fernandes de Sousa Rafael, Núria Bergadà Fort, Alexandra Arranja, Yolanda Fernández, Rafael Miñana Prieto, Joan Sayos Ortega, Diego Arango, Ibane Abasolo, Mafalda Videira, Simo Schwartz Jr.*  
Editor: B. Mark Evers, MD  
2015. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine
- **Nanomedicine The New Age of Therapeutics.**  
*Luciano Sobrevalls, Hanna Parkkola, Laura Vivero, Rafa Miñana and Judith Sendra.*  
*Libro: Nanotechnology: Recent Trends, Emerging Issues and Future Directions.*  
*Editores: Nazrul Islam.*  
2014. Nova Science Publishers, Inc.

## **PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS (PRESENTACIÓN DE POSTERS)**

2016. **“ZeGlobalTox, a new way for global toxicity assessment”**

*Cornet C, Miñana R, Calzolari S, D'Amico D, Terriente J.*

*Congreso Eurotox, Sevilla.*

2015. **“Golden Hyaluronan: an active ingredient for dermatological applications”**

*Miñana R, Vivero L, Sobrevalls L, Sendra J.*

*1st Congress of Nanotechnology. Autonomous University of Barcelona.*

2014. **“Targeted nanomedicine against cancer stem cells improve treatment sensitivity”**

*Gener P, Rafael D, Sofia A, Miñana R, Perez A, Sarkany V, Abasolo I, Arranja A, Gouveia L, Gaspar R.S, Videira M, Schwartz S. Jr.*

*2nd EuroNanoMed Review seminar for funded projects and Training workshop on regulatory affairs for funded partners, Düsseldorf.*

2012. **“New in vitro and in vivo models for testing the efficacy of cancer stem cell targeted nanomedicines”**

*Gener P, Miñana R, Bergadà N, López M<sup>a</sup> E, Abasolo I, Schwartz S. Jr.*

*First Workshop on NanoMedicine UAB-CEI - UABBarcelona*

### IDIOMAS

- Inglés: Certificado Oficial Toefl Exam (79 puntos).
- Catalán y castellano: Nivel nativo.

### INFORMÁTICA

- Paquete Office: nivel avanzado: Word, Excel, Acces, Powerpoint.
- Programas Estadísticos: SPSS, GRAPH PAD PRISM, IMAGEJ.
- Herramientas bioinformáticas: PUBMED, GENE BANK, CLUSTALW, NETPRIMER, BLAST.

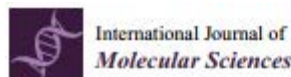
### FORMACIÓN COMPLEMENTARIA

- 2014** **On-line Course on Drug Discovery, Development and Commercialization of Therapeutic Drugs.** Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (SSPPS) at the University of California, San Diego (UC San Diego).
  - 2012** **Curso de Diseño y Dirección de experimentos con animales de laboratorio. Nivel C Investigador 80 h.** Universidad Miguel Hernández de Alicante.
  - 2012** **4º Curso Mención en estudios en Inglés profesional. Facultat de Filosofia y Letras.** Universidad Autónoma de Barcelona.
- Titulación en Primeros Auxilios. CRUZ ROJA ESPAÑOLA.
  - Patrón de Embarcación de Recreo.
  - Técnico deportivo especialista en Esgrima.
  - Carnet de conducir y vehículo propio.

### CARRERA DEPORTIVA PROFESIONAL (2001-2012)

- Miembro Selección Española y Catalana de Esgrima en CAR de Sant Cugat. (2001-2012). Deportista de Alto Rendimiento.
- Mundialista 2003/2004, 2006/2007. 9º Clasificado Campeonato del Mundo Taebaek 2007 (Corea del Sur). Finalista Copa del Mundo Laupheim 2008 (Alemania).
- Campeón de España y Catalunya en todas las categorías.

## 9.2 Apéndice II. Publicaciones



International Journal of  
*Molecular Sciences*



Article

### ZeGlobalTox: An Innovative Approach to Address Organ Drug Toxicity Using Zebrafish

Carles Cornet <sup>1,†</sup>, Simone Calzolari <sup>1,†</sup>, Rafael Miñana-Prieto <sup>1</sup>, Sylvia Dyballa <sup>1</sup>,  
Els van Doormmalen <sup>2</sup>, Helma Rutjes <sup>2</sup>, Thierry Savy <sup>3</sup>, Davide D'Amico <sup>1,\*</sup> and Javier Terriente <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> ZeClinics SL, PRBB (Barcelona Biomedical Research Park), 08003 Barcelona, Spain; carles.cornet@zeclinics.com (C.C.); simone.calzolari@zeclinics.com (S.C.); rafael.minana@zeclinics.com (R.M.-P.); sylvia.dyballa@zeclinics.com (S.D.)

<sup>2</sup> Pivot Park Screening Centre (PPSC), Kloosterstraat 9, 5349AB OSS, The Netherlands; els.vandoormmalen@ppscreeningcentre.com (E.v.D.); helma.rutjes@ppscreeningcentre.com (H.R.)

<sup>3</sup> Multilevel Dynamics in Morphogenesis Unit, USR3695 CNRS, 91190 Gif sur Yvette, France; thierry.savy@polytechnique.edu

\* Correspondence: davide.damico@zeclinics.com (D.D.A.); javier.terriente@zeclinics.com (J.T.); Tel.: +34-93-3160908 (D.D.A. & J.T.)

† These authors contributed equally to this work.

Academic Editor: Juliette Legler

Received: 1 March 2017; Accepted: 14 April 2017; Published: 19 April 2017

**Abstract:** Toxicity is one of the major attrition causes during the drug development process. In that line, cardio-, neuro-, and hepatotoxicities are among the main reasons behind the retirement of drugs in clinical phases and post market withdrawal. Zebrafish exploitation in high-throughput drug screening is becoming an important tool to assess the toxicity and efficacy of novel drugs. This animal model has, from early developmental stages, fully functional organs from a physiological point of view. Thus, drug-induced organ-toxicity can be detected in larval stages, allowing a high predictive power on possible human drug-induced liabilities. Hence, zebrafish can bridge the gap between preclinical in vitro safety assays and rodent models in a fast and cost-effective manner. ZeGlobalTox is an innovative assay that sequentially integrates in vivo cardio-, neuro-, and hepatotoxicity assessment in the same animal, thus impacting strongly in the 3Rs principles. It Reduces, by up to a third, the number of animals required to assess toxicity in those organs. It Refines the drug toxicity evaluation through novel physiological parameters. Finally, it might allow the Replacement of classical species, such as rodents and larger mammals, thanks to its high predictivity (Specificity: 89%, Sensitivity: 68% and Accuracy: 78%).

**Keywords:** ZeGlobalTox; zebrafish; high-throughput; adverse drug reaction; drug toxicity; cardiotoxicity; neurotoxicity; hepatotoxicity



BASIC SCIENCE

Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine  
11 (2015) 1883–1892



Feature Article

nanomedjournal.com

## Fluorescent CSC models evidence that targeted nanomedicines improve treatment sensitivity of breast and colon cancer stem cells

Petra Gener, PhD<sup>a,b</sup>, Luis Pleno Gouveia, MSc<sup>c</sup>, Guillem Romero Sabat, MSc<sup>a</sup>,  
Diana Fernandes de Sousa Rafael, MSc<sup>a,c</sup>, Núria Bergadà Fort, MSc<sup>a</sup>, Alexandra Arranja, MSc<sup>c</sup>,  
Yolanda Fernández, PhD<sup>a,b,d</sup>, Rafael Miñana Prieto, MSc<sup>a</sup>, Joan Sayos Ortega, PhD<sup>b,e</sup>,  
Diego Arango, PhD<sup>b,f</sup>, Ibane Abasolo, PhD<sup>a,b,d</sup>, Mafalda Videira, PhD<sup>c</sup>, Simo Schwartz Jr.MD, PhD<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Drug Delivery and Targeting Group, CIBBIM Nanomedicine, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Barcelona, Spain

<sup>b</sup>Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Barcelona, Spain

<sup>c</sup>Mat.U.Lisboa, Research Institute for Medicines, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

<sup>d</sup>Functional Validation and Preclinical Studies (FVPR), CIBBIM Nanomedicine, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Barcelona, Spain

<sup>e</sup>Immunobiology Group, CIBBIM Nanomedicine, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Barcelona, Spain

<sup>f</sup>Molecular Oncology Group, CIBBIM Nanomedicine, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Barcelona, Spain

Received 2 June 2015; accepted 13 July 2015

### Abstract

To be able to study the efficacy of targeted nanomedicines in marginal population of highly aggressive cancer stem cells (CSC), we have developed a novel *in vitro* fluorescent CSC model that allows us to visualize these cells in heterogeneous population and to monitor CSC biological performance after therapy. In this model the Tomato reporter gene is driven by CSC specific (ALDH1A1) promoter and contrary to other similar models, CSC differentiation and un-differentiation processes are not restrained and longitudinal studies are feasible. We used this model for preclinical validation of poly[(D,L-lactide-co-glycolide)-co-PEG](PLGA-co-PEG) micelles loaded with paclitaxel. Further, active targeting against CD44 and EGFR receptors was validated in breast and colon cancer cell lines. Accordingly, specific active targeting toward surface receptors enhances the performance of nanomedicines and sensitizes CSC to paclitaxel based chemotherapy.

**From the Clinical Editor:** Many current cancer therapies fail because of the failure to target cancer stem cells. This surviving population soon proliferates and differentiates into more cancer cells. In this interesting article, the authors designed an *in vitro* cancer stem cell model to study the effects of active targeting using antibody-labeled micelles containing chemotherapeutic agent. This new model should allow future testing of various drug/carrier platforms before the clinical phase.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Key words:** Cancer stem cells; Active targeting; Nanomedicine



In: Nanotechnology  
Editor: Nazrul Islam

ISBN: 978-1-63117-561-9  
© 2014 Nova Science Publishers, Inc.

*Chapter 18*

## **NANOMEDICINE: THE NEW AGE OF THERAPEUTICS**

*Luciano Sobrevals<sup>1</sup>, Hanna Parkkola<sup>1</sup>, Laura Vivero<sup>1</sup>,  
Rafael Miñana<sup>1</sup> and Judith Sendra<sup>1,\*</sup>*

<sup>1</sup>ENDOR Nanotechnologies, Parc Científic de Barcelona (PCB), Barcelona, Spain

### **ABSTRACT**

Nanotechnology is a relatively recent field of scientific research. Richard Feynman first propounded the concept in 1959. An official definition of nanotechnology is still a controversial issue and there are many scientific committees hard at work to harmonize the term and obtain universal regulation. There are enormous expectations with regard to the potential for nanotechnology in many different scientific fields. Over the last ten years, a large number of potential applications for nanotechnology have been described, most especially in the fields of biology, biotechnology and medicine. The term nanomedicine is used to describe the medical application of nanotechnology in the diagnosis, prevention and treatment of several diseases. Such applications have led to significant advances in clinical areas such as oncology (nanoncology), neuroscience, cardiovascular disease and many others. Nanomedicine has the potential to improve the efficiency of existing drugs while reducing their side effects, to create new therapeutic systems, to enhance diagnosis to achieve higher levels of detection, to create new scaffolds for tissue regeneration and to create internal surveillance systems in order to avoid the development of disease. With the great potential of nanotechnology it is expected to have significant impact, both on an economic and technological level. However, concerns about possible toxicity and certain ethical issues are delaying the launch of this promising new technology. The purpose of the present review is to highlight new findings in the field of nanomedicine, most especially in the area of oncology, and to describe its major benefits, possible risks and current regulations, as well as to enumerate some of the nanomaterials developed up to now. Additionally we discuss future prospects for the development of certain emerging nanotechnologies and their potential contributions to medicine and market impact will be discussed.

\* Correspondence should be addressed to: Judith Sendra, Baldiri Reixac 15, Edifici Hèlix, Parc Científic de Barcelona (08028), Barcelona, Spain; phone: +34 934 020 468; E-mail: judith.sendra@endornanotech.com.

### 9.3 Apéndice III. Póster



## GOLDEN HYALURONAN: an active ingredient for cosmetic applications



Rafael Miñana, Laura Vivero, Luciano Sobrevals, Judith Sendra  
 Endor Nanotechnologies, Helix Building, Parc Científic de Barcelona, Baldri Reixac 15, 08028 Barcelona, Spain  
 Contact: rafael@endornanotech.com, laura.vivero@endornanotech.com, judith.sendra@endornanotech.com

**Introduction**

Hyaluronan (HA) is a glycosaminoglycan with a wide range of biological roles, such as being a key structural component of extracellular matrix and an important mediator in cell adhesion and migration. Nowadays, HA is recognized as a high-valuable polymer with several marketed applications in both **biomedical and cosmetic industries**. HA is a common ingredient in skin-care products. It immobilizes water in skin tissue and thereby affects dermal volume and compressibility. HA also plays the role of a scavenger of free radicals generated by the ultraviolet rays from sunlight and is critical to the structural integrity of the dermal collagen matrix.

Golden hyaluronan (GH) is a nanoconjugate composed of a 12 nm gold nanoparticle (NP) core and a hyaluronic acid shell (Figure 1). HA is responsible for the effect of the active ingredient and NPs are used as a carrier molecule to enhance HA delivery. Besides having skin rejuvenating actions, HA renders the NP more biocompatible and prevents aggregation and formation of clusters.

**Active ingredient**

GH was thoroughly characterized after synthesis. NP size was determined by TEM and DLS; stability of GH and bare nanoparticles was studied in saline buffers by observing change of color and by light microscope. State of agglomeration was also inspected by TEM. The effects of GH were studied on a molecular level *in vitro*. Human dermal fibroblasts (HDF) and keratinocytes (HaCat) were treated with GH for 8- 24 - 72 hrs and expression of hyaluronan synthase 2 (HAS2) and collagen 3 (Col) synthase were quantified by RT-PCR. HA production that resulted from GH exposure was studied by radioactively labelled glucosamine-H3, a basic compound of HA structure, and the quantity of newly prepared radioactive HA was determined. All *in vitro* experiments were also performed with HA not conjugated to NPs.

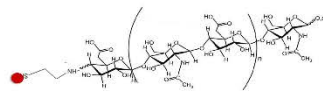


Figure 1. Structure of Golden Hyaluronan

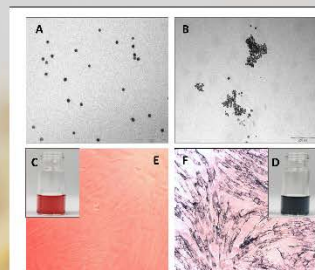


Figure 2. Visualization of dispersed GH & aggregated bare NPs. TEM images showed GH size and dispersed state (A) and aggregated bare NPs in saline buffer (B). The color of dispersed GH is burgundy and when NPs are aggregated color turns to blue (D). Dispersed GH cannot be visualized by light microscope in cell culture (E), but when NPs aggregate they form larger cluster that become visible (F).

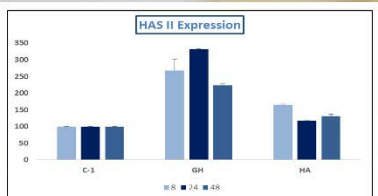


Figure 3. Hyaluronan synthase 2 expression after exposure to HA and GH was measured by RT-PCR in human keratinocytes. Compared to basal level (control) GH increased HAS2 expression by more than 200%. HA without NPs didn't have such effect to HAS2 expression.

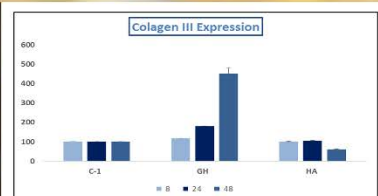


Figure 4. Collagen 3 synthase expression after treating with GH and HA was studied by RT-PCR in human dermal fibroblasts. GH increased expression above 300% compared to the basal level (i.e. cells without treatment) while HA alone didn't show any effect in Col3 expression.

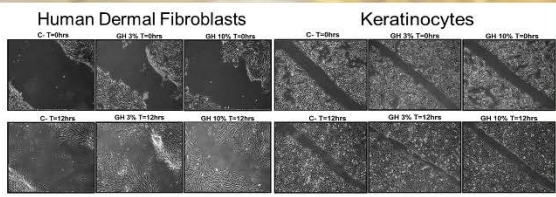


Figure 5. Hyaluronan synthase 2 expression after exposure to HA and GH was measured by RT-PCR in human keratinocytes. Compared to basal level (control) GH increased HAS2 expression by more than 200%. HA without NPs didn't have such effect to HAS2 expression.

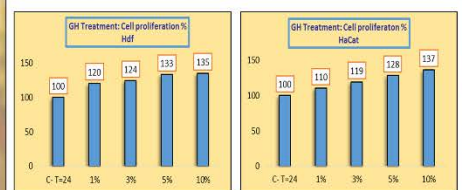


Figure 6. Natural HA production was studied by a radiometric assay. HA production by human dermal fibroblasts was more than 170-fold after both HA and GH treatment, HA exposure resulting in a slightly higher production than GH. Data provided by Advance.

**Effect**

GH exhibited a spherical, unanimous shape. Bare NPs aggregated in saline buffers which was seen as colour change from burgundy to blue, and when cells were treated with bare and HA-coated NPs in DMEM, clusters of aggregated bare NPs could be seen with light microscope whereas GH maintained their dispersed state. Aggregated NP clusters were also visualized by TEM (Figure 2).

HAS2 expression increased more than 200% after GH treatment while treatment with HA alone didn't have such effect on HAS2 expression (Figure 3). Col3 synthase expression that resulted from HA treatment induced a more than 300-fold increase than the basal level (Figure 4). GH stimulated both cell migration (Figure 5) and cell proliferation (Figure 6).

**References**

Juhlin. Hyaluronan in skin. J Intern Med. 1997 Jul;242(1):61-6.  
 Meyer & Stern. Age-dependent changes of hyaluronan in human skin. J Invest Dermatol. 1994 Mar;102(3):385-9.  
 Volpi et al. Role, Metabolism, Chemical Modifications and Applications of Hyaluronan. Curr Med Chem 2009;16(14):1718-45.

**Applications**

GH increases HA production and collagen synthesis.

Due to its hydrating, skin regenerating and anti-aging properties, GH can be used as a platform technology for different applications in the cosmetics sector.





