



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

**FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y
TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA
(PROGRAMA DE DOCTORADO EN FARMACIA)**

TESIS DOCTORAL

**DISEÑO, DESARROLLO Y
CARACTERIZACIÓN DE FORMAS DE
DOSIFICACIÓN TÓPICAS FRENTE A LA
AMENAZA NRBQ: AGENTES
RADIOLÓGICOS**

José Luis Soriano Ruiz

Febrero 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: José Luis Soriano Ruiz
ISBN: 978-84-1306-144-3
URI: <http://hdl.handle.net/10481/55460>

Este trabajo ha sido desarrollado en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Granada y en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Físicoquímica de la Universidad de Barcelona

RESUMEN

La piel, en su función como órgano de primera línea de defensa y barrera con el medio circundante va a ser, en la gran mayoría de los casos, la principal afectada por la interacción con la alta energía de las radiaciones ionizantes, apareciendo por tanto, una serie de lesiones radio-inducidas y entre ellas úlceras o quemaduras. En este contexto, la infección es uno de los principales factores que impide la evolución fisiológica de la cicatrización de las heridas, teniendo un origen fúngico en muchas ocasiones, y siendo el clotrimazol uno de los fármacos más utilizados a nivel tópico en estos casos. Igualmente, la interacción de la alta energía de la radiación ionizante va a producir a nivel celular un alto estrés oxidativo que no va a poder ser neutralizado por los antioxidantes endógenos, por lo que el tratamiento con antioxidantes como las vitaminas A, D y E podrían reducir estos efectos. Sin embargo, los avances más recientes en el tratamiento de heridas producidas por la exposición a las radiaciones ionizantes están orientados al uso de células madre mesenquimales como estrategia para promover la regeneración del tejido dañado en lesiones crónicas.

Aparte del importante papel que desempeñan los principios activos en el tratamiento de esta tipología de lesión, los sistemas de transporte y liberación de estos principios activos deben poseer una serie de propiedades para aumentar la eficacia y disminuir la toxicidad del tratamiento. En este sentido, las nanoemulsiones, emulsiones múltiples, hidrogeles termosensibles y *scaffold*-hidrogel constituyen sistemas de vehiculización de principios activos con grandes perspectivas de futuro, debido a sus numerosas propiedades y aplicaciones.

Así, el principal objetivo de esta investigación es el diseño, desarrollo y caracterización de una nanoemulsión y una emulsión múltiple como sistemas de liberación de clotrimazol en piel y mucosas, el diseño, desarrollo y caracterización de un hidrogel termosensible portador de diferentes activos antioxidantes (vitaminas A, D y E), y el diseño, desarrollo y caracterización de un *scaffold*-hidrogel como plataforma para células madre mesenquimales.

Los resultados obtenidos permiten demostrar que los sistemas emulsionados (nanoemulsiones y emulsiones múltiples) son capaces de aportar mayor cantidad de fármaco en la piel y mucosas que sus referencias comerciales y por tanto ejercer una mayor acción farmacológica en el lugar

de acción o biofase. El gel termosensible demostró tener una eficacia terapéutica similar a la referencia comercial con la que se comparó en los estudios *in vivo*, aportando además, todas las ventajas de aplicación que conlleva sus propiedades termosensibles. Por último el *scaffold*-hidrogel demostró ser una plataforma eficaz proporcionando un nicho apropiado para la viabilidad celular de células madre mesenquimales, y por tanto asegurar el efecto terapéutico de éstas.

A mi abuelo Enrique
(In Memoriam)

Agradecimientos

Mi total agradecimiento a todas las personas que me han ayudado a conseguir una meta más en mi vida, a costa de forma tan generosa de su tiempo, esfuerzo y conocimiento.

Mi profundo agradecimiento a mi tutora y también directora, la Dra. Beatriz Clares Naveros, de la Universidad de Granada, y sin la cual, sencillamente esta tesis doctoral no se hubiera llevado a cabo, y que desde hace ya algunos años viene planificando, poniendo a mi disposición absolutamente todo su tiempo y conocimiento, y sobre todo por su persistencia y entusiasmo, su gran esfuerzo y sacrificio, pero sobre todo por su casi infinita paciencia conmigo.

De la misma forma transmito mi total agradecimiento a mi también directora la Dra. Ana Cristina Calpena Campmany, de la Universidad de Barcelona, por su compromiso, diligencia, predisposición, creatividad y profundo conocimiento, todo ello puesto a mi servicio. Pero, lo que es aún más importante, su cercanía, su bondad y generosidad.

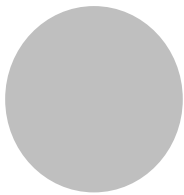
A la Dra. Lyda Halbout Bellowá, de la Universidad de Barcelona por su inestimable ayuda y colaboración en los estudios reológicos que tan enrevesados y complicados de interpretar son la mayoría de las veces, pero sobre todo por su cercanía, amistad, generosidad y gentileza.

Al Dr. Joaquim Suñer Carbó, de la Universidad de Barcelona, por su plena disposición a cualquier hora del día sin importar si era fiesta o no, estuviese con su familia o no, mil gracias.

También debo agradecer a la Dra. Patricia Gálvez Martín de Bioibérica, su total y plena disposición desde el primer momento con el manejo y estudio de células madre, haber contado contigo es un orgullo.

A la Dra. Nuria Bozal de Febrer de la Universidad de Barcelona por su magnífica ayuda en los ensayos microbiológicos realizados en el presente trabajo.

A la Dra. Marcelle Abreu por su inestimable ayuda en los últimos estudios realizados, así como, a Noelia Pérez por estar siempre dispuesta a echar una mano para que este trabajo saliera adelante, muchas gracias.



ÍNDICE

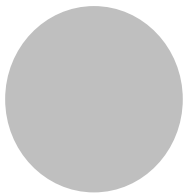
ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	7
I.1. Agentes NRBQ	9
I.1.1. Agentes Nucleares	10
I.1.2. Agentes Biológicos	11
I.1.3. Agentes Químicos	13
I.2. Agentes Radiológicos	17
I.2.1. Radiaciones Ionizantes.....	20
I.2.1.1. Tipos de Radiaciones Ionizantes	21
I.2.1.2. Magnitudes de Medida de Dosis de las Radiaciones Ionizantes.....	24
I.2.1.3. Vías y Mecanismos de Contaminación	27
I.2.1.4. Factores en la Acción Biológica de las Radiaciones Ionizantes	30
I.2.1.5. Efectos Biológicos de las Radiaciones Ionizantes	34
I.2.1.5.1. Síndrome de Radiación Agudo	34
I.2.1.5.2. Efectos a Largo Plazo	36
I.3. Síndrome de Radiación Cutánea	39
I.3.1. Efectos Cutáneos de las Radiaciones Ionizantes.....	42
I.3.1.1. Efectos Cutáneos Agudos	42
I.3.1.2. Efectos Cutáneos a Largo Plazo	43
I.4. Fisiología de la Herida	45
I.4.1. Quemaduras por Radiaciones Ionizantes.....	48
I.5. Terapia Farmacológica del Daño Cutáneo Radio-Inducido	51
I.5.1. Clotrimazol.....	53
I.5.1.1. Propiedades Fisicoquímicas	55
I.5.1.2. Mecanismo de Acción	56

I.5.1.3. Propiedades Farmacocinéticas	56
I.5.1.4. Efectos Secundarios	57
I.5.2. Antioxidantes	58
I.5.2.2. Vitamina A	58
I.5.2.3. Vitamina D	60
I.5.2.4. Vitamina E	62
I.6. Nuevas Formas de Dosificación para el Tratamiento	
Farmacológico del Daño Radio-Inducido.....	64
I.6.1. Nanoemulsiones	64
I.6.1.1. Tipos de Surfactantes	67
I.6.1.2. Fase Oleosa	68
I.6.1.3. Métodos de Elaboración de las Nanoemulsiones	70
I.6.1.4. Estabilidad de las Nanoemulsiones.....	73
I.6.1.5. Ventajas de las Nanoemulsiones	76
I.6.2. Emulsiones Múltiples	77
I.6.2.1. Métodos de Elaboración de las Emulsiones Múltiples ...	80
I.6.2.2. Estabilidad de las Emulsiones Múltiples.....	81
I.6.2.3. Aplicaciones de las Emulsiones Múltiples	82
I.6.3. Hidrogeles Termosensibles	83
I.6.3.1. Tipos de Hidrogeles Termosensibles	84
I.6.3.2. Poloxámeros	86
I.7. Terapias Avanzadas del Daño Cutáneo Radio-Inducido	92
I.7.1. Medicamentos Basados en Células, Genes y Tejidos	96
I.7.1.1. Clasificación de los Medicamentos ATMPs.....	97
I.7.2. Células Madre.....	100
I.7.2.1. Clasificación de las Células Madre	102
I.7.2.2. Células Madre Mesenquimales	104
I.7.2.2.1. Características de las Células Madre	
Mesenquimales.....	105

I.7.2.3. Ventajas y Limitaciones del Uso de Células Madre	106
I.7.2.4. Células Madre y Piel	107
I.7.2.5. Aplicaciones de las Células Madre en Dermatología ...	110
I.7.2.6. Vías de Administración de las MSCs en el Tratamiento de Heridas	113
I.7.2.6.1. Administración Sistémica	114
I.7.2.6.2. Administración Tópica.....	115
I.7.2.7. Aplicación de las MSCs en el Tratamiento de Quemaduras	117
I.7.2.7.1. Papel de las MSCs en la Fisiología de la Quemadura.....	117
I.7.2.7.2. MSCs en la Curación de Quemaduras	118
I.7.2.8. Scaffolds y MSCs (Ingeniería de Tejidos)	120
I.7.2.8.1. Scaffold-Hidrogel.....	123
I.8. Biomateriales	126
I.8.1. Biopolímeros.....	127
I.8.1.1. Biopolímeros Utilizados como Scaffolds en el Tratamiento de Heridas por Quemaduras	129
I.8.1.1.1. Chitosan	129
I.8.1.1.2. Glicosaminoglicanos	130
II. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN	131
III. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	141
IV. RESULTADOS	147
IV.1. Artículo 1	149
IV.2. Artículo 2	189
IV.3. Artículo 3	215
IV.4. Artículo 4	243
IV.6. Artículo 5	263
V. DISCUSIÓN GENERAL	287

VI. CONCLUSIONES.....	323
VII. BIBLIOGRAFÍA	335



ABREVIATURAS Y SIGLAS

AD-MSCs	Células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo
AEMP	Agencia española de medicamentos y productos sanitarios
AIC	Criterio de información de Akaike
ARS	Síndrome de radiación agudo
ASCs	Células madre adultas
ATMPs	Medicamentos de terapias avanzadas
BM-MSCs	Células madre mesenquimales procedentes de médula ósea
CABT	Convención de armas bacteriológicas y tóxicas
CGC	Concentración crítica de gelificación
CLT-ME01	Emulsión múltiple de clotrimazol al 1%
CLT-ME02	Emulsión múltiple de clotrimazol al 2%
CLT-NE1	Nanoemulsión de clotrimazol al 1%
CLT-NE2	Nanoemulsión de clotrimazol al 2%
CLT-SOL2	Solución referencia de clotrimazol al 2%
CMC	Concentración micelar crítica
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMT	Temperatura micelar crítica
CO	Colágeno
CPR	Centro para el control y prevención de enfermedades
CR1	Referencia comercial del clotrimazol al 1%
CRI	Daño cutáneo por irradiación
CS	Condroitín sulfato
CSN	Consejo de seguridad nuclear
Css	Concentración plasmática en el estado estable
CTMP	Medicamento de terapia celular somática
CTS	Chitosan
DS	Dermatán sulfato
ECM	Matriz extracelular

EORTC	Organización europea para la investigación y tratamiento del cáncer
ESCs	Células madre embrionarias
G'	Módulo elástico o de almacenamiento
G''	Módulo de pérdida o módulo viscoso
GAGs	Glicosaminoglicanos
HA	Ácido hialurónico
HLB	Balace hidrófilo-lipófilo
hMSC	Células madre mesenquimales de origen humano
IAEA	Organismo internacional de la energía atómica
IGTN	Iniciativa global para la lucha del el terrorismo nuclear
IND	Artefacto nuclear improvisado
iPS	Células madre pluripotentes inducidas
LCST	Temperatura crítica inferior de disolución
LD ₅₀	Dosis letal 50
LET	Transferencia lineal de energía
MCI	Masa celular interna
ONU	Organización de las naciones unidas
OPCW	Organización para la prohibición de las armas químicas
P ₁	Parámetro de partición
P ₂	Parámetro de difusión
P407	Poloxámero 407
PEG	Polietilenglicol
RDD	Artefacto de dispersión radiológica
RNS	Especies de nitrógeno reactivo
ROS	Especies de oxígeno reactivo
RTG	Gelificación térmica inversa
RTOG	Grupo de radioterapia oncológica
SCH	Hidratación del estrato córneo

Abreviaturas y siglas

SCs	Células madre
TEWL	Índice de pérdida hídrica transepidérmica
UC- MSCs	Células madre mesenquimales procedentes de cordón umbilical
UCST	Temperatura crítica superior de disolución
ZP	Potencial zeta
η^*	Viscosidad compleja



INTRODUCCIÓN

I.1. AGENTES NRBQ

El acrónimo NRBQ se refiere a una serie de sustancias o agentes de naturaleza nuclear, radiológica, biológica o química susceptibles de causar daño a la salud de las personas incluso la muerte, dependiendo del tipo de agente y las circunstancias de exposición, y que pueden ser de origen natural o sintético. En estos conceptos tiene su origen lo que en los últimos años está teniendo una alta repercusión, a la amenaza nuclear, amenaza radiológica, amenaza biológica y amenaza química, que desde una perspectiva de la seguridad pública se plantean hoy día. La evolución de estas amenazas ha dirigido diversas iniciativas internacionales con carácter preventivo. Destaca la resolución 1540 del Consejo de Seguridad de la ONU, adoptada en 2004, que marca un hito en esta materia. Por su parte, el Organismo Internacional de la Energía Atómica (IAEA, del inglés *International Atomic Energy Agency*) ha desarrollado sus propios métodos de seguridad física nuclear, orientados a prevenir este tipo de riesgos y reaccionar en caso necesario. En esta misma línea, en 2006 se lanzó la Iniciativa Global para la Lucha contra el Terrorismo Nuclear (IGTN), que actualmente desarrolla sus procedimientos de trabajo técnico en coordinación con el IAEA. En 2010, el Presidente Obama dio un impulso político a la cooperación internacional en este ámbito con la Cumbre de Seguridad Nuclear de Washington. La Organización para la Prohibición de las Armas Químicas (OPAQ) también ha emprendido una labor preventiva frente a la amenaza terrorista con medios químicos. Finalmente, los debates de cara a la conferencia de examen de la Convención de Armas Bacteriológicas y Tóxicas (CABT), celebrada en Ginebra en diciembre de 2011, también reflejan una creciente preocupación por el bioterrorismo.

Ahora bien, la exposición individual o colectiva a cualquiera de estos agentes puede ser no solo de naturaleza terrorista, sino también natural, accidental, e incluso terapéutica como posteriormente se desarrollará.

I.1.1. Agentes Nucleares

Dentro de los agentes NRBQ, los agentes nucleares son aquellos elementos (radionúclidos) tanto naturales como sintéticos que pueden emitir potentes cantidades de energía en forma de radiaciones ionizantes, a través de procesos de fusión y fisión nuclear. En la actualidad, el mayor riesgo que comportan estos elementos proviene de las denominadas armas de destrucción masiva, y concretamente armas nucleares y de accidentes y/o incidentes en centrales nucleares.

En el primer caso, la explosión de las bombas atómicas de Hiroshima y Nagasaki, el 6 y el 9 de agosto de 1945, por parte el ejército de los EE.UU., construidas con ^{235}U y ^{239}Pu , respectivamente, mostró al mundo el devastador poder destructivo de estos elementos. Igualmente, existen otros tipos de armas nucleares que en teoría pudieran ser obtenidas por organizaciones o actores no estatales conocidas como “Artefacto Nuclear Improvisado” o IND (de los términos ingleses *Improvised Nuclear Device*).

Como ya se apuntó, accidentes en centrales nucleares como las que tuvieron lugar en Fukushima, Japón (2011); Tokaimura, Japón (1999); Goiânia, Brasil (1988); o en Chernobyl, antigua Unión Soviética (1988) provocaron numerosas víctimas directas así como la aparición de enfermedades relacionadas incluso en posteriores generaciones.

Por otra parte, se tienen noticias del intento por parte de grupos terroristas de la adquisición de este tipo de armas. Así, la secta *Aum Shinrikyo* trató de comprar una en la antigua Unión Soviética (Bunn 2005).

Entre los radionúclidos cuyos núcleos son susceptibles de ser divididos por el choque de neutrones a distintas velocidades (fisión nuclear) más utilizados como combustible en centrales nucleares y en la fabricación de bombas nucleares se encuentran el ^{233}U , ^{235}U , ^{239}Pu , éstos son los que producen el mayor rendimiento nuclear, aunque existen muchos más, ^{225}Th , ^{228}Pa , ^{234}Np , ^{240}Am , etc.

1.1.2. Agentes Biológicos

Son aquellos agentes de naturaleza biológica (organismos vivos) o sus productos tóxicos que pueden causar un daño para la salud de las personas e incluso la muerte. Son conocidos también como “armas biológicas” y pueden ser de distintas clases y características.

El uso de agentes biológicos como arma no es un hecho de la era moderna. Constan registros que ya en el siglo VI a.C., los escitas usaban flechas contaminadas con heces para provocar la infección de las heridas a sus enemigos. Igualmente, persas, griegos y romanos envenenaban los pozos y fuentes de agua con cadáveres. Queda constancia de que en el asedio de Kaffa (Etiopía), ya en el siglo XIV, los tártaros lanzaban cadáveres de muertos por la peste a los sitiados. Uno de los casos más conocidos en los últimos años, tuvo lugar poco después de los atentados del 11-S de 2001 en EE.UU., mediante el envío de cartas que contenían esporas de *Bacillus anthracis* (el agente causante del Carbunco o Antrax maligno), produciendo la muerte de cinco personas por inhalación de las esporas y otras veintidós afectadas. En un principio, estos envíos fueron vinculados con la organización terrorista *Al Qaeda*, pero posteriormente, tras las investigaciones pertinentes, se culpó al Dr. Bruce Ivins, adscrito al Instituto de Investigación de Enfermedades Infecciosas del Ejército de

EE.UU., el cual, tenía acceso a dicho agente precisamente por estar trabajando en el desarrollo de vacunas contra dicha enfermedad.

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CPR, del inglés *Centre for Disease Control and Prevention*) perteneciente al Departamento de Salud y Servicios Humanos del gobierno de EE.UU. realiza una clasificación de los agentes patógenos susceptibles de ser utilizados como armas biológicas en varias categorías (CPR 2018).

Categoría A

Pueden diseminarse y transmitirse fácilmente entre personas. Producen una alta tasa de mortalidad, así como un alto impacto en la salud pública. Pueden causar gran alarma social, y finalmente requieren acciones especiales por parte de las administraciones públicas. Entre estos patógenos, nos encontramos los siguientes: *Bacillus anthracis*, bacteria agente etiológico del Antrax o Carbunco; *Clostridium botulinum*, bacteria productora de la toxina botulínica, agente etiológico del Botulismo; *Yersinia pestis*, bacteria agente etiológico de la Peste; Variola mayor, virus agente etiológico de la Viruela; *Francisella tularensis*, bacteria agente etiológico de la Tularemia; otros virus causantes de fiebres hemorrágicas incluyendo la familia de los Filovirus como el virus de Marburgo (Marburgvirus) y el virus del Ébola (Ebolavirus), y los Arenavirus como el virus Lassa y virus Machupo.

Categoría B

Son moderadamente fáciles de diseminar, tienen una tasa de morbilidad moderada y baja tasa de mortalidad. Requieren la gestión de recursos específicos para su diagnóstico y alta vigilancia sanitaria. En esta categoría se incluyen: *Brucella* sp., bacterias causantes de la Brucelosis; bacteria *Clostridium perfringens* productora de la toxina épsilon; patógenos

asociados a los alimentos como *Salmonella* sp, *Escherichia coli* O157:H7 y *Shigella* sp; *Burkholderia mallei*, bacteria causante etiológico del Muermo; *Burkholderia pseudomallei*, bacteria agente etiológico de la Melioidosis; *Chlamydia psittaci*, bacteria causante de la Psitacosis; *Coxiella burnetii*, bacteria causante de la Fiebre Q; *Ricinus communis*, planta productora de la toxina ricina; *Staphylococcus aureus* bacteria productora de la enterotoxina B; *Rickettsia prowazekii*, agente etiológico del Tifus; virus causantes de encefalitis como los alfavirus agentes etiológicos de las encefalitis equinas; y agentes patógenos del agua como el *Vibrio cholera* y *Cryptosporidium parvum*.

Categoría C

En esta categoría se engloban patógenos emergentes que puedan ser creados mediante bioingeniería para la diseminación en masa por su disponibilidad, fácil producción y diseminación, potenciales altas tasas de morbilidad y mortalidad. Se engloban en esta categoría el virus Nipah y el virus Hanta.

No obstante, esta no es una lista cerrada ya que cualquier patógeno capaz de mermar la salud de cualquier persona puede ser utilizado como arma biológica y el número de agentes patógenos que se podrían incluir sería inmenso. Pero la finalidad no es otra que establecer unos criterios de clasificación.

I.1.3. Agentes Químicos

Una definición exacta de agentes químicos se encuentran en la Organización para la Prohibición de Armas Químicas (OPCW, del inglés

Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons), la cual define como como “armas químicas”, conjunta o separadamente (OPCW 2005):

“las sustancias químicas tóxicas o sus precursores, salvo cuando se destinen a fines no prohibidos por la presente Convención, siempre que los tipos y cantidades de que se trate sean compatibles con esos fines...las municiones o dispositivos destinados de modo expreso a causar la muerte o lesiones mediante las propiedades tóxicas de las sustancias especificadas en el apartado a) que libere el empleo de esas municiones o dispositivos; o cualquier equipo destinado de modo expreso a ser utilizado directamente en relación con el empleo de las municiones o dispositivos especificados en el apartado anterior”.

El uso de sustancias químicas tóxicas como agentes para causar daño en las personas, es decir como arma química, también se encuentra en registros que datan de la época de la antigua Grecia, en la cual, ya se utilizaba el término “toxicon” para referirse a las sustancias tóxicas con las que embadurnaban las puntas de flechas. Sin embargo, fue ya en el siglo XX cuando este tipo de agentes sufrieron un verdadero desarrollo coincidiendo con la primera guerra mundial. Como principal exponente del uso de un agente químico como arma lo tenemos en 1945 en el frente de Ypres (Bélgica) donde el ejército alemán utilizó bombonas de Cl contra las tropas aliadas francesas y argelinas. Pero, ya más recientemente, en 1995 un atentado terrorista cometido en Tokio por la ya mencionada secta *Aum Shinrikyo*, en un ataque coordinado que vertió gran cantidad de agente químico sarín en varias estaciones de metro, ocasionó multitud de víctimas, trece de ellas asesinadas, cincuenta gravemente heridas y unas mil con problemas de visión. Más recientemente, en 2018 saltó a la prensa internacional el envenenamiento de Sergei Skripal, ex-espía ruso, y su hija Yulia, los cuales fueron envenenados con un agente nervioso conocido como “novichok”, una variante del conocido VX.

Debido al gran desarrollo actual, cualquier sustancia tóxica de naturaleza química podría usarse como arma química, pero como en la sección anterior, en un intento de sistematizar la ingente cantidad de sustancias estableceremos la siguiente clasificación, dependiendo de propiedades como: estado físico, mecanismo de acción, efectos farmacológicos, etc. (Martínez Pons 2006).

Agentes Letales

Son aquellos que provocan la muerte con dosis relativamente pequeñas.

- *Agentes sofocantes o neurotóxicos*: Producen lesiones en los tejidos de las vías respiratorias impidiendo la respiración; dan lugar a la formación de edemas pulmonares que impiden la oxigenación de la sangre y provocan sofocación (asfixia) de la persona expuesta. Los más conocidos son el cloro, fosgeno, difosgeno y cloropicrina.
- *Agentes nerviosos o neurotóxicos*: Compuestos organofosforados de estructura similar a los pesticidas. Entre estos distinguimos dos tipos:
 - Agentes nerviosos de la serie G: Derivan del ácido fosfonofluorhidrato, como el tabún, sarín y somán.
 - Agentes nerviosos de la serie V: Derivan del ácido fosfotiolato, como los agentes VX, VE, VM y VS.
- *Agentes tóxicos sanguíneos o hemotóxicos*: Ácido cianhídrico, clorocianógeno y arsenamina.
- *Agentes vesicantes o dermatóxicos*: Provocan quemaduras y vesicaciones en la piel y en los tejidos internos. Los más conocidos son la Iperita y la lewisita.

Agentes Incapacitantes

Provocan la incapacidad del individuo para desarrollar normalmente sus funciones durante un tiempo más o menos prolongado. Dosis elevadas pueden provocar también la muerte.

- *Agentes Incapacitantes Físicos*: Son aquellos agentes químicos letales que son empleados en dosis mínimas no teniendo, por tanto, capacidad suficiente para producir la muerte y provocando incapacidad.
- *Agentes Incapacitantes Psíquicos*: Provocan una perturbación transitoria del comportamiento del individuo haciendo que éste tenga reacciones ilógicas e irracionales, prolongándose sus efectos durante horas o incluso días.

Agentes neutralizantes

Provocan la incapacidad del individuo de forma inmediata tras la exposición y desaparecen rápidamente cuando el sujeto deja de estar expuesto. Normalmente se trata de agentes estornudógenos, lacrimógenos, vomitivos e irritantes. Los más conocidos son la difenilcloroarsina, adamsita y cloroacetofenona.

I.2. AGENTES RADIOLÓGICOS

Los agentes radiológicos son aquellos elementos capaces de emitir radiaciones ionizantes que suponen un riesgo para la salud e incluso la vida de las personas. Aunque existen instituciones que los engloban dentro de los agentes nucleares, se diferencian de los anteriores en que éstos no pueden ser utilizados como material fisible en el ámbito nuclear. Hecho que no descarta que puedan ser utilizados para la fabricación de un tipo de artefactos en combinación con explosivos llamados artefactos de dispersión radiológica (RDD, del inglés *Radiological Dispersal Device*), también conocidos como “bombas sucias”. De hecho hay antecedentes de su fabricación y colocación con fines terroristas, en concreto por terroristas chechenos en el parque Izmailovsky de Moscú en 1995, utilizando como carga radiactiva una fuente de ^{137}Cs de uso médico (Jenkins 2008).

A nuestra memoria también nos viene el asesinato del disidente ruso Alexander Litvinenko en el año 2006 con la ingestión de ^{210}Po , emisor de radiación alfa, lo que le causó la muerte por irradiación interna (Barnaby 2007).

Aunque la exposición a un agente radiológico, en los términos referidos, es comúnmente relacionada con posibles acciones terroristas, nada más lejos de la realidad, es mucho más común de lo que cabría pensar. La exposición a un agente radiológico puede tener otros orígenes, ente ellos, la propia naturaleza (Figura 1).

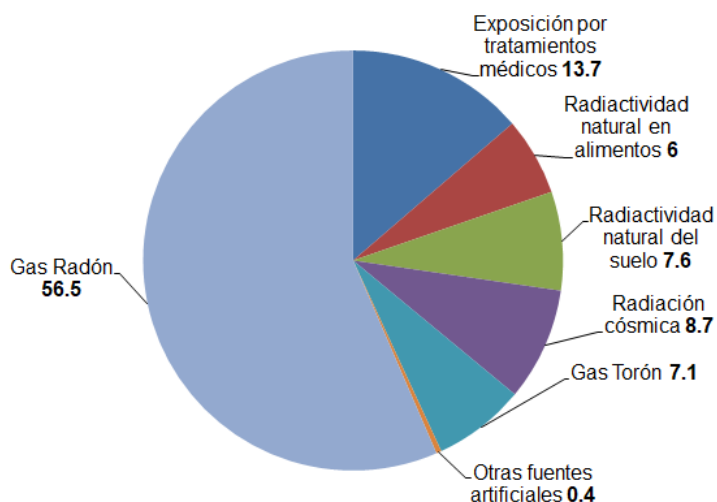


Figura 1. Distribución de las distintas fuentes de radiación ionizante que contribuyen a la dosis media anual recibida.

Existe un nivel de radiación natural, de hecho hasta un 86% de la radiación recibida tiene su origen en fuentes naturales (Colgan y cols., 2008). Entre ellas, el elemento Rn. El ^{222}Rn es un gas que está presente en la naturaleza, y es el causante del 56% de la dosis recibida por individuo y año. Una mayor exposición a este elemento aumenta el riesgo de padecer cáncer de pulmón. De la misma forma, que el Rn, otro gas radiactivo como el gas torón (^{220}Rn) también está presente de forma natural en el ambiente. Otra fuente natural de radiación son los rayos que llegan a la tierra tanto del sol como de otros sistemas (rayos cósmicos), esta radiación es mayor a medida que subimos en altitud. De la propia tierra, es decir dependiendo del tipo de suelo o de roca, podemos estar expuestos a ciertas dosis de radiación. Otro ejemplo de emisores naturales de radiación son los propios alimentos, muchos de ellos contienen ^{40}K .

Por otra parte, la exposición a distintas dosis y tipos de radiaciones puede venir de la mano de la acción humana. Aparte de la ya comentada

actividad terrorista, muchos procesos cotidianos como por ejemplo en la actividad médica, tanto diagnóstica como terapéutica, se usan fuentes emisoras de radiaciones, entre las más conocidas de carácter diagnóstico se encuentran los aparatos de rayos X, la tomografía computerizada que utiliza radioisótopos como el ^{99m}Tc , que se utiliza para el diagnóstico en órganos como hígado, bazo y cerebro, en vías biliares y tracto digestivo, al igual que el ^{123}I , utilizado para diagnóstico tiroideo y renal, el ^{201}Tl para estudios cardiacos, el ^{67}Ga para detección de tumores, el ^{111}In para procesos inflamatorios, así como el ^{133}Xe en diagnósticos de pulmón. Otra técnica diagnóstica como la tomografía por emisión de positrones, se utilizan habitualmente ^{15}O , ^{13}N , ^{11}C y ^{18}F . En la vertiente médica-terapéutica, se emplean máquinas de telecobaltoterapia que utilizan una fuente de ^{60}Co , o bien técnicas de radioterapia como la braquiterapia que utilizan una fuente emisora de radiación ^{137}Cs , ^{192}Ir o el ^{125}I , que se encuentra encapsulada en una funda metálica, y la medicina nuclear en la que la fuente emisora de radiación no está encapsulada, como el ^{131}I , ^{90}Y , ^{89}Sr , etc. (Chain e Illanes 2017).

La emisión puede ser también procedente de la actividad humana en procesos industriales de detección, análisis, medición etc., como por ejemplo detectores de fugas de gases líquidos y medidores de espesores. En la industria de hidrocarburos se usan fuentes radiactivas para la caracterización geofísica. Además, la aplicación de las radiaciones en procesos de polimerización, entrecruzamiento, escisión y esterilización de polímeros como el polipropileno, cloruro de polivinilo, poliestireno o el polimetilmetacrilato da una visión global de su importancia a nivel industrial (Singh y Bahari 2003). Por otro lado, la aplicación tecnológica de dichas radiaciones ha permitido grandes avances en diversos campos de investigación como por ejemplo en biología molecular.

Por tanto, y a modo de resumen, los agentes radiológicos susceptibles de causar daño a la salud de las personas, y teniendo en cuenta su disponibilidad, de acuerdo a lo anteriormente relatado son mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de los agentes radiológicos y potenciales fuentes de obtención.

Fuente	Agente radiológico												
	¹⁴ C	⁶⁰ Co	¹³⁷ Cs	⁶⁷ Ga	³ H	¹²⁵ I	¹³¹ I	¹⁹² Ir	³² P	⁹⁹ Tc	²⁰¹ Tl	²³⁸ U	¹³³ Xe
Sistemas médicos de diagnóstico y terapia		X		X			X		X	X	X		X
Laboratorios de investigación	X	X			X	X						X	
Sistemas industriales		X	X					X					

1.2.1. Radiaciones Ionizantes

El elemento común que establece la catalogación de un elemento como agente radiológico y por tanto, con peligrosidad para la salud es la emisión de radiaciones. Por tal motivo, es imprescindible ahondar en dicho fenómeno. El término de radiación alude a la emisión de energía en forma de ondas electromagnéticas o bien partículas a alta velocidad. Concretamente el término radiación ionizante se aplica a aquella radiación de muy alta frecuencia que posee suficiente energía como para arrancar electrones de los átomos de otra sustancia produciendo así átomos cargados o ionizados y la liberación de electrones. Estos electrones y los iones son especies muy reactivas que pueden reaccionar químicamente con otros componentes de un organismo.

I.2.1.1. Tipos de Radiaciones Ionizantes

Existen diferentes tipos de radiaciones ionizantes, con distinta energía y distinto poder de penetración (Figura 2). El Consejo de Seguridad Nuclear (CSN 2019) las define como:

Partículas Alfa

Son conjuntos de dos protones con dos neutrones, es decir, núcleos de He que se emiten en determinadas desintegraciones nucleares que ocurren generalmente en átomos de elementos muy pesados, como el Ur, Tr o el Ra. Por tanto, la partícula alfa está cargada positivamente por sus dos protones, siendo también bastante pesada en comparación con otras radiaciones pero tienen mucha más energía haciéndolas muy reactivas, por tanto generando un gran número de ionizaciones. Debido a que son más pesadas, son poco penetrantes, pueden llegar a viajar dos o tres centímetros en el aire y solamente unas micras en tejido, de modo que una hoja de papel o la misma piel humana son suficientes para protegernos de sus efectos. Así, en teoría las partículas alfa no suponen un gran peligro para la piel, pero si alcanzaran el interior del organismo por ingestión, inhalación o por heridas sí supondrían un riesgo para la salud.

Partículas Beta

Se originan en determinadas desintegraciones nucleares en las que un núcleo emite un electrón (beta negativas), junto con una partícula que no forma parte de la materia ordinaria, sino de la antimateria llamada positrón o antielectrón, que tiene la misma cantidad de masa y spin que el electrón pero con carga positiva (beta positivas). Suelen ocurrir en radionúclidos ricos en neutrones. Tienen menos masa que las alfa, aunque son algo más penetrantes, pueden traspasar una hoja de papel y entre uno y dos

centímetros de tejido vivo, pero no pueden penetrar una lámina de aluminio. Si estas partículas llegaran a permanecer mucho tiempo en la superficie de la piel o en el ojo podrían causar quemaduras por radiación. También suponen un riesgo si son internalizadas por el organismo.

Rayos X y Gamma

Son radiaciones electromagnéticas sin carga ni masa. Los rayos X fueron descubiertos en 1895 por Roentgen, y fueron el primer ejemplo conocido de radiación ionizante de naturaleza electromagnética. Proceden de las capas externas del átomo, donde se encuentran los electrones. Las radiaciones gamma proceden de la desintegración de los núcleos inestables de algunos elementos radiactivos. Tras la emisión de una partícula alfa o beta, en el núcleo queda un exceso de energía que se emite en forma de radiación gamma. Radionúclidos como el ^{99}Tc y el ^{137}Cs son utilizados como emisores de radiación gamma. Este tipo de radiaciones son bastante penetrantes, atraviesan una hoja de papel y una lámina de aluminio y, para frenarlas se precisa una lámina de plomo de grosor suficiente.

Neutrones

Son un tipo de radiación muy penetrante. Al no tener carga eléctrica, y una masa cuatro veces inferior a las partículas beta, los neutrones penetran fácilmente la estructura de determinados átomos y provocan su división. Se pueden absorber con elementos químicos ávidos de neutrones como el Cd o el B. Para frenarlas deben utilizarse gruesas capas de hormigón, plomo o agua.

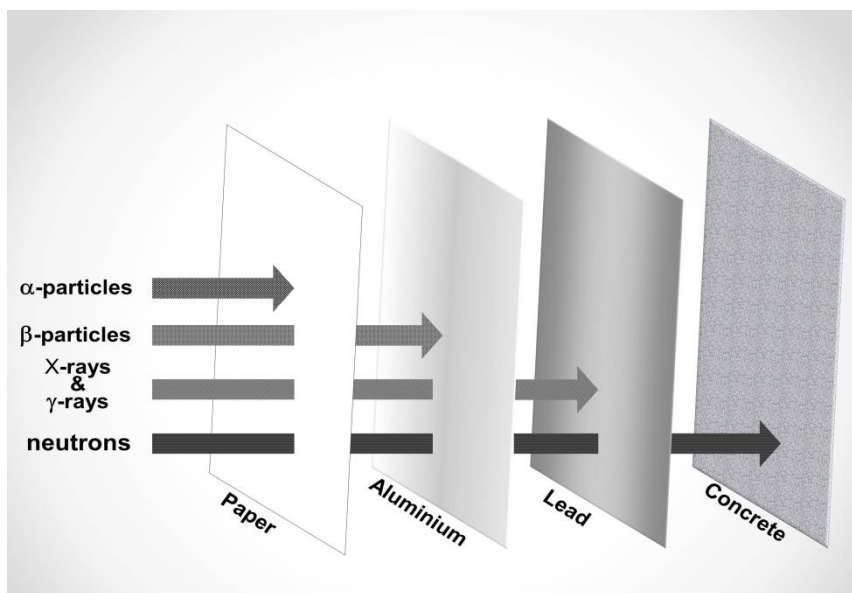


Figura 2. Esquema representativo del poder de penetración de los diferentes tipos de radiaciones ionizantes.

Las ondas electromagnéticas de la región baja del espectro, aun no teniendo la energía suficiente como para ionizar átomos, también pueden tener efectos dañinos sobre la salud. De ahí que aunque la radiación ultravioleta no tiene poder de penetración, puede causar alteraciones biológicas tras la exposición prolongada. Otras ondas de mayor longitud, como los infrarrojos o las microondas, son capaces de depositar su energía en el interior de los tejidos, y una exposición prolongada puede también acarrear daños. Por otro lado, no está muy claro el efecto perjudicial que puedan causar otro tipo de ondas de menor energía como las ondas de radio o la exposición a campos eléctricos, pero pueden llegar a producir alteraciones en el intercambio iónico a través de las membranas celulares.

Una característica importante de todo material radiactivo es su reducción gradual de emisión de radiación debido a la desintegración espontánea. La cantidad de radionúclidos iniciales disminuye con el tiempo, y el número de radionúclidos que se desintegran en un determinado tiempo es directamente

proporcional al número de radionúclidos presentes en la muestra de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$N_t = N_0 \times e^{-\lambda t}$$

Donde N_0 es el número de núcleos iniciales y N_t el número de radionúclidos que quedan sin desintegrar a un tiempo determinado, siendo λ la constante de desintegración radiactiva de ese tipo de radionúclido.

I.2.1.2. Magnitudes de Medida de Dosis de las Radiaciones Ionizantes

La cantidad de energía absorbida por los tejidos por la acción de las radiaciones se expresa normalmente en términos de **dosis absorbida** siendo la unidad el **grey** (Gy), el cual, es equivalente a la absorción de un julio por kilogramo de material irradiado (J/Kg), lo que por tanto significa concentración de energía absorbida. Otra unidad de dosis de energía absorbida es el **rad**, cuya equivalencia es 1 rad=0.01 Gy. En literatura antigua también podemos encontrar como unidad de dosis absorbida el **rem**, la cual, fue introducida para considerar los potenciales efectos dañinos de las radiaciones ionizantes con mayor transferencia lineal de energía (LET, siglas del inglés *Linear Energy Transfer*), ya que éstas generalmente producen mayor daño a igual dosis que las de menor LET. El rem se obtiene multiplicando el rad por un factor que expresa la efectividad de un tipo de radiación concreta en relación con la de los rayos X, y que depende del mayor o menor LET en el material irradiado.

En este mismo contexto, la **dosis equivalente** hace referencia a la cantidad de radiación absorbida por la materia viva, ponderada por los posibles efectos biológicos producidos. Su unidad es el **Sievert** (Sv), y su equivalencia es 1 Sv=1 Gy, y por tanto también (J/Kg) para las radiaciones

electromagnéticas (Rayos X y gamma) y los electrones (partículas beta), el factor de ponderación para para las partículas alfa es 20 (ICRP 1996).

El Reglamento de Protección Sanitaria contra Radiaciones Ionizantes (CSN 2001), establece unos límites para la dosis efectiva de radiación que no pueden superarse, los cuales, para trabajadores expuestos, se establece que pueden llegar hasta 100 mSv en 5 años (media de 20 mSv al año), pero sin superar los 50 mSv en un año. La trabajadora embarazada no podrá recibir una dosis de radiación tal que la dosis al feto sea superior a 1 mSv durante todo el embarazo. En el resto de personas, pueden llegar hasta 1 mSv al año, pero en circunstancias especiales se podrá permitir un valor superior, siempre que no se supere el valor de 5 mSv en 5 años.

Dentro de la protección contra las radiaciones ionizantes, existen una serie de factores que deben ser tenidos muy en cuenta para minimizar el riesgo de irradiación:

1. **Tiempo:** La dosis recibida es directamente proporcional al tiempo de exposición, por lo que, cuanto menor sea el tiempo de exposición a la fuente radiactiva menor será la dosis recibida.
2. **Distancia:** La dosis recibida es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia a la fuente radiactiva, por lo que, cuanto mayor sea la distancia de exposición a la fuente radiactiva menor será la dosis recibida.
3. **Blindaje:** La dosis recibida será menor si se interponen barreras adecuadas en función del tipo de radiación ionizante entre la fuente emisora y el individuo.

Además de tener en cuenta estos factores, se conseguirá una mayor efectividad en la protección frente a las radiaciones ionizantes cuando el individuo sea consciente de que el riesgo existe, es decir, normalmente el

individuo no es consciente de que está siendo irradiado porque las radiaciones, en la mayoría de las ocasiones no son percibidas por los sentidos. Por ello, las áreas de peligro de exposición deben ser restringidas para el público y señalizadas para las personas que deban permanecer o pasar por ellas. Así, en función del nivel de radiación existente se han establecido una serie de símbolos y colores (Figura 3).

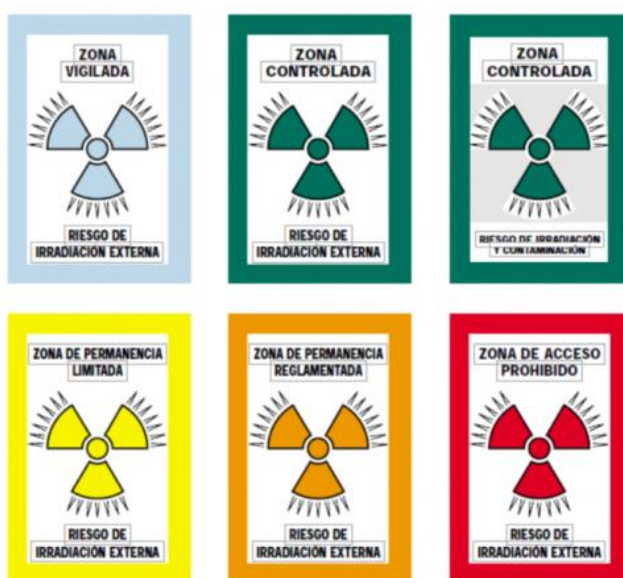


Figura 3. Carteles de información sobre riesgo de contaminación externa por radiaciones ionizantes.

“Zona vigilada” de color gris, es aquella zona en la que existe la posibilidad de recibir dosis efectivas superiores a 1 mSv por año oficial o una dosis equivalente superior a 1/10 de los límites de dosis equivalentes para el cristalino (150 mSv), la piel y las extremidades (500 mSv).

“Zona controlada” de color verde, es aquella zona en la que existe la posibilidad de recibir dosis efectivas superiores a 6 mSv por año oficial o una dosis equivalente superior a 3/10 de los límites de dosis equivalentes para el cristalino (150 mSv), la piel y las extremidades (500 mSv), o bien es

necesario seguir procedimientos de trabajo con objeto de restringir la exposición a la radiación ionizante, evitar la dispersión de contaminación radiactiva o prevenir o limitar la probabilidad y magnitud de accidentes radiológicos o sus consecuencias. Las zonas controladas se podrán subdividir en: “zona de permanencia limitada”, “zona de permanencia reglamentada” y “zona acceso prohibido”.

“Zona de permanencia limitada”, de color amarillo, son aquéllas en las que existe el riesgo de recibir una dosis superior a los límites de dosis (100 mSv durante todo período de cinco años oficiales consecutivos, sujeto a una dosis efectiva máxima de 50 mSv en cualquier año oficial).

“Zona de permanencia reglamentada” de color naranja, zona en la que existe el riesgo de recibir en cortos periodos de tiempo una dosis superior a los límites de dosis.

“Zona acceso prohibido” de color rojo, son aquéllas en las que existe el riesgo de recibir, en una exposición única, dosis superiores a los límites de dosis.

La cartelería de estos símbolos indicará si existe riesgo de irradiación (puntas radiales) y/o contaminación (fondo punteado).

I.2.1.3. Vías y Mecanismos de Contaminación

La contaminación por radiaciones ionizantes puede ocurrir a través de dos vías principales, externa e interna. La vía interna tiene lugar cuando la fuente de radiación se localiza en el interior del organismo (internalización), normalmente por ingestión, inhalación o bien por absorción a través de la piel dañada. Es la vía que entraña mayor peligro. Las partículas alfa, aunque tienen poco poder de penetración, si son internalizadas pueden irradiar directamente a las células. Igualmente, aunque en menor medida ocurriría con las partículas beta. Los elementos radiactivos, una vez que se

absorben por el organismo son transportados a través del torrente sanguíneo. Posteriormente, pueden quedar depositados en los órganos. Durante estas etapas tienen lugar numerosas interacciones con las células que encuentran a su paso. El tamaño de estos radionúclidos va a determinar su acumulación en el organismo. Tamaños mayores de 10 μm quedan acumulados en la nasofaringe durante el proceso de respiración. Las partículas más pequeñas alcanzarán los alveolos pulmonares, aquellas con mayor solubilidad pueden ser absorbidas y pasar a la circulación sistémica y al sistema linfático (AFRRI 2003; Cassatt y cols., 2008). Las partículas más insolubles como los óxidos aunque pueden ser eliminadas por la propia respiración podrán irradiar el tracto respiratorio. En el caso de ingestión, su potencial dañino dependerá del grado de absorción en el intestino y el tiempo que se mantenga internalizado hasta su eliminación en caso de no ser absorbido. Esta absorción dependerá de sus propiedades fisicoquímicas, principalmente su solubilidad. Al igual que en el caso de la inhalación las partículas más insolubles continuarán su recorrido por el intestino hasta su eliminación por las heces. Aquellas que pasan a la circulación son distribuidas por todo el organismo en función de su grado de metabolización y afinidad por distintos órganos. En general, los radionúclidos tienen una mayor afinidad por órganos con alto contenido en proteínas y lípidos como el hígado, riñón, tejido adiposo y huesos (AFRRI 2003).

La vía externa, a priori puede ser menos peligrosa para la salud, se produce cuando el material radiactivo está en el ambiente cercano, la ropa o bien depositado en la piel. En este caso las partículas alfa y beta, no entrañarían tanto riesgo como en la vía interna, si bien la exposición prolongada puede causar daños cutáneos. La piel es también uno de los órganos más vulnerables a las radiaciones ionizantes por la existencia de células en continua división (Prise y Saran 2011).

Las radiaciones ionizantes producen sus efectos perjudiciales principalmente a través de dos mecanismos, por una acción directa o bien de forma indirecta. En el primer caso, la radiación impacta directamente con el ADN de la célula provocando su ionización y por tanto, provocando fallos que derivan en un anormal funcionamiento de los mecanismos celulares. Este daño directo sobre la molécula de ADN es menos probable debido al pequeño tamaño de la misma, aproximadamente 2 nm.

En el segundo caso, la acción indirecta consiste en que la radiación impacta con otra serie de átomos y moléculas que, en un principio no son tan importantes para el desarrollo celular, como por ejemplo moléculas de agua, pero que si producen una serie de radicales libres altamente reactivos. Estos radicales libres si pueden interaccionar con moléculas críticas como el ADN. Como estos radicales libres son capaces de difundir, aunque el daño no se produzca directamente sobre el ADN si es susceptible de ser dañado por estos radicales libres.

Por tanto, ya sea de forma directa o indirecta, la molécula de ADN puede ser dañada a raíz del impacto de la radiación ionizante. Ahora bien, este daño puede producirse en una sola de las cadenas de la doble hélice de la molécula del ADN. En este caso, los mecanismos autoreparadores del mismo actuarán reparando el trozo de cadena dañada tomando la otra cadena como patrón. Pero si el daño se produce en ambas cadenas de la doble hélice, los mecanismos reparadores pueden cometer fallos de secuencia lo que podría dar lugar a errores y por tanto mutaciones de ADN, y subsecuentemente a un funcionamiento anormal de la célula o bien directamente la muerte celular. Afortunadamente, en la mayoría de los casos el daño causado es reparado correctamente.

I.2.1.4. Factores en la Acción Biológica de las Radiaciones Ionizantes

Entre los factores a tener en cuenta en la acción biológica de las radiaciones ionizantes hay que destacar los seguidamente descritos:

Dosis recibida

La cantidad de radiación ionizante que el individuo ha recibido determinará los efectos que podrá sufrir. En este sentido el modo en que sea recibida dicha radiación también influye en los potenciales efectos perjudiciales. Así, una misma dosis recibida en una sola exposición causará mayores efectos nocivos que si se recibe en varias exposiciones debido a la capacidad de recuperación del organismo tras la irradiación. Dentro de la dosis recibida también influirá el tipo de radiación a la que se ha estado expuesto.

Área expuesta

La extensión irradiada del cuerpo es un importante factor porque a mayor área expuesta, a igualdad de otros factores, mayor daño producirá en el organismo. Esto se debe a que se afecta un mayor número de células y por tanto, existe mayor probabilidad de que afecte mayor extensión de tejido u órgano. De hecho, en tratamientos radioterápicos de zonas muy acotadas, se administran dosis de radiación que si fueran aplicadas a la totalidad del cuerpo serían letales. Por otro lado, distintas zonas del cuerpo tienen diferente sensibilidad a las radiaciones ionizantes. Las zonas de la piel más sensibles son la parte anterior del cuello, extremidades, abdomen y la cara (Brown y Rzucidlo 2011).

Variabilidad interindividual

Existe una amplia variabilidad en la radio-sensibilidad entre individuos. Factores genéticos, demográficos, alimentarios, así como hábitos de vida van a contribuir en las diferentes reacciones interindividuales frente a la exposición a las radiaciones ionizantes. Igualmente otros factores como la edad, estado hormonal, obesidad, tabaquismo, o cierto tipo de enfermedades también van a influir en estas diferencias interindividuales (Salvo y cols., 2010). En este contexto, se define el concepto de dosis letal 50 (LD50, del inglés *Lethal Dose*) aludiendo a la dosis requerida para causar la muerte del 50% de los individuos sometidos a dicha radiación. Debido a las variabilidades intraindividuales para humanos se encuentran entre 3 y 4Gy en ausencia de cuidados médicos y, entre 6 y 7 Gy cuando se trata médicamente. Individuos sometidos a exposiciones mayores de 10 Gy no sobrevivirían (DiCarlo y cols., 2011).

Variabilidad en la sensibilidad celular

Para un mismo individuo existen distintos tipos de radio-sensibilidad dependiendo del tipo de célula afectada por la radiación. En general, aquellas células que se dividen más frecuentemente, es decir con mayor actividad mitótica, así como las células que se dividen hacia otro tipo celular más especializado (totipotentes, pluripotentes, multipotentes, unipotentes) son más sensibles a la radiación ionizante (Ley de Bergonié y Tribondeau). Por tal motivo, linfocitos, eritroblastos, y otras células hematopoyéticas son muy radiosensibles, al igual que las células del tracto gastrointestinal y las células de capa basal de la epidermis.

La acción de las radiaciones ionizantes en el organismo va a provocar una serie de efectos. En este punto, se debe hacer alusión a los

denominados efectos deterministas y efectos estocásticos, ambos términos íntimamente unidos al efecto biológico de las radiaciones ionizantes.

Los **efectos deterministas**, son aquellos que se derivan de la muerte celular. Así, en función de un mayor o menor nivel de muerte celular en un tejido u órgano derivará en un daño observable. Si este daño se produce sobre un órgano vital puede llegar a producir la muerte del individuo, en cambio, si es un tejido u órgano no vital, el individuo sufrirá más o menos disfuncionalidad en función del mayor o menor daño causado. De esta forma, los efectos deterministas se caracterizan por la existencia de un umbral de dosis, por debajo del cual no se observará el efecto de la radiación, y dicho efecto aumentará a medida que aumente la dosis de radiación recibida por encima del umbral. Como ejemplo de daños deterministas se encuentran la necrosis de tejido subcutáneo, cataratas, esterilidad o anemia.

Los **efectos estocásticos** o probabilísticos son aquellos que aparecen de forma aleatoria y no están asociados a un umbral de dosis, sino a una exposición continuada a largo plazo, tras la cual, pueden o no aparecer. Igualmente, pueden aparecer en el individuo que ha estado expuesto a la radiación (efectos somáticos), o bien a su descendencia (efectos genéticos). Un ejemplo descriptivo es el impacto de la radiación ionizante sobre una célula, ésta tras un periodo de latencia puede seguir siendo viable pero anormal y, dividirse hacia un tipo celular especializado, como por ejemplo fibroblastos, los cuales, pueden ser potencialmente malignos y poder desarrollar o no un proceso canceroso.

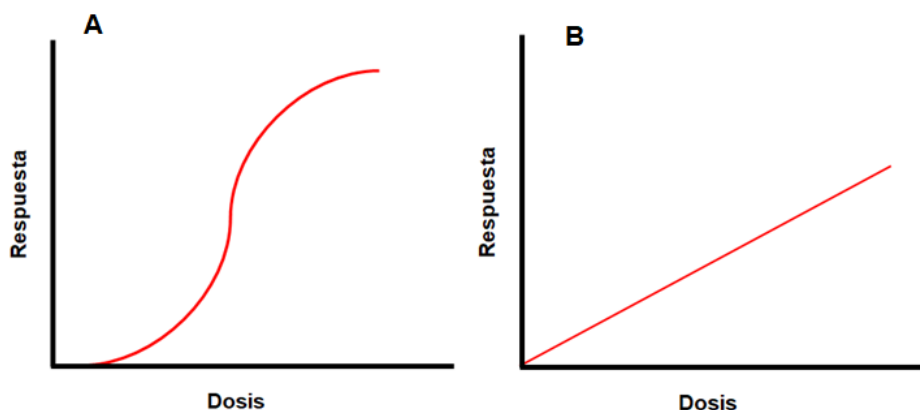


Figura 4. Curvas dosis respuesta.

Para cualquier agente nocivo para la salud, en general, y para los agentes radiactivos, en particular, es bastante útil correlacionar la dosis administrada con el efecto o daño producido (respuesta), con el objeto de fijar niveles seguros de exposición. En el caso de las radiaciones ionizantes la respuesta puede ser la frecuencia de aparición de una determinada anomalía en una población de células de un individuo irradiado, o bien la prevalencia de una enfermedad crónica en una determinada población de individuos. Cuando se representan ambas variables en un gráfico se obtiene la denominada **curva dosis-respuesta** (Figura 4). Esta curva puede ser una curva en forma de “S” (Figura 4A). En este caso el punto donde la curva cruza el eje de abscisas denota el umbral de dosis, es decir, la dosis por debajo de la cual no se observa respuesta. Dicha correlación dosis-respuesta puede ser también lineal (Figura 4B), en la que no existe umbral de dosis, de forma que cualquier dosis, por pequeña que sea conlleva cierto nivel de respuesta.

I.2.1.5. Efectos Biológicos de las Radiaciones Ionizantes

Los efectos biológicos que el impacto de las radiaciones ionizantes tienen sobre el organismo se pueden dividir en dos grandes bloques, por un lado los efectos agudos, los cuales son conocidos como síndrome de irradiación agudo (ARS, del inglés *Acute Radiation Syndrome*), y efectos a largo plazo. Los primeros aparecen en cuestión de minutos, días o semanas. En cambio, los segundos pueden aparecer tras años, décadas e incluso en posteriores generaciones.

I.2.1.5.1. Síndrome de Radiación Agudo

El ARS, también conocido como enfermedad por radiación, es un conjunto de signos y síntomas causados por una alta exposición a una fuente emisora de radiaciones ionizantes de una gran parte del cuerpo en un corto espacio de tiempo (Donnelly y cols., 2010). Los tejidos más sensibles a las radiaciones son aquellos que contienen células en constante división como en la médula ósea, mucosa intestinal, piel, etc. De esta forma la literatura especializada ha distinguido tres grandes subsíndromes dentro del ARS: síndrome hematopoyético, síndrome gastrointestinal y el síndrome neurovascular. Existe un cuarto denominado síndrome cutáneo, si bien alguna bibliografía no lo considera parte del ARS porque puede manifestarse sin que tenga lugar los síntomas propios del ARS (Signh y cols., 2015).

El síndrome hematopoyético alude a los daños causados en dicho sistema. Como ya se ha mencionado anteriormente, existen gran cantidad de células hematopoyéticas madre en la médula ósea y por tanto, más

sensibles a las radiaciones, de forma que este subsíndrome aparecería a dosis mayores de 1 Gy y se traduciría en una caída en los procesos mitóticos de estas células traducida en una reducción significativa del recuento de células sanguíneas, sobre todo de linfocitos, aparecerían náuseas y vómitos, cefaleas, fatiga y fiebre (ADH 2012; Chao 2007).

El síndrome gastrointestinal, se manifiesta por la irradiación de las células del tracto gastrointestinal, el cual aparece para dosis de entre 6 y 12 Gy, tras las dos horas de exposición. Los efectos son más severos, además de los comentados para el síndrome hematopoyético, aparecen calambres y fuerte dolor abdominal, diarreas y posterior sangrado (ADH 2012; Mettler 2007).

El síndrome neurovascular aparece con dosis de radiación por encima de 20 Gy, ya que el sistema nervioso es el menos sensible a la radiación ionizante, en este caso hay alteración de los reflejos, vértigos, confusión y desorientación, ataxias y pérdida de conciencia (AFRRI 2003; ADH 2012).

Cuando las dosis expuestas son por encima de los 35 Gy se produce un colapso del sistema circulatorio que acarrea la muerte del paciente. En dosis por encima de los 50 Gy el individuo fallece en 48 horas. En estos últimos casos de tan altas exposiciones y dosis, las manifestaciones hematopoyéticas y gastrointestinales no tienen tiempo suficiente como para manifestarse antes de la muerte del individuo (AFRRI 2003).

Es conveniente establecer que la secuencia de efectos de la exposición a las radiaciones ionizantes en un ARS son clasificados en distintas fases (Gourmelon y cols., 2010).

Fase Prodrómica

Los síntomas aparecen rápidamente. La severidad de los mismos en esta fase vaticina la magnitud de la exposición además de la prognosis clínica. En esta fase aparecen las náuseas y vómitos, y otros menos

específicos, como el dolor de cabeza y la fiebre. Suelen aparecer en las primeras cuarenta y ocho horas.

Fase de Latencia

Entre la fase prodrómica y la manifestación plena de la enfermedad hay un periodo de latencia con una aparente mejoría durante unas horas e incluso días tras la exposición.

Fase de Enfermedad Manifiesta

Tras el periodo de latencia, los efectos que van apareciendo en la primera etapa se hacen totalmente patentes en esta fase, derivados de la muerte celular y cese, o grave trastorno de los procesos mitóticos celulares en los tejidos afectados. Esta fase puede durar desde varios días hasta meses.

Fase de Recuperación o Muerte

La fase de recuperación es normalmente muy lenta, puede llegar a durar años. Se requiere una atención médica especializada, si bien alguno de los daños, ocasionados por las radiaciones, pueden ser irreparables dando lugar a los efectos a largo plazo. Cuando las dosis recibidas son altas se puede producir la muerte del individuo en pocos días.

I.2.1.5.2. Efectos a Largo Plazo

Los efectos biológicos a largo plazo, de la exposición a radiaciones ionizantes, pueden derivar de las propias secuelas tras un síndrome de radiación agudo, o bien de una exposición a una menor dosis pero de forma continuada, como puede ser el caso de la exposiciones a las que se ven expuestos trabajadores que estén asiduamente en contacto con fuentes

emisoras, o bien en poblaciones donde el nivel de contaminación radiológica sea muy alta, como por ejemplo, zonas de población cercanas a lugares donde se produjeron accidentes nucleares. Por este motivo, desde un punto de vista de la salud pública estos efectos a largo plazo son, si cabe, más importantes que los efectos agudos ya que afectarán a un mayor número de personas, y se harían patentes tras varios años de exposición. Además no se manifiestan a través de una única tipología de enfermedad, sino con incremento estadístico en la incidencia de ciertas condiciones ya existentes. Por ello se hace necesario el estudio de grandes cantidades de población irradiada y durante largos periodos para evitar que ese incremento de ciertas patologías no sea registrado debido a su tardía aparición, ya que como se ha apuntado anteriormente, pueden aparecer incluso tras varias generaciones (Kamiya y cols., 2015). De hecho, la prevalencia del cáncer de tiroides es muy alta en niños nacidos muchos años más tarde del accidente nuclear de Chernobyl (Kesminiene y cols., 2012).

Los principales efectos a largo plazo de la exposición a radiaciones ionizantes vienen derivados de su potencial carcinogénico. La leucemia y otros tipos de cánceres son los efectos más reportados. Los mecanismos propuestos que darían lugar a estos efectos carcinogénicos estarían vinculados a daños cromosómicos y mutaciones de células somáticas y células germinales, y la acción de los radicales libres que genera el impacto de la radiación ionizante con las moléculas de agua en el organismo (Preston y cols., 2007; Richardson y cols., 2009).

El desarrollo de enfermedades cardiovasculares también se ha asociado a la exposición continuada a radiaciones ionizantes como efecto a largo plazo. Así, desórdenes crónicos en el hígado y riñón pueden producir hipertensión que incrementaría el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (Adams y cols., 2012; Sera y cols., 2013).

En estudios sobre animales se ha demostrado que la exposición continuada a radiaciones ionizantes acorta la esperanza de vida de los individuos. Aunque los mecanismos de envejecimiento no son muy conocidos actualmente, hay teorías que afirman que las secuelas resultantes de procesos nocivos pueden ser acumulativos de forma que se puede llegar a un nivel de acumulación de daño que causaría la muerte del individuo. Por otro lado, es evidente que un organismo que ha estado sometido al efecto de las radiaciones ionizantes, habrá sufrido mayor número de alteraciones bioquímicas y mutaciones celulares por lo que, a priori, su funcionamiento será peor en comparación con otro organismo que no haya sufrido ese daño.

Los efectos genéticos son otra de las consecuencias a largo plazo derivadas de la exposición a las radiaciones ionizantes. Se pueden producir daños sobre el material hereditario del núcleo celular, de forma que cuando se produzca la división celular se transmita distorsionado. Ahora bien, si dicha alteración se produce en células germinativas que posteriormente produzcan espermatozoides u óvulos maduros darán lugar a una mutación genética en todas las células del nuevo organismo que se desarrollará, y de éste a su prole, lo que se transmitirá durante generaciones.

Por último, hay que mencionar los daños embrionarios. La mayoría de las anomalías que se producen por irradiación prenatal están relacionadas con alteraciones del sistema nervioso central, aunque va a depender de la dosis y la fase de gestación. Un importante factor a tener en cuenta es que, debido a que la susceptibilidad al daño por radiación es mayor en las primeras etapas de gestación, puede que aún no sea aparente el propio estado de gestación, por lo que habrá que prever tal posibilidad ante la más leve exposición con el fin de evitarla.

I.3. SÍNDROME DE RADIACIÓN CUTÁNEA

La piel es el primer órgano afectado ante un fenómeno de irradiación externa, por ello en primer lugar se describe, de forma breve, las principales características de este órgano, a pesar que sus funciones son bien conocidas.

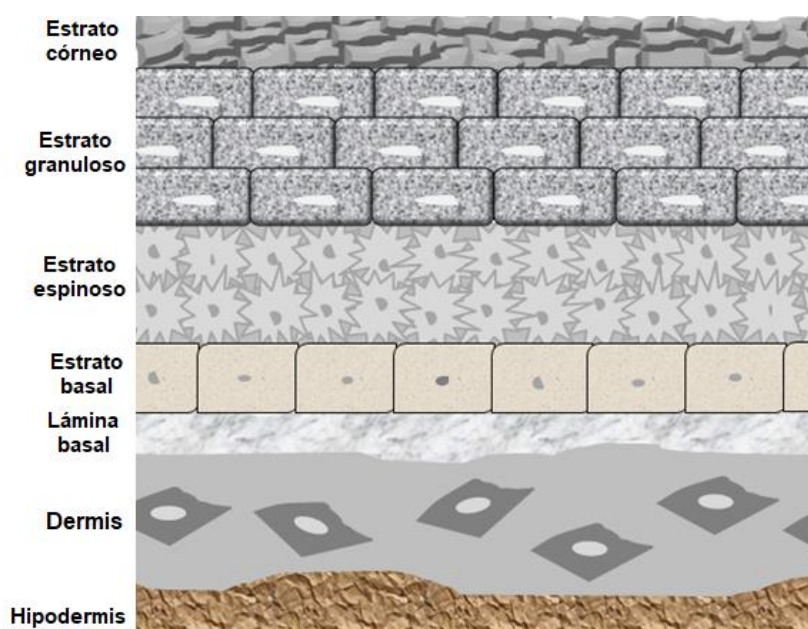


Figura 5. Presentación esquemática de las principales capas que componen la piel.

Se trata del mayor órgano del cuerpo con una superficie de aproximadamente dos metros cuadrados. La piel cumple con una serie de funciones biológicas, como son la de proteger frente a las agresiones del medio ambiente que nos rodea, además de termorreguladora, de percepción sensorial, excretora y de absorción. Está compuesta por dos capas principales (Figura 5), la dermis y la epidermis separadas por una fina

capa de naturaleza protéica de sostén, denominada lámina basal. La epidermis es la capa más exterior que proviene del ectodermo embrionario y no contiene vasos sanguíneos. Está compuesta por el epitelio escamoso estratificado, el cual está formado principalmente por queratinocitos y otro tipo de células especializadas como los melanocitos, las células de Langerhans y las células de Merkel (Javier y Ackerman 2001). La capa más baja de la epidermis es el estrato basal, el cual, está en contacto con la lámina basal. El estrato basal contiene células proliferantes en constante división, células madre con capacidad indefinida de división y que supone una fuente de provisión de células que migran hacia las capas suprabasales de la epidermis. Además del estrato basal, forman la epidermis los siguientes (en orden ascendente): el estrato espinoso, el estrato granuloso y el estrato córneo. El estrato espinoso, cuyas células llamadas espinocitos cuentan con numerosos puntos de anclaje entre células a través de desmosomas. El estrato granuloso que contiene gránulos de queratohialina y el estrato córneo, con células cornificadas que se cargan poco a poco de queratina, el cual, se va descamando provocando la regeneración con nuevos corneocitos.

Bajo la membrana basal se encuentra la dermis. La dermis proviene del mesoderma embrionario y se trata de un tejido conectivo que contiene nervios y vasos, sanguíneos y linfáticos, así como otros apéndices epidérmicos como son glándulas (sebáceas, endocrinas y apocrinas), folículos pilosos y nacimiento de uñas. Tiene un espesor de aproximadamente dos milímetros y proporciona soporte estructural y nutricional. Tanto en las glándulas sebáceas como en los folículos pilosos, tiene lugar proliferación celular, concretamente en la capa basal de la glándula sebácea y en la matriz celular del folículo piloso. Existen además otros tipos celulares en la epidermis, como los fibroblastos, macrófagos y mastocitos. La dermis actúa como un gel mucopolisacárido con fibras de

colágeno que confiere firmeza, además la elastina que contiene provee flexibilidad. El entramado de colágeno y elastina de la dermis es el responsable de las propiedades mecánicas de la piel (Reihnsner y cols., 1995). Finalmente, la hipodermis es la capa de naturaleza conectiva y adiposa más profunda de la piel, bajo la dermis. Sin embargo, actualmente no es considerada parte de la piel por alguna bibliografía.

Como se ha descrito, la piel contiene una alta proporción de células en división (Prise y Saran 2011). De hecho, la epidermis se auto-regenera cada tres semanas aproximadamente, lo que la convierte en un órgano bastante sensible a la acción de las radiaciones ionizantes (McQuestion 2011).

El daño cutáneo por radiación (CRI, del inglés *Cutaneous Radiation Injury*) se define como el daño causado en la piel y tejidos subyacentes por la exposición a altas dosis de radiación ionizante (REMM 2011). La dosis umbral para que se produzca un CRI varía de forma amplia de acuerdo a los parámetros anteriormente descritos para las radiaciones ionizantes. Sin embargo, la literatura médica ha establecido las dosis en un rango de entre 300 y 500 cGy. Los efectos perjudiciales del CRI también aparecen de forma aguda (efectos tempranos) y crónicos (efectos a largo plazo). La diferencia entre estos dos tipos de efectos en términos de tiempo radica en la velocidad de proliferación y los ciclos mitóticos de la amplia variedad de células epiteliales afectadas (Dion y cols., 1989). Hay que aclarar que la literatura contempla datos de exposiciones a radiaciones ionizantes que tuvieron lugar de forma accidental o bien terapéutica, y en menor proporción de los estudios de víctimas en grandes desastres como Chernobyl o Fukushima, porque las lesiones cutáneas de las víctimas en Hiroshima y Nagasaki en 1945 fueron producidas por energía térmica más que por la propia radiación ionizante (Wiener y Barrett 1986).

I.3.1. Efectos Cutáneos de las Radiaciones Ionizantes

I.3.1.1. Efectos Cutáneos Agudos

Los efectos del CRI progresan con el tiempo en varias etapas como como las ya descritas en el capítulo anterior, que además pueden ser categorizadas en función del grado de gravedad. La fase prodrómica tendrá lugar transcurridas unas cuantas horas tras la exposición, apareciendo eritemas, sensación de calor y picor (~2 Gy). Tras uno o dos días de la exposición el daño no se aprecia (fase de latencia). La duración de la fase dependerá de la magnitud de la exposición y áreas afectadas, de forma que la cara, el pecho y el cuello tienen un menor periodo de latencia que por ejemplo las palmas de las manos. Tras la fase de latencia la enfermedad se hará plenamente manifiesta, y aparecerán nuevamente eritemas y depilación de la piel (~8 Gy), sensación de calor y edemas, que suelen aparecer con pigmentación (~15 Gy). Dependiendo de la severidad de la irradiación puede aparecer descamación de la piel (~22 Gy), ulceración (~35 Gy) e incluso necrosis (>40 Gy) (Ryan 2012). Es característica en el CRI la aparición, de diez a quince semanas tras la exposición, sobre todo en el caso de partículas beta, de nuevos eritemas y edemas debido al daño en vasos sanguíneos y linfáticos y gran dolor, debido a posible necrosis y atrofia dérmica (IPC 2005).

La gravedad del daño y del correspondiente efecto en la piel puede variar. No existe un sistema de graduación seguido universalmente, sino múltiples. El más empleado es el *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE) (NCI 2017). De acuerdo a este sistema los grados de gravedad van en orden ascendente de 1 a 5. En la Tabla 2 se esquematizan los principales efectos asociados a cada grado.

Tabla 2. Clasificación del daño agudo por radiación de acuerdo al CTAE.

Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5
- Eritema leve o descamación seca.	-De moderado a fuerte eritema. -Descamación húmeda parcheada, mayormente limitada a los pliegues y arrugas de la piel. -Edema moderado	-Descamación húmeda en áreas distintas de pliegues y arrugas de la piel. -Sangrado inducido por traumatismo menor o abrasión.	-Consecuencias que amenazan la vida. -Necrosis de la piel o ulceración de la dermis de su total espesor. -Sangrado espontáneo en las áreas afectadas.	-Muerte.

I.3.1.2. Efectos Cutáneos a Largo Plazo

Los efectos cutáneos a largo plazo aparecen en algunos casos incluso pasados algunos años desde la exposición a las radiaciones ionizantes. También puede darse el caso de que la aparición de efectos a largo plazo no esté precedida por la aparición de los efectos agudos (Jaschke y cols., 2017). Los efectos más representativos incluyen úlceras retardadas en el tiempo, fibrosis, atrofia, cambios de pigmentación, telangiectasias, pérdida de órganos anejos a la piel, daños en folículos pilosos y glándulas sudoríparas y sebáceas, así como el desarrollo de enfermedades cutáneas, incluidas las tumorales (Spalek 2016). Las calcificaciones distróficas subcutáneas son también consideradas como un efecto a largo plazo de la exposición a las radiaciones ionizantes (Mahomed y cols., 2011). Todos estos efectos parecen estar producidos por un desequilibrio entre citoquinas pro-inflamatorias y pro-fibróticas (Spalek 2016).

Al contrario que en la escala de graduación de gravedad del CTCAE, la cual no considera la gravedad de los efectos a largo plazo, el Grupo de Radioterapia Oncológica (RTOG, del inglés *Radiation Therapy Oncology Group*) y Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer (EORTC, del inglés *European Organization for Research and*

Treatment of Cancer) (Cox y cols., 1995), proponen una graduación de la gravedad de los efectos a largo plazo, tal y como se expone en la Tabla 3.

Tabla 3. Clasificación del daño a largo plazo por radiación de acuerdo al RTGO/EORTC

	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5
Piel	-Ninguna	-Leve atrofia	-Atrofia parcheada	-Atrofia grave	-Ulceración	-Muerte
		-Cambios en la pigmentación	-Telangiectasia moderada	-Gran telangiectasia		
		-Pérdida de pelo	de -Pérdida total de pelo			
Tejido subcutáneo	-Ninguna	- Leve fibrosis	-Fibrosis moderada pero con leve contractura de campo menor del 10% de reducción lineal	-Severo endurecimiento y pérdida de tejido subcutáneo con contractura mayor al 10%	-Necrosis	-Muerte
		-Pérdida de grasa subcutánea				

Por otro lado, el riesgo de la aparición de cáncer cutáneo no melanómico aumenta tras años post-radiación (Suárez y cols., 2007). Concretamente, aquellos carcinomas relacionados con anomalías en keratinocitos (carcinomas de las células basales, queratoacantoma y carcinoma espinocelular) son tumores relacionados con la exposición a radiaciones ionizantes (Karagas y cols., 2007). Sin embargo, no queda clara la relación entre la exposición a radiaciones ionizantes y la incidencia de melanomas (Sugiyama y cols., 2014).

I.4. FISIOLÓGÍA DE LA HERIDA

Las heridas en la piel van a suponer la interrupción de la continuidad de la piel por cualquier tipo de agresión ya sea mecánica, química, térmica o biológica, que supone la rotura de la superficie cutánea y que puede conllevar la pérdida de tejido cutáneo o subcutáneo. Las heridas se pueden dividir en función del tiempo de cicatrización en **heridas agudas** y **heridas crónicas** (Dreifke y cols., 2015). Las heridas agudas pueden estar producidas por distintas causas como incisiones, abrasiones o laceraciones y su cicatrización es relativamente rápida en personas sin problemas serios de salud. Por el contrario, en las heridas crónicas los mecanismos de reparación no funcionan correctamente para conseguir su cicatrización, por lo que ésta no se produce manteniendo la herida abierta durante largo tiempo. Normalmente están asociadas a otras patologías (diabetes, obesidad, etc.).

El mecanismo de cicatrización es un proceso reparativo complejo de regeneración del tejido cutáneo, el cual tiene lugar en varias etapas (Singer and Clark, 1999).

Fase homeostática

La rotura endotelial implica la rotura vascular en la que se segregan una serie de mediadores y factores que inician la coagulación y agregación plaquetaria. Igualmente, el colágeno y la trombina extravascular intervienen en los mecanismos de activación plaquetaria. Las plaquetas promueven la coagulación a través de la segregación de otra serie de proteínas y factores de activación (trombospondina, fibronectina, factor plaquetario, proteasas, etc.) que iniciarán una cascada de interacciones bioquímicas para la formación del trombo de fibrina. El trombo de fibrina cierra la herida evitando la hemorragia, y además funciona como reservorio de citoquinas, factores

de crecimiento (Tabla 4), y de matriz que promueve la migración de varios tipos celulares que intervienen en la cicatrización como células inflamatorias, dérmicas y epidérmicas (Clark 1993).

Fase inflamatoria

La inflamación tiene una función defensiva por la vasoconstricción rápida para evitar la hemorragia en los primeros momentos. Posteriormente, se produce una vasodilatación a través de diversas señales químicas que promueve la migración de neutrófilos hacia el área afectada para combatir potenciales agentes patógenos a través de enzimas proteolíticas. Igualmente, monocitos migran hacia dicha área dañada y se diferenciarán en macrófagos con la función de limpieza mediante fagocitación. Estos macrófagos, a su vez, liberan otra serie de mediadores químicos que junto a los liberados por las plaquetas (Tabla 4) favorecen la llegada de queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales (Hubner y cols., 1996).

Fase proliferativa

En esta fase comienza la proliferación de los fibroblastos, la angiogénesis y la síntesis de matriz extracelular para la reconstrucción vascular del tejido granular y la reepitelización. Los fibroblastos proliferan y comienza a sintetizar la matriz extracelular, formada principalmente por colágeno III y colágeno I, fibronectina, ácido hialurónico, condroitín sulfato, dermatán sulfato y heparán sulfato (proteoglicanos). Los macrófagos también generan una continua fuente de factores de crecimiento necesarios para estimular la fibroplasia y la angiogénesis (Senet, 2008) (Tabla 4). La propia matriz extracelular actúa como reservorio de factores de crecimiento que activarán y modularán la propia acción de los fibroblastos. Debido a las condiciones de hipoxia en el interior de la herida, esta sirve de señal para la liberación de factores relacionados con la angiogénesis y factores de

crecimiento de células endoteliales. La migración de las células endoteliales se produce desde el endotelio vascular de los márgenes de la herida formando una nuevo entramado de vasos en la matriz celular neoformada. Una vez que la herida se ha cubierto con nuevo tejido granuloso, el proceso de angiogénesis cesa y muchos de los vasos recién creados desaparecen por apoptosis (Ilan y cols., 1995). La herida va paulatinamente contrayéndose por la transformación de los fibroblastos en miofibroblastos.

Tabla 4. Citoquinas que intervienen en la cicatrización

Citoquina	Fuente principal	Efectos
Factor de crecimiento epidérmico	Plaquetas	Movilidad y proliferación de células pleiotrópicas
Factor de crecimiento transformante alfa	Macrófagos, células epidérmicas	Movilidad y proliferación de células pleiotrópicas
Factor de crecimiento ligado a heparina	Macrófagos	Movilidad y proliferación de células pleiotrópicas
Factor de crecimiento de fibroblastos básico	Macrófagos, células endoteliales	Angiogénesis y proliferación de macrófagos
Factor de crecimiento de fibroblastos ácido	Macrófagos, células endoteliales	Angiogénesis y proliferación de macrófagos
Factor de crecimiento de queratinocitos	Fibroblastos	Movilidad y proliferación de células epidérmicas
Factores de crecimiento transformantes beta 1 y beta 2	Plaquetas, fibroblastos	Movilidad de las células epidermales, quimiotaxis de macrófagos y fibroblastos, síntesis y remodelación de la matriz extracelular
Factor de crecimiento transformantes beta 3	Macrófagos	Efectos antiescarantes
Factores de crecimiento plaquetario	Plaquetas, macrófagos, células epidermales	Proliferación y quimioatracción de fibroblastos, quimioatracción y activación de macrófagos
Factor de crecimiento endotelial vascular	Células epidermales, macrófagos	Angiogénesis e incremento de las permeabilidad vascular
Factor de necrosis tumoral alfa	Neutrófilos	Expresión pleiotrópica de factores de crecimiento
Interleuquina 1	Neutrófilos	Expresión pleiotrópica de factores de crecimiento
Factor de crecimiento tipo insulínico 1	Fibroblastos, células epidermales	Reepitelización y formación de tejido granulosos
El factor estimulante de colonias 1	Múltiples células	Activación de macrófagos y formación de tejido granuloso

Fase de remodelación

Las fibras de colágeno tipo II son gradualmente sustituidas por un tipo de colágeno más sólido como el colágeno tipo I, lo que le confiere a la piel una mayor resistencia. Se produce la reepitelización por la liberación de señales quimotácticas que inician la migración de células epiteliales desde los apéndices de epidermis residual y de los bordes de la herida. Los queratinocitos emigran sobre los componentes de la matriz, una vez que se cierra la herida se detiene la migración. Igualmente se reconstruye la unión dermoepidérmica desde los márgenes internos de la herida. La fase de remodelación puede proseguir durante meses e incluso años. Sin embargo la zona cicatrizada siempre tendrá menor resistencia y elasticidad que la piel sana, debido a un déficit de elastina y mayor desorganización de la remodelada matriz extracelular (Blais y cols., 2013).

I.4.1. Quemaduras por Radiaciones Ionizantes

Las quemaduras son lesiones tisulares de los tegumentos cutáneos que pueden ser producidas por efecto de distintos agentes produciendo la muerte celular y lesión tisular.

Entre los distintos tipos de quemaduras en función del agente etiológico que las origine se clasifican en quemaduras térmicas (por una fuente directa de calor o bien calor radiante), quemaduras eléctricas, quemaduras químicas, quemaduras radioactivas.

En función del grado de afectación suelen ser clasificadas como de primer grado, en el caso que afecten a la epidermis, de segundo grado superficial cuando queda afectada la dermis superficial, de segundo grado profundas, en el caso que quede afectada la dermis profunda, y de tercer grado si sobrepasa la dermis.

Centrándonos en las quemaduras por radiación, hay que establecer unas diferencias con las quemaduras térmicas. La alta energía de las radiaciones ionizantes va a producir la muerte de las células en constante división, de ahí que las capas de la piel más externas compuestas de células sin núcleo sean más resistentes a las radiaciones ionizantes; a diferencia que en el caso de la energía térmica que afectará, en primer lugar a estas capas más exteriores por ser la primera barrera física. En las quemaduras por radiaciones ionizantes, sus efectos serán patentes tras un periodo de latencia, mientras que en las quemaduras por otros agentes no existe tal periodo, siendo evidentes tras el contacto con la piel.

Como ya se ha comentado en capítulos anteriores en función de la dosis recibida los efectos de la exposición a radiaciones ionizantes variarán. En orden creciente de dosis seguiría un desarrollo en el que, en primer lugar, aparecería el enrojecimiento o eritema de la zona afectada con posible pérdida del vello o pelo, a mayores dosis, acompañado de edema. El eritema se debe a un aumento del flujo sanguíneo producido por una vasodilatación, la cual está asociada a una primera inflamación debido a la segregación de histamina. Frecuentemente el eritema puede estar acompañado de edema debido a una mayor permeabilidad de los vasos sanguíneos y linfáticos, con el consiguiente trasvase de fluidos.

A mayores dosis se produciría una descamación seca, producida por el daño celular producido en el estrato basal epidérmico y daño de glándulas sebáceas. Esta descamación, a mayores dosis de radiación pasa a cursar como descamación exudativa (descamación húmeda) que cursa con mayor dolor, y aumenta el riesgo de infecciones.

Los mayores daños debido a una mayor dosis recibida se manifestarían como úlceras y necrosis de la piel.

Por otro lado, los efectos a largo plazo de la exposición a radiaciones ionizantes, se manifiestan a través de edemas tardíos que pueden ser

indicadores de subsiguientes daños vasculares. Estos daños vasculares se traducen en telangiectasias (conocidas como “arañas vasculares”), las cuales en sus manifestaciones más graves pueden dar lugar a nuevos edemas e incluso sangrado.

Igualmente, en los daños producidos a largo plazo, en función de las dosis recibidas o un tiempo continuado de exposición a la radiación se producen también ulceraciones y fenómenos necróticos.

Sin duda el daño cutáneo más grave a largo plazo derivado de la exposición a las radiaciones ionizantes es la fibrosis cutánea. Se trata de una lesión en la que se produce una atrofia, retracción e induración, y que puede llegar a afectar a las capas más profundas de la piel. Está causada por inducción e interacción entre múltiples factores de crecimiento y citoquinas que resultan en la proliferación y disfunción de los fibroblastos, traducida en una hiper-producción de colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular (Dormand y cols., 2005).

I.5. TERAPIA FARMACOLÓGICA DEL DAÑO CUTÁNEO RADIO-INDUCIDO

El tratamiento médico de las lesiones producidas por exposición a la radiación ionizante proporciona una mejora de la calidad de vida del paciente y disminuye la mortalidad. Unas de las principales complicaciones en el tratamiento de individuos que han sido irradiados es la propia invisibilidad del síndrome durante las primeras etapas. Por un lado, porque en ocasiones el propio individuo desconoce que ha estado expuesto a una fuente de radiación (la radiación no es percibida por los sentidos), y por otra parte, porque el periodo de latencia de la enfermedad puede ser prolongado hasta el desarrollo manifiesto de la enfermedad (Ward y cols., 2012).

Actualmente no existen tratamientos que estén particularmente destinados a dicha afección. Por esta razón se proponen una serie de técnicas y agentes paliativos que pueden ser clasificados como estrategias preventivas y paliativas del daño cutáneo radio-inducido (Chan y cols., 2014).

Debido a que la función protectora de la piel tras la exposición a radiaciones ionizantes o bien una potente fuente térmica va a quedar mermada, el individuo quedará predispuesto a sufrir una serie de infecciones graves. Estas infecciones pueden ser causadas por agentes patógenos oportunistas tanto a nivel local como a nivel sistémico. Los agentes patógenos oportunistas pueden ser de origen bacteriano o bien de origen fúngico, representando éstos últimos un riesgo creciente en las unidades sanitarias especializadas en este tipo de cuidados (Renau Escrig y cols., 2016). Entre los agentes fúngicos más frecuentes se encuentran los del género *Candida*, *Aspergillus* y *Fusarium*, si bien son las especies de *Candida* el principal agente causal, lo que sin duda representa un grave

problema que contribuye a un aumento en la morbilidad y el coste sanitario (Renau y cols., 2016).

En este contexto el fármaco clotrimazol ha mostrado tener una potente acción antifúngica, así como actividad antimicobiana sobre algunas bacterias gram-positivas (Alsterholm y cols., 2010). Por lo que sobre la base de las anteriores consideraciones es uno de los agentes farmacológicos elegidos para el diseño y evaluación de nuevos sistemas de liberación tópica en este trabajo.

Por otra parte, la literatura científica ha demostrado el potencial de diversos antioxidantes en el tratamiento de las lesiones cutáneas producidas tanto en el ámbito de la exposición a radiaciones ionizantes como en el caso de quemaduras producidas por agentes térmicos.

En tales condiciones se origina un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) por una radio-lisis de las moléculas de agua. Estas ROS, en exceso, producen una modificación oxidativa de lípidos, proteínas y del ADN de la célula (Sánchez y cols., 2015). Los antioxidantes son importantes mediadores en la regulación del daño a moléculas biológicas como el ADN, proteínas, lípidos y tejido corporal en presencia de esas ROS. Estos activos son beneficiosos por su capacidad para neutralizar esos radicales libres, además de participar en otros procesos biológicos en la regeneración y cicatrización de la piel (Fitzmaurice y cols., 2011).

Entre los antioxidantes más reportados se encuentran moléculas biológicas, como es el caso de las vitaminas A, D y E. Al igual que en el caso anterior, los potenciales efectos beneficiosos de los antioxidantes como agentes farmacológicos son el motivo de elección para la investigación que se desarrolla en este trabajo sobre sistemas de transporte y liberación tópica.

I.5.1. Clotrimazol

El clotrimazol es un antifúngico de amplio espectro, que se obtiene de forma sintética mediante la alquilación del imidazol con cloruro de o-clorotritilo en acetona, con trietilamina como base. Fue el primer antifúngico imidazólico comercializado. Sus propiedades antimicóticas fueron descubiertas a finales de los años sesenta (Crowley y Gallagher, 2014). Tiene acción farmacológica contra dermatofitos patógenos, hongos filamentosos y dimórficos, y levaduras patógenas como *Pityrosporum orbiculare*, la forma de levadura del hongo *Malassezia furfur*, así como algunas bacterias gram-positivas (Alsterholm y cols., 2010). Igualmente, ejerce acción fungicida *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*, *Fusarium solam*, *Triadelphia pulvinata*, *Thrichophyton rubrum*, *Thrichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* y *Candida albicans* (Crowley y Gallagher, 2014). Además, es usado en el tratamiento de la tricomoniasis resistente a metronidazol, para aliviar los síntomas (Cudmore y cols., 2004). El clotrimazol también exhibe actividad antimalárica *in vitro*, posiblemente por acción inhibitoria sobre la hemoperoxidasa, causando así un estrés oxidativo en el parásito (Trivedi y cols., 2005).

Se utiliza principalmente como agente antifúngico a nivel local, en piel y superficies mucosas como la mucosa vaginal y orofaríngea, de infecciones causadas por las especies antes citadas que dan lugar a candidiasis, tiña versicolor, tiña corporal, pie de atleta y tiña inguinal.

Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que el clotrimazol además tiene otras acciones biológicas, concretamente una potente acción inhibitoria del canal Gardos (hSK4). Es un canal de K⁺ activado por Ca²⁺ (perteneciente a la familia de canales de potasio activados por Ca de baja conductancia) en eritrocitos falciformes en la anemia drepanocítica. La

inhibición de este canal previene de la pérdida de K y la deshidratación celular (Brugnara, 2003). Igualmente, se ha descrito la acción bloqueante del clotrimazol sobre el canal de Ca^{2+} tipo L voltaje-dependientes en miocitos cardíacos, sobre corrientes de K^+ voltaje-dependientes en células beta pancreáticas de ratón y varios tipos de canales Kv voltaje-dependientes en líneas celulares de mamíferos (Tian y cols., 2006).

Se comercializa bajo diferentes nombres comerciales y por varias compañías en todo el mundo. En el ámbito de la Unión Europea, el clotrimazol está comercializado como crema tópica y formulaciones vaginales (crema, comprimidos, cápsulas blandas y óvulos). En Estados Unidos existen además polvos, pastillas y solución tópica. También existen formulaciones de clotrimazol junto con hidrocortisona y betametasona (Sweetman 2007).

En el ámbito de la investigación y el desarrollo, las formulaciones con clotrimazol que han sido publicadas en la literatura especializada incluyen: nanopartículas poliméricas (Verma y Ahuja, 2015), nanopartículas lipídicas (Kalhapure y cols., 2015), microcápsulas (Yuen y cols., 2012), liposomas (Pavelić cols., 2005), geles (Chang y cols., 2002), microemulsiones (Zhang y Michniak-Kohn, 2018), emulsiones múltiples (Suñer y cols., 2017) y nanoemulsiones (Soriano-Ruiz y cols., 2018).

I.5.1.1. Propiedades Fisicoquímicas

El clotrimazol es un polvo blanco o amarillento cristalino. Su punto de fusión está entre 146 °C y 149 °C, y tiene un peso molecular de 344.843 g/mol y un pKa de 4.7. Se trata de una base débil que es ligeramente soluble en agua, benceno y tolueno. Es soluble en acetona, cloroformo, acetato de etilo y dimetilformamida. Se hidroliza rápidamente al calentarse en ácidos acuosos (Enna y Bylund 2008).

Químicamente se trata del 1-(2-clorofenil)-difenilmetil-1H-imidazol con la siguiente fórmula $C_{22}H_{17}ClN_2$. La estructura química es mostrada en la Figura 6. Contiene cuatro anillos aromáticos unidos a un átomo de carbono tetraédrico (hibridado sp^3). Uno de los grupos aromáticos es un anillo de imidazol, lo que facilita las reacciones de transferencia de electrones en sistemas biológicos (Eaton y Wilson 1979). Los anillos aromáticos restantes comprenden un sistema de trifenilmetilo. Uno de estos anillos está sustituido con Cl en su posición C2. Aunque el clotrimazol es una molécula no quiral, sus dos anillos fenílicos son enantiotópicos, uno de los cuales es pro-R y el otro pro-S.

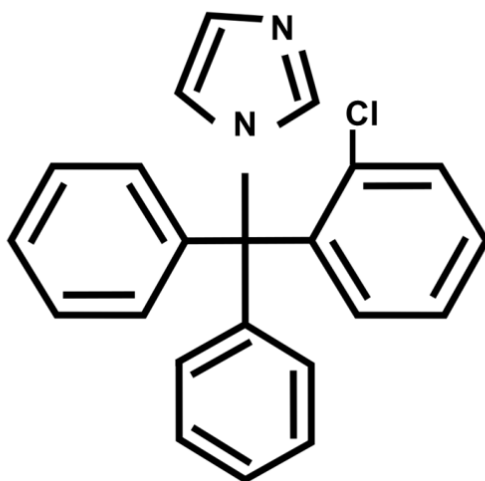


Figura 6. Estructura química del clotrimazol.

I.5.1.2. Mecanismo de Acción

La familia de los antimicóticos tipo imidazol interfieren en la biosíntesis del ergosterol mediante la inhibición de la esteroil 14-alfa-desmetilasa, una de las especies del citocromo P450, la cual, actúa en la desmetilación del lanosterol hacia el ergosterol.

El ergosterol es un componente lipídico de la membrana en hongos y levaduras que, a semejanza del colesterol en mamíferos, da fluidez e integridad a la membrana e interviene en la correcta funcionalidad de otras enzimas, como la quitina sintetasa, involucrada en el crecimiento y división celular.

La interrupción en la biosíntesis del ergosterol y su reemplazo por especies aberrantes de esteroides (14-alfa-metilesteroides) en la membrana van a producir una disfuncionalidad en la misma que finalmente resulta en la pérdida de fluidez y permeabilidad, así como la disminución de la actividad enzimática relacionada. Todos estos eventos derivan en una filtración del contenido celular así como la inhibición del crecimiento fúngico.

I.5.1.3. Propiedades Farmacocinéticas

La absorción oral está contraindicada por ser pobre y muy variable. Su absorción intravaginal es del 3-10%. La absorción tópica es también casi inexistente. Se metaboliza principalmente en dos metabolitos principales y tres minoritarios que se eliminan a través de heces y la orina. El clotrimazol induce la actividad de la enzima microsomal hepática, acelerando su propio catabolismo (Enna y Bylund, 2008).

Tras la aplicación tópica en la piel, el clotrimazol se distribuye en las capas de la epidermis y suele alcanzar concentraciones mayores que las concentraciones inhibitorias mínimas para casi todos los hongos patógenos. Los niveles más altos se encuentran en el estrato córneo (50-100 µg /mL) y el más bajo en el estrato basal (1.53-3 µg/mL) (Noble 2003).

I.5.1.4. Efectos Secundarios

Los efectos secundarios asociados al clotrimazol cuando se administra por vía oral están relacionados con trastornos gastrointestinales, elevación de las enzimas hepáticas, disuria e incluso depresión (Enna y Bylund, 2008). En la aplicación tópica, en muy contadas ocasiones se han descrito irritación de la piel, picor y algunas dermatitis alérgicas (Kalb y Grossman, 1985).

I.5.2. Antioxidantes

La terapia con antioxidantes en el daño cutáneo radio-inducido es una de las perspectivas menos estudiadas dentro de la amplia gama de tratamientos abordados en este campo particular, tanto para la prevención como para el tratamiento del daño asociado a la exposición a radiaciones ionizantes (Bolderston y cols., 2005).

Entre los efectos biológicos que las radiaciones ionizantes tienen sobre la piel y mucosas está la generación de un exceso de ROS por una radio-lisis de las moléculas de agua. Estas ROS en exceso producen una modificación oxidativa de lípidos, proteínas y el ADN de la célula (Sánchez y cols., 2015).

Existe una amplísima variedad de sustancias antioxidantes que han sido estudiadas para la profilaxis y tratamiento tópico del daño radio-inducido (Soriano y cols., 2018). Por esta razón, a continuación se describen los principios activos evaluados en este trabajo de investigación.

I.5.2.1. Vitamina A

La vitamina A o retinol, es una vitamina liposoluble esencial (Figura 7A). Se presenta como un líquido oleoso amarillento insoluble en agua y parcialmente soluble en etanol. Para mejorar su solubilidad se sintetiza una sal soluble, como por ejemplo el retinol palmitato, el cual es soluble en agua y en etanol (Figura 7B). Su fórmula empírica es el $C_{36}H_{60}O_2$, su peso molecular 524.86 g/mol y su punto de fusión entre 28 °C y 29 °C.

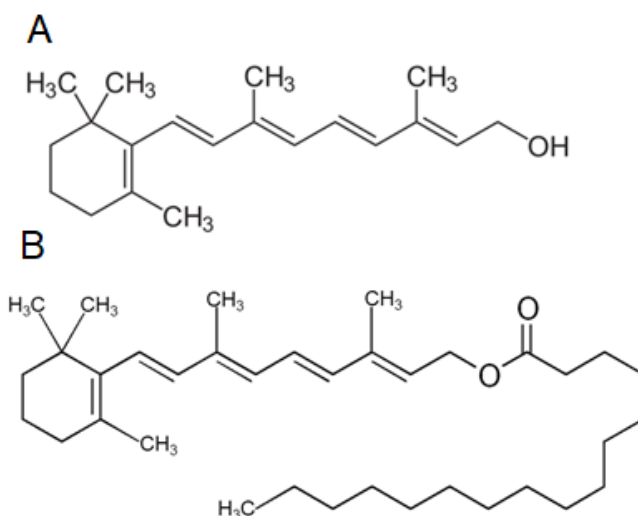


Figura 7. Estructura química del retinol (A) y retinol palmitato (B)

Existen una serie de compuestos similares a la vitamina A con estructura muy similar conocidos como retinoides y carotenoides, que ejercen el mismo tipo de actividad. Su capacidad antioxidante fue puesta de manifiesto por su capacidad de proteger los lípidos contra la oxidación. En la actualidad se conocen aproximadamente 600 tipos diferentes de estos compuestos (Stahl y Sies 1996). Todos ellos tienen actividad antioxidante mediante la neutralización de los radicales libres de oxígeno y peróxido.

La vitamina A se absorbe fácilmente. Los ésteres de vitamina A sufren una hidrólisis en el intestino por enzimas pancreáticas, aunque es reabsorbida. Este retinol se distribuye principalmente unido a la globulina alfa-1 específica (Enna y Bylund, 2008).

Entre los principales efectos biológicos de la vitamina A se encuentran la formación de pigmentos en la retina, interviene en el crecimiento y desarrollo óseo, y en la funcionalidad de las membranas biológicas.

Por vía tópica tiene una gran actividad antioxidante con propiedades regenerativas y protectoras de la piel, promoviendo tanto la descamación como evitando la hiperqueratosis. Se ha demostrado que la vitamina A interviene en varios aspectos de la curación de heridas a través de la estimulación de la angiogénesis, la síntesis de colágeno y la epitelización. Igualmente, la vitamina A inhibe la acción retardante de los anti-inflamatorios esteroides en la cicatrización de heridas (Abdelmalek y Spencer 2006)

I.5.2.2. Vitamina D

La vitamina D es una vitamina liposoluble. Puede presentarse de varias formas, siendo las más importantes la vitamina D₂ o ergocalciferol, y la vitamina D₃ o colecalciferol (Figura 8), ambas precursoras de la forma activa para el organismo, el calcitriol. El ergocalciferol tiene un peso molecular de 396.65 g/mol y fórmula empírica C₂₈H₄₄O, con punto de fusión entre 114 °C y 118 °C. El colecalciferol tiene una fórmula empírica C₂₇H₄₄O, peso molecular de 384.648 g/mol y punto de fusión entre 84 °C y 85 °C. Físicamente ambas se presentan como sólidos en forma de cristales blanquecinos, prácticamente insoluble en agua y soluble en etanol y éter.

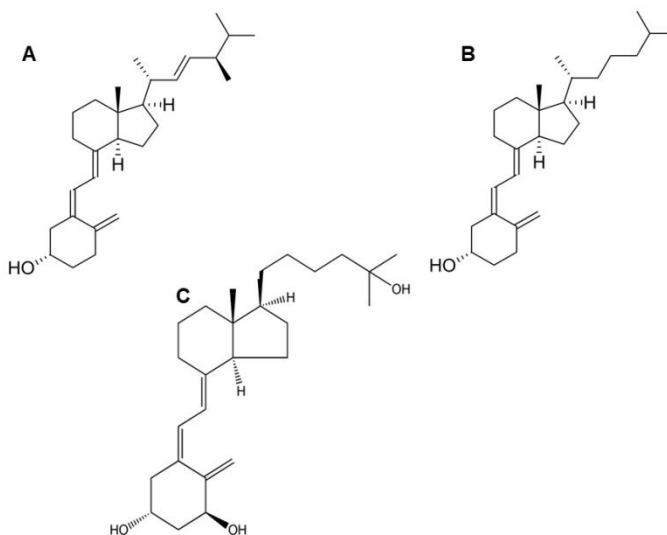


Figura 8. Estructura química del ergocalciferol (A), colecalciferol (B) y calcitriol (C).

La mayor fuente de vitamina D se obtiene mediante la síntesis cutánea por la exposición solar a partir del 7-dehidrocolesterol. También se puede obtener de fuentes exógenas mediante alimentos de origen animal (colecalciferol) y vegetal (ergocalciferol). El aporte exógeno de vitamina D se absorbe en el intestino llegando al hígado unida a la proteína transportadora de vitamina D. Cualquiera de las formas de la vitamina D (ergocalciferol y colecalciferol) son inactivas, por lo que para ejercer sus funciones biológicas debe ser activada mediante hidroxilación tanto en el hígado como en el riñón convirtiéndose en el metabolito activo calcitriol, el cual ejercerá su actividad mediante la unión a receptores de vitamina D (Zanuy y Carranza 2007).

Las funciones biológicas de la vitamina D más conocidas son el mantenimiento de la homeostasis del calcio y fósforo, promoviendo la mineralización ósea (Need y cols., 2008). También tiene propiedades antioxidantes, además de una serie de funciones reguladoras en la actividad

neuromuscular, presión arterial y acciones inmunológicas (Fitzmaurice y cols., 2011).

Igualmente, la vitamina D tiene propiedades protectoras contra la proliferación de queratinocitos derivados del daño causado por las radiaciones ionizantes. Concretamente el calcitriol inhibe la muerte celular programada mediante la inhibición de dos vías, la caspasa dependiente y la caspasa independiente (Nasser y cols., 2017). En este mismo contexto, también se ha demostrado el papel del colecalciferol en la cicatrización de heridas (Leivo y cols., 2000). Aunque ninguno de estos estudios han sido llevados a cabo en humanos.

I.5.2.3. Vitamina E

La vitamina E fue descubierta en 1922 por Evans y Bishop (Traber y Atkinson 2007). Como vitamina E se conoce a una serie de compuestos llamados tocoferoles y tocotrienoles, incluyendo el alfa-tocoferol, beta-tocoferol, gamma-tocoferol, delta-tocoferol, y las mismas series de tocotrienoles. El alfa-tocoferol es la forma con mayor actividad biológica, debido a su poca solubilidad se utiliza normalmente en forma de sal, como por ejemplo el alfa-tocoferol acetato (Figura 9), con un peso molecular de 472.754 g/mol y fórmula empírica $C_{31}H_{52}O_3$, con punto de fusión entre 26.5 y 27.5 °C. Se presenta como un líquido oleoso amarillento prácticamente insoluble en agua y soluble en etanol.

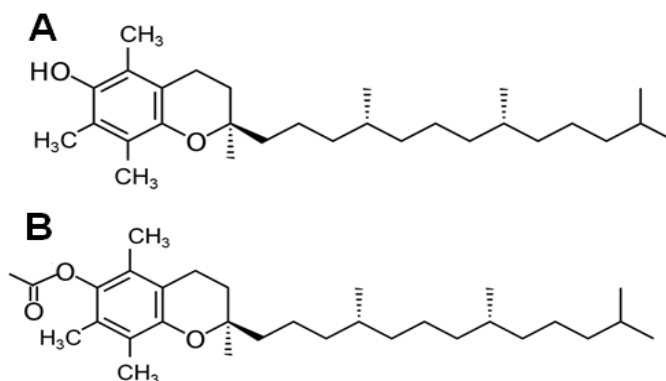


Figura 9. Estructura química del alfa-tocoferol (A) y alfa-tocoferol acetato (B).

Dado el carácter lipófilo de la vitamina D se absorbe a nivel del intestino solubilizada por sales biliares con una biodisponibilidad del 20-80%. Una parte se metaboliza en el hígado siendo eliminada principalmente por orina y en menor medida por bilis. El alfa-tocoferol es un antioxidante potente que se encuentra de forma natural en aceites vegetales y frutos secos, con una gran actividad antioxidante, que funciona rompiendo cadenas lipídicas durante el proceso de peroxidación de membranas celulares y diversas partículas lipídicas como las lipoproteínas de baja densidad (LDL) interceptando radicales peroxilo lipídicos generando hidroperóxidos lipídicos relativamente estables (Nimse y Palb 2015). Se ha demostrado que tiene actividad protectora contra el daño causado por la radiación ultravioleta (Yoshida y cols., 2006), así como de la necrosis de la piel en radiodermatitis inducida (Martella 2010). El uso tópico de vitamina E por sus propiedades antioxidantes se ha convertido en un tratamiento de referencia, de hecho la mayoría de las cremas cosméticas antienvjecimiento llevan una pequeña cantidad de vitamina E. Aprovechando su carácter antioxidante ha sido también utilizada en el tratamiento tópico de quemaduras, cicatrices, heridas (Thiele y Ekanayake-Mudiyanselage 2007) y granuloma anular (Baumann y Spencer 1999).

I.6. NUEVAS FORMAS DE DOSIFICACIÓN PARA EL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DEL DAÑO RADIO-INDUCIDO

I.6.1. Nanoemulsiones

Las nanoemulsiones son dispersiones coloidales multifase termodinámicamente inestables de un líquido oleoso y otro acuoso estabilizadas por moléculas de compuestos surfactantes (Gupta y cols., 2016). Son transparentes debido a que el tamaño de las gotas de la nanoemulsión son menores de un cuarto de la longitud de onda de la luz visible, aproximadamente 150 nm, de modo que aparecen transparentes al ojo humano. Clásicamente, en la literatura, este tamaño de gota fue utilizado como indicador a la hora de diferenciar las nanoemulsiones o también llamadas miniemulsiones, de las microemulsiones. Sin embargo, los verdaderos criterios para diferenciar las nanoemulsiones de las microemulsiones se basan en que las microemulsiones son termodinámicamente más estables que las nanoemulsiones y se forman espontáneamente por auto-ensamblaje de las dos fases sin necesidad de aplicar energía externa, como por ejemplo la agitación (McClements, 2012). En el caso de las nanoemulsiones hay que aplicar una energía externa para su formación (agitación, ultrasonidos, temperatura, etc). Por eso las microemulsiones pueden tener el mismo tamaño que las nanoemulsiones (Mason y cols., 2006). Por otra parte, puede haber también diferencias estructurales entre las nanoemulsiones y las microemulsiones. Las gotas de una nanoemulsión tienden a ser esféricas debido a una relativamente alta tensión interfacial y un pequeño tamaño, y por tanto una alta presión de Laplace lo que hace que el sistema tienda a reducir el área interfacial,

siendo la forma de esfera la que menor área interfacial presenta para un volumen determinado (Israelachvili, 1992). En cambio, la forma de gota de las microemulsiones pueden ser esféricas o no, dependiendo de la curvatura óptima de la monocapa que forma el surfactante, ya que su tensión interfacial es más baja en las microemulsiones O/W.

En función de su disposición de fases, fase externa (también llamada dispersante o continua) y fase interna (también llamada dispersa o discontinua), pueden clasificarse como O/W (del inglés *Oil in Water*) en la que la fase externa es acuosa, o bien W/O (del inglés *Water in Oil*) en la que la fase externa es oleosa.

El compuesto surfactante (término castellanizado del inglés *surfactant*, y a su vez mezcla de *SURFace ACTIVE AgeNT*) es el que va a formar una monocapa que estabiliza estas dos fases que en sí mismas son inmiscibles o poco miscibles y que de otra forma serían termodinámicamente inestables (Figura 10), ya que surge entre ambas una tensión interfacial que es aliviada por la naturaleza anfifílica de la molécula surfactante, la cual posee una parte apolar y otra polar, siendo la primera más afín a líquidos apolares como los de naturaleza oleosa y la segunda a líquidos polares como los de naturaleza acuosa. Normalmente no se utiliza un solo surfactante sino una mezcla de estos para la formación y estabilización de las nanoemulsiones.

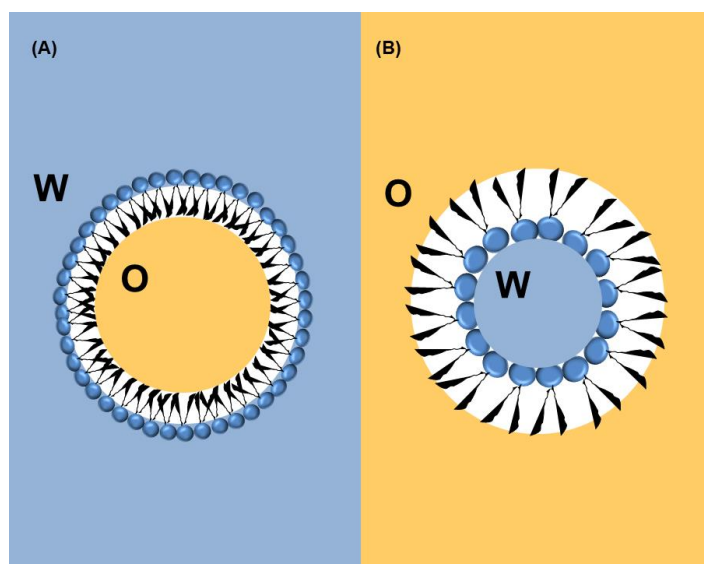


Figura 10. Estructura de una nanoemulsión O/W (A); y estructura de una nanoemulsión W/O (B).

El tipo de nanoemulsión va a estar condicionado por las propiedades hidrófilas e hidrófobas del surfactante, las cuales, de forma empírica pueden ser cuantificadas mediante el valor del balance hidrófilo-lipófilo (HLB, del inglés *Hidrofílic Lipofílic Balance*). Aunque el valor de HLB puede variar en función de ciertos factores en la disolución como puedan ser: presencia de electrolitos, temperatura, tipo de aceite debido a que modifican la geometría de la monocapa. El valor de HLB varía desde el 1 hasta el 20 (Griffin, 1949). El HLB de un surfactante está relacionado con su solubilidad. Así, un surfactante que tiene un bajo HLB tenderá a ser más liposoluble, y uno que tenga un alto HLB tenderá a ser hidrosoluble, aunque dos surfactantes pueden tener el mismo HLB y, sin embargo, exhibir distintas características de solubilidad. En este sentido, **la regla de Bancroft** establece que la fase continua de una emulsión será aquel líquido en el que el surfactante tenga mayor solubilidad (Bancroft, 1913). Si bien, en la actualidad se asume que el comportamiento del surfactante está relacionado con la curvatura de la monocapa que éste forma en la interfase de ambos líquidos.

I.6.1.1. Tipos de Surfactantes

Los surfactantes o también denominados tensoactivos van a estabilizar la emulsión por disminución de la tensión interfacial entre las fases oleosa y acuosa a través de la formación de una monocapa flexible. Igualmente, el surfactante puede estabilizar la emulsión aumentando la viscosidad de una de las fases, o bien, a través de ambos mecanismos, en función de su estructura. De ahí que este sea el principal criterio para su clasificación.

Surfactantes aniónicos

Son aquellos que en su estructura química tienen grupos funcionales que en solución producen iones de carga negativa, que van a contribuir a la estabilidad interfase del sistema, como por ejemplo grupos sulfato, sulfonato, fosfato, carboxilato, etc. Otros surfactantes aniónicos bastante usados son los detergentes sintéticos (sulfonato de alquilbenzeno), jabones (carboxilatos), humectantes (sulfosuccinato), etc.

Surfactantes catiónicos

Son aquellos que en su estructura química tienen grupos funcionales que en solución producen iones de carga positiva, como por ejemplo grupos amino. Los compuestos de amonio cuaternario no son sensibles al pH, sin embargo, las aminas se convierten en no iónicas a valores de pH altos.

Surfactantes anfotéricos

Esta clase de surfactantes contienen en su estructura química grupos funcionales que en solución generan iones positivos y negativos, de modo que la carga neta es cero en su punto isoeléctrico, porque la carga es dependiente del pH del medio. Como principales ejemplos de surfactantes

anfotéricos se pueden citar las betainas, sulfobetainas, así como, sustancias de carácter biológico como fosfolípidos y aminoácidos.

Surfactantes no iónicos

Son aquellos que poseen en su estructura grupos funcionales que en solución no generan iones, estos grupos funcionales son polares altamente hidrófilos como el polietilenglicol, alcoholes grasos, ésteres de sorbitano (Spans®), y sus derivados etoxilados (Tweens®). Al poseer una alta biocompatibilidad son los más utilizados en la industria farmacéutica y cosmética.

Otros

Existen otros tipos de surfactantes no englobados en las anteriores categorías como pueden ser los surfactantes poliméricos, los cuales, derivan del “injerto” de estructuras hidrófilas y lipófilas sobre una macromolécula.

Otro tipo de surfactantes son los denominados siliconados, los cuales, se obtienen por la introducción de una cadena de silicona en lugar de la cadena hidrocarbonada a la cabeza polar del surfactante. En este sentido, si lo que se introduce son grupos fluoruro en la cadena hidrogenada del surfactante da lugar a los denominados surfactantes fluorados.

I.6.1.2. Fase Oleosa

Los componentes de la fase oleosa de la nanoemulsión son de suma importancia por su capacidad de solubilizar principios activos lipofílicos. El componente oleoso influye sobre la curvatura por su capacidad de insertarse y por tanto solubilizar la región no polar de la monocapa del surfactante. Aquellas sustancias oleosas de cadena corta se insertan en

mayor medida en la región apolar del surfactante que las de cadena larga, lo cual resulta en un incremento de la solubilidad y por tanto un menor HLB.

Se han utilizado una gran gama de aceites en la elaboración de nanoemulsiones, desde triglicéridos de cadena media y larga cadena con diferentes grados de saturación hasta aceites comestibles y aceites vegetales hidrolizados. Como principales ejemplos de aceites o lípidos utilizados en la elaboración de nanoemulsiones se pueden enumerar los siguientes:

- Aceite de oliva
- Aceite de ricino hidrogenado
- Aceite de maiz
- Aceite de girasol
- Aceite de citronella
- Aceite de eucalipto
- Aceite de clavo
- Aceite de salvado de arroz
- Aceite de jazmín
- Aceite de rosas
- Miglyol 812[®] (aceite neutro de origen vegetal)
- Labrafac lipophile[®] (triglicéridos de caprílico/cáprico)
- Isopropil miristato
- Ácido oléico
- Sefsol 218[®] (éster monocaprílico propilenglicol)
- Sefsol-228[®] (éster dicaprílico propilenglicol)
- Homotex PT[®] (éster monocaprílico glicerol)
- Triacetin (Triacetato de glicerol)
- Capryol 90[®] (monocaprilato de propilenglicol)
- Lauroglycol 90[®] (glicéridos poliglicosilados)

- Captex 355[®] (C8/C10 triglicéridos)
- Capmul MCM[®] (C8/C10 mono-diglicéridos)

I.6.1.3. Métodos de Elaboración de Nanoemulsiones

En la elaboración de nanoemulsiones la construcción de un diagrama de fases permite determinar mediante un mapeo la zona de mayor emulsificación de la mezcla de componentes. Este diagrama de fases consiste en un diagrama pseudoternario en forma de triángulo equilátero (triángulo de Gibbs), en el que cada lado representa la concentración (porcentajes de 0 hasta 100) de cada fase de la nanoemulsión a una temperatura y presión atmosférica determinada, de forma que cada vértice del triángulo representa el 100% (Figura 11). Un punto cualquiera D en el interior del triángulo representa un sistema ternario, y la prolongación de las perpendiculares desde este punto hacia los lados del triángulo corresponderán a la composición de cada componente cuyo vértice se encuentra en el lado opuesto.

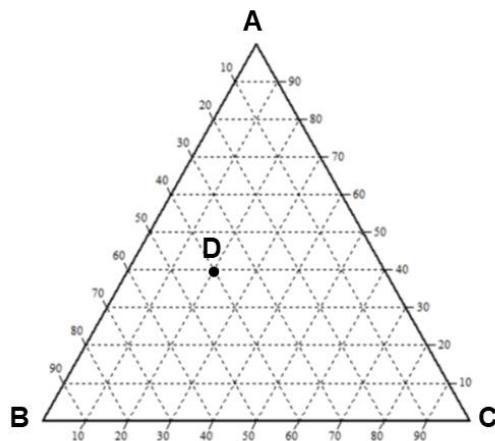


Figura 11. Representación de un sistema ternario en un diagrama triangular.

Los métodos empleados para la elaboración de nanoemulsiones suelen ser clasificados en función de la energía que es necesaria aplicar en su formación, así podremos distinguir entre métodos de alta energía y métodos de baja energía.

Métodos de alta energía

Para la formación de la nanoemulsión se utilizan métodos que rompen las gotículas para dar lugar a otras más pequeñas, de forma que, según el aparato utilizado, el tiempo al que se somete, la temperatura y la composición de la nanoemulsión (Rao y McClements 2011) se obtendrán un tamaño de gota. Entre estos, se pueden citar los baños de ultrasonidos, que se basan en el principio de que cuando la emulsión grosera se somete a un campo de ultrasonidos y la presión externa aumenta, el umbral de cavitación también aumenta hasta formar gotas de tamaño nanométrico (Cerpňjak y cols., 2013). Otros instrumentos de alta energía son los homogeneizadores de alta presión, en los cuales, la emulsión se hace circular a través de un pequeño orificio a altas presiones y alta temperatura reduciendo así el tamaño de gota. La microfluidización es otro tipo de técnica también basada en la aplicación de altas presiones para la obtención de nanoemulsiones con tamaños de gota muy pequeños. En este caso en lugar de un pequeño orificio el fluido es lanzado a alta presión en una cámara de interacción donde existen dos canales de fluido que chocan entre sí como se muestra en la Figura 12.

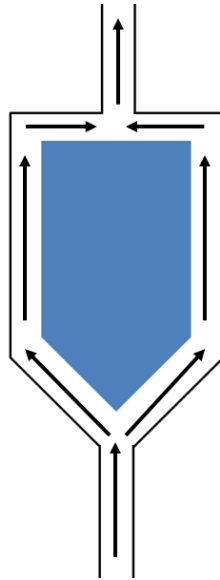


Figura 12. Cámara de interacción de un microfluidizador.

Métodos de baja energía

Debido a la alta cantidad de energía utilizada en los anteriores métodos, estos pueden dañar las propiedades del principio activo, como por ejemplo en aquellos sensibles a la temperatura. Por tal motivo, los métodos de obtención de nanoemulsiones de baja energía han suscitado un gran interés y se basan en las transiciones de fase que tienen lugar durante el proceso de emulsificación mediante la modulación de los parámetros que afectan al balance hidrófilo-lipófilo de los ingredientes como pueden ser la temperatura o la composición del sistema (Izquierdo y cols., 2005).

Entre estos métodos se puede citar el de inversión de fase por temperatura, en el que se modifica la temperatura a la cual tiene lugar el fenómeno de inversión de fases mediante ciclos de calentamiento y enfriamiento, ya que los surfactantes utilizados en la composición son

sensibles a la temperatura, se consigue así la rotura del sistema emulsionado, y posterior formación de gotas más pequeñas.

Igualmente, dentro de estos métodos y sobre la misma base científica que el anterior, también se utiliza el método de inversión de fase por composición en la emulsión a temperatura constante. En este método lo que se realiza es la incorporación de una fase en cantidad tal, que provoque la inversión de fases lo que lleva aparejado la formación de nuevas gotas de signo contrario.

Existe otro método de baja energía por desplazamiento del solvente, en el cual el principio activo es incorporado con un solvente orgánico en la fase acuosa con el surfactante adecuado, procediéndose posteriormente a la evaporación del solvente orgánico, bien por evaporación a temperatura ambiente, por calentamiento a vacío para formar la nanoemulsión (McClements 2013).

I.6.1.4. Estabilidad de Nanoemulsiones

La estabilidad cinética de las nanoemulsiones va a depender de una serie de fenómenos o interacciones entre las gotas. Así, van a tener lugar una serie de interacciones, tanto de carácter atractivo generadas por las fuerzas de Van der Waals que, además son de largo alcance, y una serie de repulsiones electrostáticas debido a la carga de superficie de las gotas. De esta forma la teoría de DLVO, desarrollada durante casi 60 años por Derjaguin y Landau, en la Unión Soviética y por Verwey y Overbeek en Holanda, de forma independiente, establece que la magnitud de fuerzas atractivas en contraposición de las fuerzas repulsivas determinará la estabilidad cinética. Pero, no solamente fuerzas de Van der Waals y electrostáticas pueden tener lugar, sino que otro tipo de interacciones entran en juego, éstas se tratan de interacciones estéricas, y aparecen en el la

interfase de la nanoemulsión como consecuencia de la existencia de largas cadenas de los surfactantes (parte apolar del surfactante). En la cercanía de dos gotas estas cadenas hidrofóbicas se superponen dando lugar a una restricción de volumen lo que minimiza las interacciones atractivas

Por otra parte, dentro de los fenómenos que condicionarán la estabilidad del sistema son factores a tener muy en cuenta tanto la distribución de tamaño de gota, como la solubilidad de las gotas dispersas y las diferencias de densidad con el medio, ya que también son condicionantes de dicha estabilidad.

Todos estos fenómenos pueden dar lugar a una serie de procesos de desestabilización de las nanoemulsiones que se detallan a continuación y que de forma esquemática se representan en la Figura 13. Dichos procesos de desestabilización no son simples y no ocurren de forma aislada sino que en los mismos intervienen diversas fuerzas, y pueden ocurrir de forma simultánea, lo que puede resultar en una separación de las fases (Tadros, 2009).

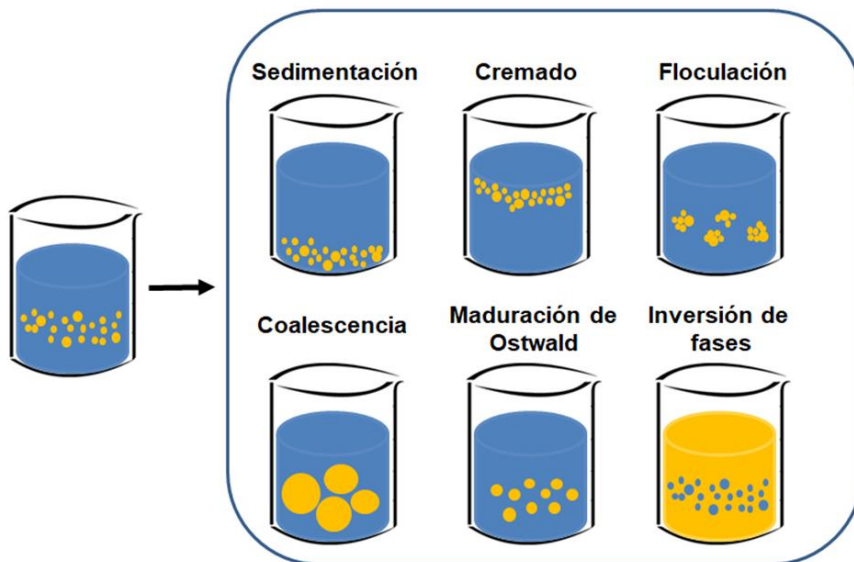


Figura 13. Representación esquemática de los mecanismos de desestabilización de nanoemulsiones.

Sedimentación y cremado

Este proceso es resultante de las diferencias de densidad entre las fases de la nanoemulsión de forma que se crean gradientes de densidad, que por acción de las fuerzas gravitacionales o una fuerza centrífuga son capaces de vencer al movimiento natural de las gotas derivado de la agitación térmica (movimiento browniano), por lo que si la densidad de la fase continua es inferior a la de la fase dispersa, normalmente en nanoemulsiones O/W se produce un cremado, y a *sensu* contrario, en nanoemulsiones W/O una sedimentación.

Floculación

El proceso de floculación se produce cuando se produce una agregación de las gotas sin sufrir cambio en la distribución del tamaño de gota formando flóculos. Se produce como un resultado de una preponderancia de las fuerzas atractivas (fuerzas de Van der Waals) sobre las fuerzas repulsivas. Tras la formación de los flóculos es más probable la aparición de cremados o sedimentación.

Coalescencia

Este proceso consiste en la fusión irreversible de las gotas de la nanoemulsión en otras de mayor tamaño. Se suele producir tras la floculación puesto que las gotas están en contacto unas con otras, reduciendo así la superficie de exposición a la fase continua. Por tanto, estas gotas de mayor tamaño son más proclives a la sedimentación o el cremado, llegando en el peor de los casos a una verdadera separación de fases.

Maduración de Ostwald

La maduración de Ostwald es el proceso resultante de la solubilidad de las fases. Los líquidos inmiscibles a menudo tienen solubilidad mutua por lo que las gotas más pequeñas de la nanoemulsión tendrán mayor solubilidad en la fase continua que las más grandes (debido a los efectos de curvatura) por lo que con el tiempo las más pequeñas migran hacia las más grandes, a través de la fase continua cambiando la distribución del tamaño de gota a valores más grandes (Ostwald 1896).

Inversión de fases

En este proceso tiene lugar un intercambio entre la fase dispersa y la fase continua, así por ejemplo, al cambio de las condiciones (temperatura, concentración de un componente, etc.) una nanoemulsión O/W puede invertir hacia una W/O, y viceversa. Este cambio suele estar precedido por la formación de emulsiones múltiples.

I.6.1.5. Ventajas de las Nanoemulsiones

Las nanoemulsiones ofrecen una serie de ventajas sobre el resto de emulsiones, las cuales se enumeran a continuación (Fernández Campos y cols., 2012):

- Por su reducido tamaño de gota presentan una mayor área de superficie lo que las convierte en un sistema de liberación de fármacos muy eficaz.
- Debido a la gran variabilidad de componentes y el desarrollo de nuevos surfactantes son vehículos ideales para formulaciones tópicas tanto farmacéuticas como cosméticas.

- Pueden incorporar tanto principios activos liposolubles como hidrosolubles, protegiéndolos de la oxidación u otros agentes de degradación.
- En sí mismas, como vehículo de liberación de fármacos pueden comportarse como promotores de la permeación cutánea.

I.6.2. Emulsiones Múltiples

Las emulsiones múltiples, también conocidas como “emulsiones de emulsiones”, son sistemas dispersos complejos de fases inmiscibles donde las gotas de la fase dispersa contienen a su vez otras gotas, y por tanto, el tamaño de gota de la emulsión múltiple es mucho mayor que el de las gotas internas (Florence y Whitehill 1982).

Aunque hayan sido estudiadas en profundidad durante los últimos veinte años, ya en el año 1925, el investigador William Seifriz (1925) observó la formación de gotas de agua en la fase interna oleosa, y gotas de aceite en la fase interna acuosa de emulsiones simples. A estos sistemas los denominó sistemas “bimúltiples”.

Como en el caso de las emulsiones simples, son denominadas en función de la naturaleza de su fase continua y dispersa. Principalmente existen dos tipos: emulsiones múltiples W/O/W (water-in-oil-in-water) y emulsiones múltiples O/W/O (oil-in-water-in-oil). En el primer caso, un sistema de fase más interna acuosa está dispersa en una fase continua oleosa que a su vez se encuentra dispersa en otra fase continua externa de la misma naturaleza que la más interna. Y en el segundo, las fases oleosas interna y externa se encuentran separadas por una fase intermedia acuosa. En la Figura 14 se representan ambos tipos de sistemas dispersos.

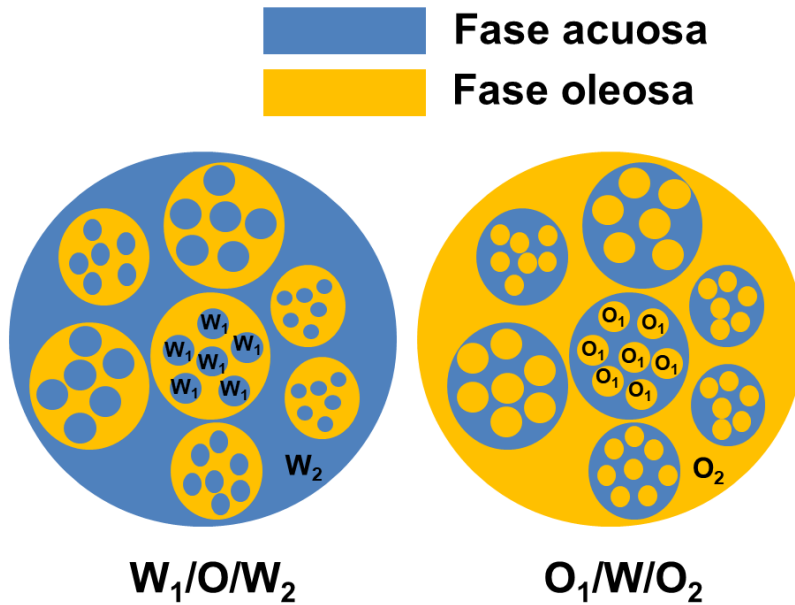


Figura 14. Composición esquemática de emulsiones múltiples.

Si representamos las fases como $W_1/O/W_2$ y $O_1/W/O_2$, la fase W_1 y O_1 serían las fases más internas en cada uno de los tipos, y la W_2 y O_2 las fases más externas (Sheppard y Tcheurekdjian 1977). La fase más interna y la fase más externa serán de la misma naturaleza, acuosa u oleosa según el tipo de emulsión, pero no tienen por qué ser la misma. Se pueden distinguir en ambos tipos dos capas interfaciales la W_1/O y O_1/W en un caso, y la O/W_2 y W/O_2 en el otro. Por ello, normalmente es preciso utilizar dos tipos de emulsificantes o surfactantes para su estabilización, uno liposoluble o lipofílico (con bajo HLB) para las gotas de agua más internas dentro de la fase oleosa y otro hidrosoluble o hidrofílico (con alto HLB) para las gotas oleosas dentro de la fase acuosa más externa, y viceversa. Sin embargo se pueden utilizar mezclas de surfactantes para conseguir un rango de HLB óptimo para la estabilidad de cada sistema en particular. Durante el proceso de emulsificación, las moléculas del surfactante se

trasladan desde el seno de la solución hasta la interfase estabilizando la gota formada.

De acuerdo con Whitehill y Florence (1979), las emulsiones múltiples pueden ser clasificadas en función del tamaño de gota externa y el número de gotas internas en tres tipos, tipo A, tipo B y tipo C. Así las emulsiones múltiples tipo A serían aquellas, en que el tamaño de gota es pequeño (alrededor de $8.6 \mu\text{m}$) y el 82% de las mismas solo contienen una sola gota interna. Las emulsiones múltiples tipo B serían aquellas que, tienen un tamaño de gota medio (aproximado a $19 \mu\text{m}$) conteniendo en su interior pequeñas gotas pero más numerosas que las del tipo anterior. Por último, las emulsiones múltiples tipo C serían aquellas que tienen un tamaño de gota grande, alrededor de $25 \mu\text{m}$ y están compuestas por un gran número de gotas internas (Figura 15).

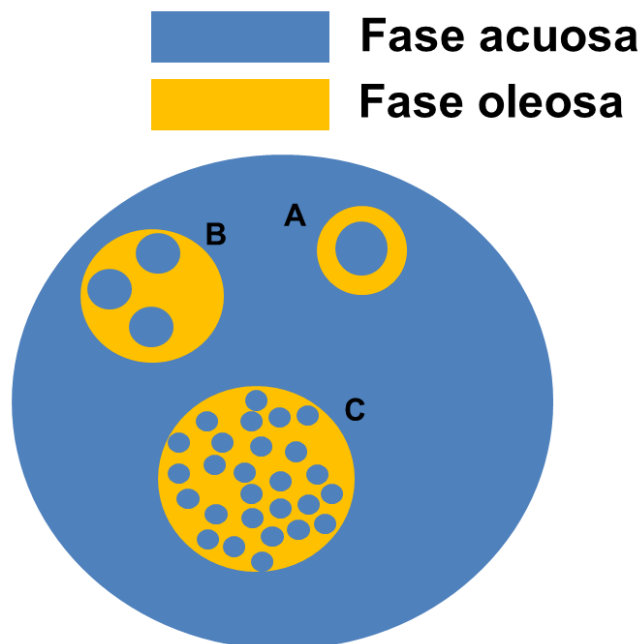


Figura 15. Tipos de emulsione múltiples.

I.6.2.1. Métodos de Elaboración de Emulsiones Múltiples

Existen principalmente dos métodos para la elaboración de emulsiones múltiples: elaboración en un solo paso (inversión de fase) o la elaboración en dos pasos (Benichou y cols., 2004).

En la elaboración de emulsiones múltiples en un solo paso es necesaria la utilización de medios mecánicos para provocar una inversión de fase. Así, la solución acuosa de un tensioactivo hidrófilo es fuertemente agitada con una fase oleosa que contiene una mayor cantidad del tensioactivo lipófilo. En este caso se forma una primera emulsión W/O, parte de la cual, se invierte y forma una emulsión múltiple de tipo W/O/W.

El método de elaboración en dos pasos parte de una emulsión primaria (Figura 16) W/O que después se dispersa en una solución acuosa con un surfactante hidrófilo. Un factor bastante importante que controla la efectividad de este método es la estabilidad interna de la emulsión W/O para que la segunda emulsificación no propicie la ruptura de esta emulsión primaria (Van der Graaf y cols., 2005).

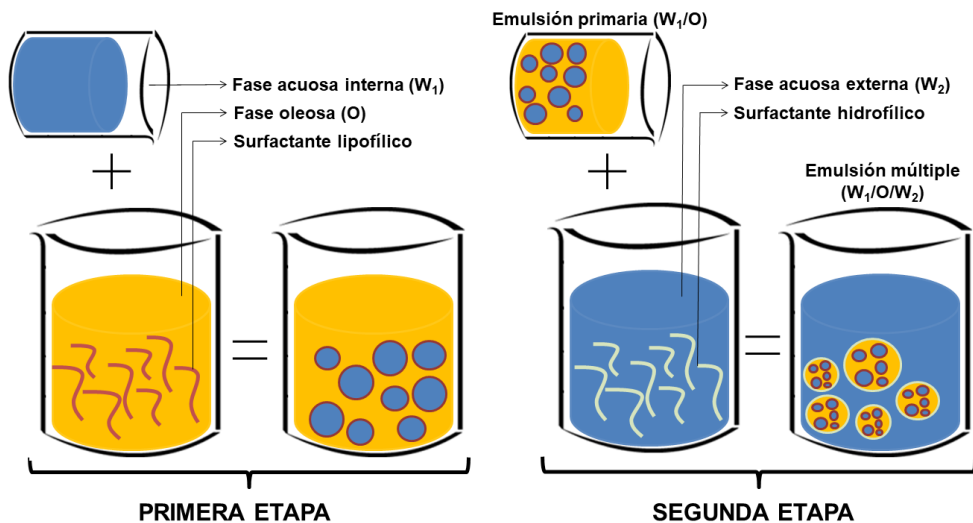


Figura 16. Ilustración esquemática del método de elaboración en dos pasos de un emulsión múltiple $W/O/W$.

En la actualidad existen diversos aparatos para la elaboración de emulsiones múltiples por los cuales se obtienen emulsiones múltiples con estructura, composición y tamaños de partícula homogéneos. Los dispositivos se pueden clasificar en cuatro grupos de acuerdo con Nisisako (2008):

- Membranas porosas de emulsificación.
- Dispositivos de silicona en forma de peine o con orificios.
- Dispositivos microfluídicos bidimensionales.
- Dispositivos coaxiales tridimensionales microcapilares.

I.6.2.2. Estabilidad de las Emulsiones Múltiples

El principal factor limitante de las emulsiones múltiples es su inestabilidad termodinámica y su estructura compleja. Se pueden dar varios fenómenos de inestabilidad en las emulsiones múltiples. De acuerdo con Florence y

Whitehill (1981), los principales fenómenos de desestabilización en un sistema W/O/W serían:

- Coalescencia de gotas oleosas.
- Expulsión individual de gotas acuosas internas.
- Expulsión de todas las gotas internas al mismo tiempo.
- Coalescencia de las gotas internas antes de la expulsión.
- Salida de agua por difusión, a través de la fase oleosa, produciendo una reducción gradual de las gotas internas.

I.6.2.3. Aplicaciones de las Emulsiones Múltiples

Las emulsiones múltiples son utilizadas en distintas áreas industriales como pueden ser la alimentaria, farmacéutica y cosmética. Así en la industria alimentaria se utilizan principalmente para la encapsulación de saborizantes y enmascaramiento de productos desagradables al gusto o al olfato. Ejemplos de estas aplicaciones pueden ser cremas en las que la sal está encapsulada, las mahonesas aromatizadas o bien para la elaboración de alimentos bajos en grasa (Muschiolik 2007).

Debido a la peculiar estructura de las emulsiones múltiples (gotículas dentro de otras gotas más grandes que a su vez están dispersas en otra fase continua), estas representan un reservorio interno que puede ser utilizado como sistema de liberación prolongada del principio activo, o bien protegerlo de una posible degradación. Por esta razón, en la industria farmacéutica, las emulsiones múltiples tienen una gran aplicabilidad. Así emulsiones múltiples se han utilizado en la liberación prolongada de antiinflamatorios, anticancerígenos, principios activos contra la malaria, analgésicos, etc. Igualmente las aplicaciones en el campo de la cosmética

contemplan la protección de sustancias antioxidantes y la liberación prolongada de ciertos compuestos.

En concreto, el uso de emulsiones múltiples para la aplicación tópica está orientado tanto en aplicaciones farmacéuticas como cosméticas. La inclusión de un principio activo en la fase más interna para una liberación prolongada, y a su vez, en las tipo W/O/W, con una fase continua más externa de carácter hidrófilo, ofrece un efecto hidratante. Tras la aplicación de una emulsión múltiple W/O/W sobre la piel o mucosa la fase acuosa externa es absorbida por la piel o mucosa, lo que promueve la hidratación de la misma.

I.6.3. Hidrogeles Termosensibles

Durante las últimas décadas ha adquirido especial importancia la preparación e investigación de los llamados "hidrogeles inteligentes". A pesar de las similitudes con los hidrogeles convencionales en los métodos de preparación y técnicas de caracterización, los hidrogeles inteligentes pueden exhibir cambios inusuales en su comportamiento de hinchamiento, estructura de la red y/o características mecánicas, en respuesta a diversos estímulos ambientales, físicos o químicos.

Los estímulos físicos incluyen temperatura, solventes, luz, presión, campos sonoros, eléctricos y magnéticos. Mientras que los estímulos químicos o bioquímicos incluyen pH, iones, enzimas, y eventos específicos de reconocimiento molecular.

Estos cambios desaparecen al retirar los estímulos ambientales que los produjeron y, en consecuencia, los hidrogeles recuperan su estado original de forma reversible.

Sobre la base de esas especiales propiedades, los hidrogeles estímulo-sensibles se han utilizado en diversas aplicaciones como vehículos ideales para el desarrollo de sistemas de administración de fármacos autorregulados. Debido a sus propiedades físicoquímicas los hidrogeles constituyen uno de los vehículos más eficaces y seguros del arsenal terapéutico. Sin embargo, presentan serias limitaciones a la hora de cargar fármacos hidrófobos. Con objeto de solventar este inconveniente las últimas investigaciones se centran en el estudio de redes compuestas de pequeñas micelas con un tamaño inferior a 200 nm. Estos hidrogeles con matriz micelar son capaces de vehiculizar tanto drogas hidrófilas como hidrófobas.

Parte de la investigación realizada en esta tesis doctoral se ha centrado en el diseño de un hidrogel para fármacos hidrófobos (retinol palmitato, colecalciferol y alfa tocoferol acetato), en concreto un gel termosensible de estructura micelar, a base de polímeros sintéticos tipo poloxámero. Por ello el siguiente apartado tratará de profundizar en su estudio.

I.6.3.1. Tipos de Hidrogeles Termosensibles

Los hidrogeles termosensibles exhiben una transición de fase dependiente de la temperatura. Este tipo de hidrogeles se pueden clasificar en dos tipos (Qiu y Park 2012).

Hidrogeles termosensibles positivos

Aquellos que por encima de una temperatura se encuentran en el estado sol y su gelificación se producen en el proceso de enfriamiento, cuando se alcanza la denominada temperatura crítica superior de disolución (UCST, del inglés *Upper Critical Solution Temperature*).

Hidrogeles termosensibles negativos

Aquellos que por debajo de una temperatura se encuentran en el estado sol y su gelificación se producen en el proceso de calentamiento, cuando se alcanza la denominada temperatura crítica inferior de disolución (LCST, del inglés *Lower Critical Solution Temperature*). Este fenómeno también se conoce como gelificación térmica inversa (RTG, del inglés *Reverse Thermal Gelation*).

Para la preparación de hidrogeles termosensibles se han utilizado diferentes materiales poliméricos que contienen en su estructura unidades termosensibles. La característica común en todos ellos es la presencia de grupos hidrófobos, como los grupos metilo, etilo y propilo. La mayoría de los polímeros formadores de hidrogeles termosensibles son copolímeros compuestos por bloques A y bloques B dispuestos como ABA o BAB. Los bloques A proporcionan biocompatibilidad, baja inmunogenicidad y solubilidad en agua, mientras que los bloques B (Figura 17), como poli(óxido de propileno) (PPO), poli(D, L-lactida) (PLA), poli(D, L-lactida-co-glicolida) (PLGA), poli (ϵ -caprolactona) (PCL), poli[(R) -3-hidroxitirato] (PHB), polifosfacenos, e incluso polipéptidos que aportan hidrofobicidad y permiten la carga de fármacos hidrofóbicos, además de conferir propiedades de micelización y gelificación (McKenzie y cols., 2015).

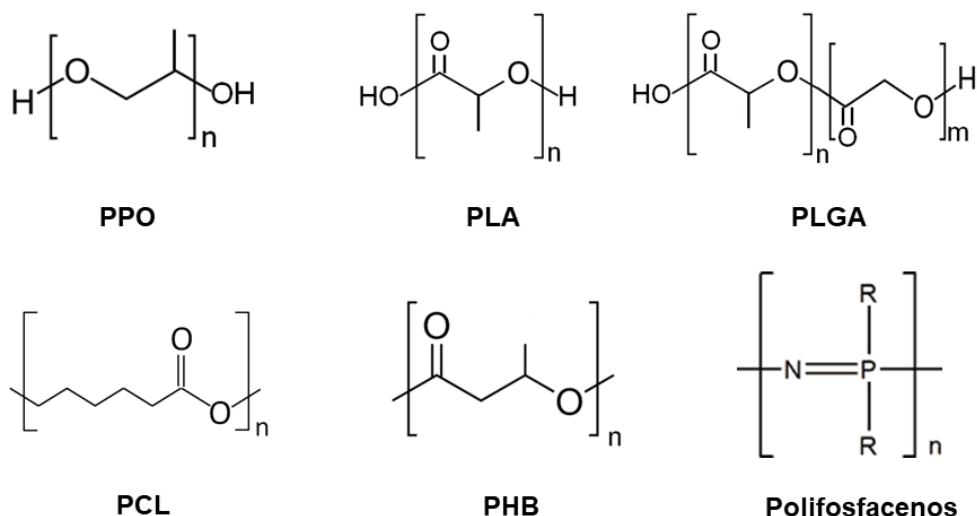


Figura 17. Bloques de polímero hidrofóbico formadores de geles termosensibles en copolímeros tribloque. PPO: poli(óxido de propileno), PLA: poli(D, L-láctido), PLGA: poli(D, L-láctido-co-glicólido), PCL: poli(ϵ -caprolactona), PHB: poli[(R) -3-hidroxibutirato] y polifosfacenos.

Entre los polímeros más comunes se encuentran los copolímeros en bloques anfifílicos de poli(óxido de etileno) (PEO) y poli(óxido de propileno) (PPO), ampliamente utilizados debido a que su LCST se encuentra en el rango de 25-32 °C, próximo a la temperatura corporal. Comercialmente se encuentran con el nombre de Pluronic[®] (poloxámeros) y Tetronics[®].

I.6.3.2. Poloxámeros

Los poloxámeros son copolímeros lineales tribloque no iónicos, solubles en agua. Se disponen como A-B-A o B-A-B, donde A es un bloque de poli(óxido de etileno) y B un bloque de poli(óxido de propileno) (Figura 18). Pueden presentar diferentes formas físicas, cuando se dispersan en agua, y propiedades, en función de su masa molecular relativa, comprendida entre 1.000 y 15.000, y relaciones PPO/PEO, con un contenido de bloques de

poli(óxido de etileno) entre el 10 y el 80 por ciento en masa. Esta proporción también determina la solubilidad y el balance hidrofílico-lipofílico del copolímero (Pasquali y cols., 2005). Las soluciones acuosas de poloxámeros son estables en presencia de ácidos, álcalis e iones metálicos.

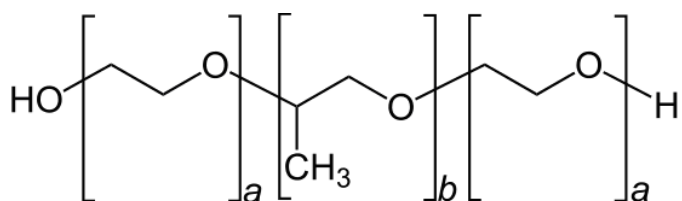


Figura 18. Estructura general de los poloxámeros

La Figura 19 muestra los diferentes tipos de poloxámeros (y su correspondencia comercial pluronic[®]), los cuales, se designan con letras y números (Loh 2002). La letra “L” hace referencia al estado líquido, “P” se utiliza para las pastas y “F” para los sólidos. El primer número o dos primeros números representan la masa molecular de la cadena hidrofoba de PPO, y van desde el número 3 para el copolímero con la menor masa molecular hasta el número 12 para el de mayor masa molecular. Multiplicado/s por 300 es aproximadamente igual a la masa molecular relativa promedio de la parte lipofílica. El último número, multiplicado por 10, indica el porcentaje de la parte hidrofílica (PEO), y va desde 1 hasta 8. Los copolímeros de una misma columna presentan el mismo porcentaje de PEO, mientras que los copolímeros de una misma fila presentan un bloque de PPO del mismo peso molecular.

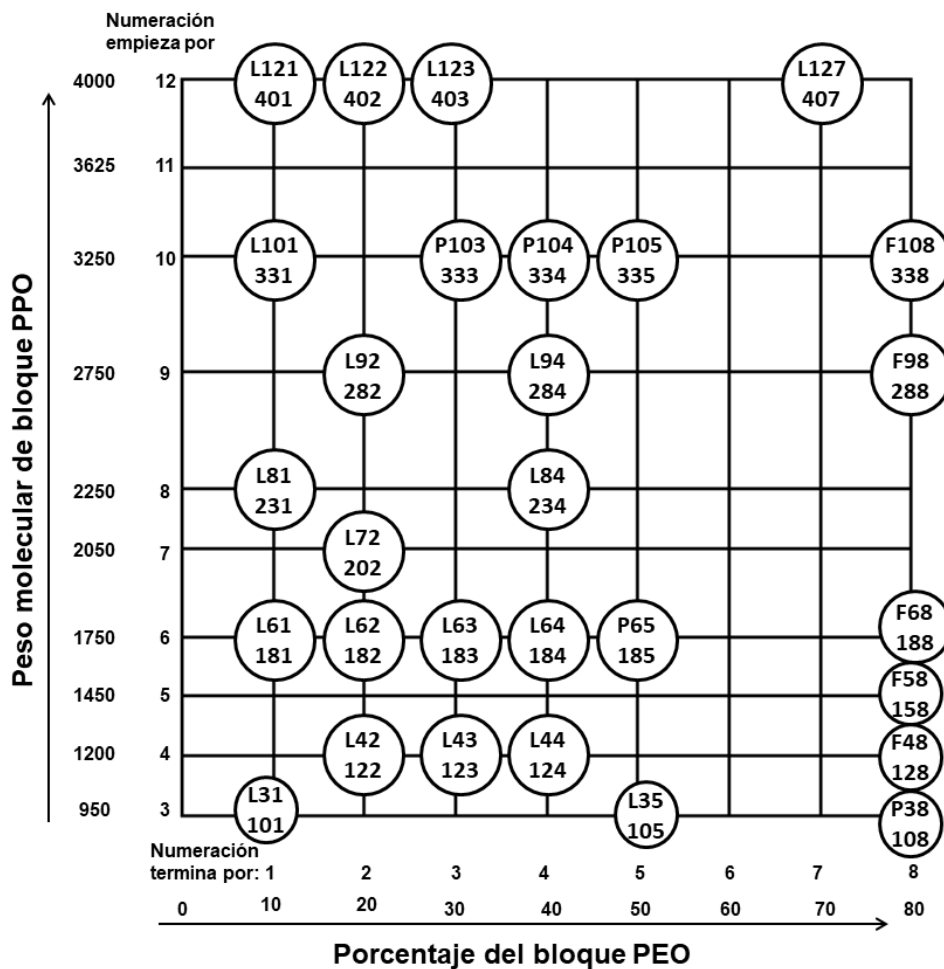


Figura 19. Nomenclatura de los Pluronic® (Loh 2002).

Los poloxámeros tienen la capacidad de auto-ensamblarse a partir de moléculas de copolímero tribloque transformándose en micelas. Estas micelas presentan un núcleo formado por los bloques poco solubles en el disolvente rodeado de un borde flexible constituido por los bloques solubles. Suelen ser esféricas y con una estrecha distribución de tamaños.

El proceso de micelización es un proceso espontáneo que comienza cuando la concentración de copolímero en solución alcanza la concentración micelar crítica (CMC, del inglés *Critical Micellar Concentration*) a una temperatura fija, o bien, a la inversa, es decir, al aumentar la temperatura hasta la temperatura micelar crítica (CMT, del inglés *Critical Micellar Temperature*) a una concentración de copolímero fija (Linse 1993). Por debajo de la CMC, que se define como la concentración mínima de material necesaria para dar lugar a micelas termodinámicamente estables, los copolímeros uniméricos se dispersan en agua. Tras superar la CMC, se produce la micelización. Además de la concentración micelar crítica, las dispersiones de los copolímeros en bloque se caracterizan por la CMT, temperatura específica a la cual, se forman las micelas a partir de una solución del copolímero a una concentración dada.

A temperaturas superiores a la CMT o bien por encima de la concentración crítica de gelificación (CGC, del inglés *Critical Gelation Concentration*) se obtienen agregados de micelas que dan lugar a un gel. Este gel es el resultado de una transición de fase desde el estado sol o solución micelar, a un estado cúbico micelar sólido. La transición de fase tiene lugar a medida que la fracción de volumen es ocupada por micelas hidratadas e interacciones y redes micelares (Bodratti y Paschalis 2018).

En general, tanto la micelización como la gelificación dependen de diferentes factores, especialmente la temperatura, la concentración de polímero y la longitud de los bloques (Vadnere y cols., 1984). Así los poloxámeros con bloques de PPO largos requieren concentraciones de copolímero de bloque o temperaturas más bajas para que ocurra la micelización. Para poloxámeros con la misma relación PPO/PEO, tanto la CMC como la CMT disminuyen a medida que aumenta el peso molecular total (Alexandridis y cols., 1994).

La transición sol-gel se ha correlacionado con cambios intrínsecos en las propiedades micelares, a la variación entrópica de las moléculas de agua más cercanas a los bloques PPO, y/o la formación de una estructura tridimensional físicamente reticulada capaz de contener agua en su red (Brown y cols., 1991). Este fenómeno de termogelificación se ha observado en varios poloxámeros, incluyendo el poloxamer 407 (PEO100/PPO65/PEO100), con una masa molar media de 13.000 y un contenido de aproximadamente 70% de óxido de etileno, lo que le proporciona elevada hidrofiliidad.

Las micelas de poloxamer 407 presentan una corona exterior muy extendida y bien hidratada, de cadenas de PEO, lo que conlleva una rápida y compacta organización de estas por encima del CMT (Figura 20). En concreto, a bajas temperaturas, en soluciones acuosas, dominan los enlaces de hidrógeno entre los segmentos hidrófilos de la cadena de polímero y las moléculas de agua, lo que lleva a una mejor disolución en el agua. En esta fase, las moléculas de poloxamer 407 se encuentran rodeadas por una capa de hidratación. Sin embargo, cuando se eleva la temperatura, el enlace de hidrógeno se vuelve más débil y las cadenas hidrofílicas del copolímero se desolvatan como resultado de la rotura de los enlaces de hidrógeno que se habían establecido entre el solvente y estas cadenas. Este fenómeno favorece las interacciones hidrófobas entre los dominios de polioxipropileno y conduce a la formación del gel. En definitiva, la deshidratación del polímero conduce a un aumento de la fricción y el enredo de la cadena, lo que produce una asociación hidrofóbica (Raymond 1984).

El gel formado es de naturaleza micelar. Una fase micelar líquida es estable a bajas temperaturas, pero se transforma en una estructura cúbica al alcanzar la CMT. A medida que aumenta la temperatura, se forman cilindros hasta formar una fase de hexagonal (Figura 20).

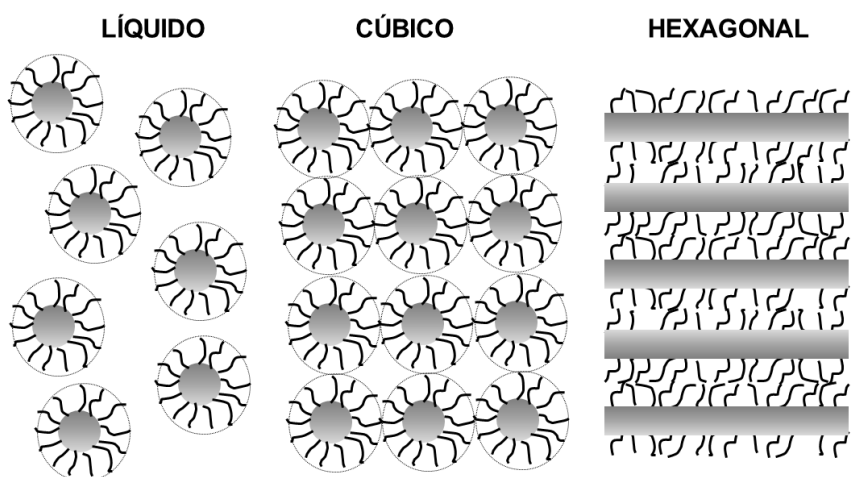


Figura 20. Fases micelares del poloxamer 407 con el incremento de la temperatura.

Otra de las características del poloxamer 407 es su capacidad para crear geles termorreversibles, es decir, tiene capacidad de crear, romper y modificar los enlaces responsables de mantener la red micelar unida. Los geles que no tienen esta capacidad porque se mantienen unidos por enlaces covalentes se denominan geles permanentes (Escobar-Chávez, 2006). Esta característica ha permitido que sea utilizado como vehículo en la mayoría de las vías de administración incluyendo la vía oral, tópica, intranasal, vaginal, rectal, ocular y parenteral.

I.7. TERAPIAS AVANZADAS DEL DAÑO CUTÁNEO RADIO-INDUCIDO

El término terapias avanzadas incluye varias estrategias terapéuticas, basadas en algunos de los mayores avances de la investigación biomédica como son la terapia celular, terapia génica e ingeniería tisular (Pellegrini y cols., 2016).

Terapia génica

La terapia génica puede definirse como la transferencia y la expresión de genes terapéuticos en células diana específicas, para el tratamiento de una enfermedad genética o adquirida, mediante la sustitución del gen deficiente, la corrección del defecto genético o introduciendo un nuevo gen (Mohr y Geissler 2002).

Los protocolos de transferencia de genes han sido aprobados para uso humano en enfermedades hereditarias, cánceres y trastornos adquiridos. En 1990, se inició el primer ensayo clínico con éxito para la deficiencia de adenosina desaminasa. Aunque los resultados preliminares de estos ensayos son un tanto decepcionantes, el número de protocolos clínicos iniciados en todo el mundo ha aumentado exponencialmente (Athanasopoulos y cols., 2017).

En el diseño de una terapia génica intervienen tres elementos (Muñoz Ruiz y Regueiro 2012): las células diana, el transgen terapéutico y el vector de transferencia génica, siendo este último fundamental. Para que la terapia génica se convierta en una posible opción de tratamiento será un requisito central que la transferencia de genes sea segura y terapéuticamente eficiente, para lo cual deberá expresar el gen deseado durante un período

prolongado de tiempo, en una población suficientemente grande de células para producir un efecto biológico.

Para ello, se han desarrollado una variedad de sistemas de vectores virales y no virales. Los vectores no-virales (ej. liposomas, polimeros, ADN desnudo) a pesar de su baja inmunogenicidad y su gran capacidad de tamaño para el ADN terapéutico presentan menor eficacia que los vectores virales e inestabilidad del transgen. En contraste, los vectores virales son estructuras altamente desarrolladas para la transferencia de ácidos nucleicos y, por tanto, los más utilizados (adenovirus, retrovirus, lentivirus, virus adenoasociado). Los retrovirus, virus adenoasociados y lentivirus son adecuados para los tratamientos basados en la expresión permanente de genes terapéuticos, como la corrección de deficiencias enzimáticas o la manipulación de células madre hematopoyéticas. Los vectores adenovirales dan lugar a una expresión génica altamente eficiente, pero transitoria y, por lo tanto, son especialmente útiles para el tratamiento de tumores malignos.

Terapia celular

La terapia celular tiene por objetivo reparar, reemplazar o recuperar la función biológica de un tejido u órgano dañado, utilizando para ello células vivas (células diferenciadas, células madre, concentrados celulares, etc.) (Belardelli y cols., 2011).

Actualmente, las principales patologías en las cuales se presenta la terapia celular como una alternativa terapéutica fundamental son (Gálvez-Martín y cols., 2018):

- Infecciones provocadas por bacterias y hongos.
- Desórdenes mentales y de comportamiento.
- Anemia y linfopenia.
- Cáncer y necrosis tisular.

- Trastornos digestivos.
- Complicaciones antes o durante el parto.
- Patologías endocrinas.
- Patologías cardiovasculares.
- Inmunodeficiencias.
- Enfermedades osteoarticulares.
- Enfermedades del sistema nervioso.
- Trastornos nutricionales y del metabolismo.
- Patologías parasitarias y procesos virales.
- Patologías del sistema respiratorio.
- Patologías del sistema urinario y excretor.
- Cortes y heridas superficiales.

La mayoría de ellas son enfermedades degenerativas, las cuales constituyen uno de los principales problemas sanitarios de los países desarrollados. Estas enfermedades se deben, por lo general, a defectos génicos, lesiones traumáticas, estilo de vida o envejecimiento de la población.

Es común en este tipo de enfermedades, la alteración de tejidos y/o la desaparición de ciertos tipos celulares, provocando una disfunción en distintos órganos. Los fármacos utilizados en el tratamiento de la mayoría de estas enfermedades alivian únicamente los síntomas, en vez de reparar el daño tisular. El objetivo de la terapia celular es, por tanto, restaurar esos componentes dañados o ausentes para así intentar recuperar la función del órgano en este tipo de enfermedades.

Ingeniería tisular

La ingeniería tisular surge como una alternativa potencial frente a la baja disponibilidad que existe y ha existido de tejidos y órganos naturales,

sintéticos o semi-sintéticos. Se define como la aplicación de los principios y métodos de la ingeniería hacia el desarrollo de sustitutos biológicos, utilizando células viables o no viables, combinadas con biomateriales y otros factores para reparar, mejorar y/o regenerar la función tisular.

La ingeniería tisular combina el uso de células madre, células especializadas y sus componentes extracelulares, además de factores que aceleren la proliferación o la diferenciación celular, sobre una matriz o andamio, con el objetivo de reproducir una estructura tridimensional funcional y similar al tejido u órgano dañado. Por tanto, la ingeniería tisular implica cuatro pasos:

- Aislamiento de células mediante biopsia al paciente.
- Expansión de células *in vitro*.
- Siembra de las células en un *scaffold* tridimensional que imite la matriz extracelular natural (ECM) de los tejidos diana.
- Transplante del andamio cargado de células al paciente, mediante su administración parenteral, tópica, o mediante cirugía.

El desarrollo artificial de tejidos y órganos también ofrece la posibilidad de realizar en ellos estudios *in vitro* con el objetivo de analizar el desarrollo de una enfermedad, de una lesión tisular y de la eficacia de un fármaco (*screening*).

En la actualidad las principales líneas de investigación están focalizadas en las siguientes áreas clínicas: reparación de cartílago y hueso, ligamentos y tendones, piel, enfermedades vasculares, enfermedades hepáticas, oftalmología, diabetes, enfermedades neurológicas (enfermedad de Parkinson, Huntington, y otras), etc. (Stolz y cols., 2006).

I.7.1. Medicamentos Basados en Células, Genes y Tejidos

Los medicamentos de terapia avanzada son medicamentos de uso humano basados en genes (terapia génica), células (terapia celular) o tejidos (ingeniería tisular). Constituyen nuevas estrategias terapéuticas y su desarrollo contribuirá a ofrecer oportunidades para algunas enfermedades que hasta el momento carecen de tratamientos eficaces (AEMPS 2018). Incluyen productos de distinto origen:

- Autólogo: donante y receptor tienen el mismo origen (mismo individuo).
- Alogénico: donante y receptor son individuos distintos; el donante es el individuo sano y el receptor es el individuo enfermo.
- Xenogénico: el donante es de origen animal y el receptor es la persona con la patología a tratar.

El uso de medicamentos autólogos evita problemas de rechazo del tratamiento y las reacciones de tipo inmunológico en el receptor, además de reducir los problemas éticos y regulatorios que implicaría el uso de productos alogénicos y/o xenogénicos. No obstante, los medicamentos de origen autólogo presentan la limitación de la escasez de muestras para la obtención de la célula, gen o tejido sano.

Son múltiples los productos biológicos que pueden fabricarse a partir de células, genes y tejidos, pudiéndose considerar medicamento, o no, en base a las características del producto y a la regulación vigente de ámbito europeo y nacional.

Los medicamentos de terapias avanzadas (ATMPs del inglés *Advanced Therapy Medicinal Product*) fueron definidos por la Agencia Europea del

Medicamento (EMA, del inglés *European Medicines Agency*) en el año 2007 en el Reglamento (CE) N° 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de noviembre de 2007 sobre ATMPs, regulando el uso de células, genes y tejidos como medicamentos. La autorización de un ATMP es competencia de la EMA, por procedimiento centralizado. La resolución positiva de esta autorización permite la comercialización del ATMP en todos los estados miembros de la UE. Cada una de las agencias nacionales debe definir para cada ATMP el coste y financiación.

Los medicamentos basados en el uso de células, genes y tejidos se pueden clasificar en base a sus requerimientos legales como: (i) medicamentos de terapias avanzadas (ATMPs); (ii) medicamentos de terapia avanzada de fabricación no industrial; (iii) plasma rico en plaquetas; (iv) medicamentos en situaciones especiales. Aquellos productos celulares que no sean considerados medicamentos serán regulados como trasplante de células y tejidos.

I.7.1.1. Clasificación de los Medicamentos ATMPs

De acuerdo con la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS 2018), los ATMPs se clasifican en cuatro tipos de productos: (i) medicamentos de terapia celular somática, (ii) medicamentos de terapia génica, (iii) productos de ingeniería tisular, y (iv) medicamentos de terapias avanzadas combinados. A continuación se definen los medicamentos de terapia celular somática y los productos de ingeniería tisular por ser los medicamentos más confusos de diferenciar y definir.

La **terapia celular somática** se define como la utilización en seres humanos y animales de células somáticas vivas y/o tejidos, que presentan propiedades profilácticas, de diagnóstico o terapéuticas distintas de sus propiedades biológicas originales. Sin embargo, no todos los productos

celulares se consideran medicamentos. Un medicamento de terapia celular somática (CTMP, del inglés *Somatic Cell Therapy Medicinal Product*) debe cumplir con al menos una de las siguientes condiciones:

- Debe haberse obtenido mediante "manipulación sustancial", es decir, alterándose sus características biológicas, funcionales o propiedades para obtener el efecto terapéutico. Una de las principales manipulaciones llevadas a cabo para obtener un CTMP es la expansión mediante cultivo celular *ex vivo*, ya que altera sustancialmente las características de las células aisladas de un tejido. La EMA ha definido las manipulaciones "no sustanciales" para que no existan dudas. Algunos ejemplos de estas últimas son: centrifugación, moldeo, corte, congelación, trituración, separación, etc.
- Debe notarse un cambio en la función esencial de la célula, es decir, la célula con uso terapéutico está destinada a realizar otra labor distinta a su función biológica inicial.

Uno de los primeros ejemplos de manipulación *in vitro* de células destinadas a trasplantes en reconstrucción de tejidos se realizó con células epidérmicas para el tratamiento de pacientes con quemaduras graves (Gallico y cols., 1984). Por lo tanto, un CTMP se define como aquel medicamento de terapia celular somática para uso en seres humanos de células somáticas vivas, tanto autólogas, como alogénicas o xenogénicas, cuyas características biológicas han sido alteradas sustancialmente como resultado de su manipulación, para obtener un efecto terapéutico, diagnóstico o preventivo por medios metabólicos, farmacológicos e inmunológicos.

Por **producto de ingeniería tisular** se entiende como aquel que contiene o está formado por células o tejidos manipulados por ingeniería, y

del que se alega que tiene propiedades, se emplea o se administra a las personas para regenerar, restaurar o reemplazar un tejido humano. Un producto de ingeniería tisular podrá contener células o tejidos de origen humano, animal, o ambos. Las células o tejidos podrán ser viables o no. Podrá también contener otras sustancias, como productos celulares, biomoléculas, biomateriales, sustancias químicas, soportes o matrices. Quedarán excluidos de la presente definición los productos que contienen o están formados exclusivamente por células y/o tejidos humanos o animales no viables, que no contengan células o tejidos viables y que no ejerzan principalmente una acción farmacológica, inmunológica o metabólica. Las células o tejidos se considerarán manipulados por ingeniería tisular si cumplen al menos una de las condiciones siguientes:

- Las células o tejidos han sido sometidos a manipulación sustancial, de modo que se logren las características biológicas, funciones fisiológicas o propiedades estructurales pertinentes para la regeneración, reparación o sustitución pretendidas. Las manipulaciones enumeradas en particular en el anexo I del Reglamento (CE) nº 1394/2007 no se consideran sustanciales.
- Las células o tejidos no están destinados a emplearse para la misma función o funciones esenciales en el receptor y en el donante.

En general los medicamentos de terapias avanzadas, y en particular los productos de ingeniería tisular, constituyen nuevas estrategias terapéuticas y su desarrollo contribuirá a ofrecer oportunidades para algunas enfermedades que hasta el momento carecen de tratamientos eficaces. Entre ellas la regeneración de tejido dérmico tras quemaduras.

I.7.2. Células Madre

La reposición de células como resultado del envejecimiento, infecciones, sustancias químicas, traumatismos, etc., así como la regeneración de tejidos y órganos, sucede de forma natural y espontánea. Las células encargadas de hacerlo se denominan células madre (SCs, del inglés *Stem Cells*).

Las SCs son células inmaduras e indiferenciadas que tienen la capacidad de dar origen a células maduras y especializadas. Funcionan como un sistema reparador del cuerpo, regulando la homeostasis normal de los tejidos. Por tanto, poseen una doble función: la creación de estructuras orgánicas durante el desarrollo del individuo y la regeneración de tejidos dañados, enfermos o envejecidos (Gálvez-Martín y cols., 2018). Las SCs comparten dos características comunes (Lanza y Atala 2014):

- **Capacidad de auto-renovación:** las SCs tienen capacidad para vivir indefinidamente, mediante divisiones mitóticas simétricas, que originan células hijas, de características similares a la célula progenitora. De esta forma, una SC prolifera para dar lugar a la expansión de un clon. Además, un conjunto limitado de SCs, en el seno de un determinado tejido, puede mantener o incrementar su número según las necesidades homeostáticas cuando tales células se encuentren participando en un proceso de regeneración tisular. Esta capacidad de auto-renovación permite mantener el clon de células durante largos períodos de tiempo, actuando como reservorio ante las distintas necesidades fisiológicas que hagan requerir su activación.
- **Pluripotencia:** las SCs son pluripotentes, es decir, capaces de diferenciarse a múltiples linajes celulares bajo distintos estímulos. Ante necesidades fisiológicas y/o patológicas, la célula madre desencadena

un proceso de división asimétrica, por el que se originan dos células hijas desiguales: una idéntica a la célula madre y la otra continúa diferenciándose hasta convertirse en una célula funcional madura, dando lugar a distintos linajes somáticos: células nerviosas, cardíacas, sanguíneas, etc.

Estas dos capacidades hacen de las SCs un recurso muy importante para la obtención de distintos linajes celulares.

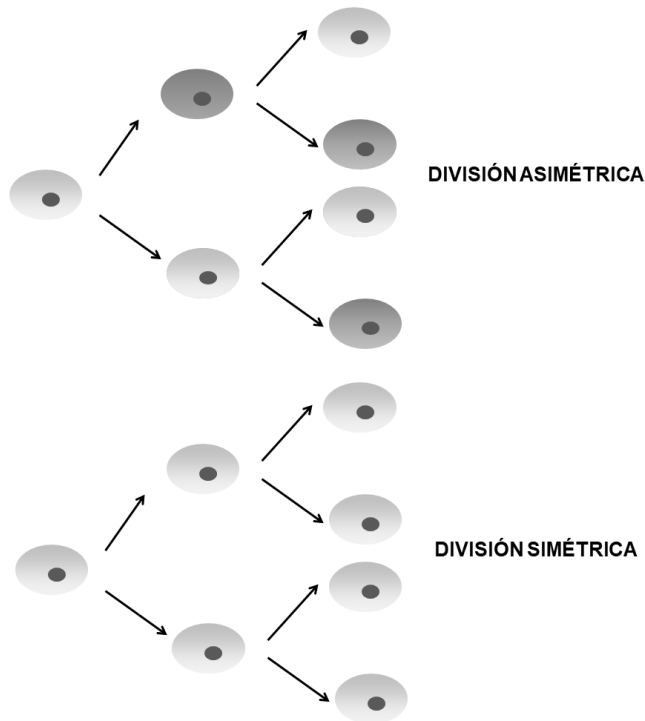


Figura 21. División simétrica y asimétrica de una célula madre.

Además las SCs se caracterizan por ser células, con capacidad de proliferar *ex vivo* e *in vivo* diferenciándose en células especializadas maduras.

I.7.2.1. Clasificación de las Células Madre

Las SCs pueden clasificarse según dos criterios: por su potencialidad y por su origen. De acuerdo a su potencial para producir linajes o al tipo de tejido que originan, las SCs se clasifican en cuatro tipos: totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes (Sell 2004).

Totipotentes

Células madre capaces de diferenciarse hacia cualquier tipo celular, formando un organismo completo, donde se incluyen los componentes embrionarios, como son las tres capas embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo) y los componentes extraembrionarios, como la placenta. Según los especialistas, la SC totipotente por excelencia es el cigoto, formado tras la fecundación. Estas células solo están presentes en el embrión en los primeros estadios de división (hasta la etapa de 8-16 células).

Pluripotentes

Son aquellas células que no pueden formar un organismo completo pero presentan la capacidad de diferenciarse a tejidos de las tres capas embrionarias. Son pluripotentes, las células madre embrionarias aisladas de la masa celular interna (MCI) del blastocito. Se definen por su potencial para generar cuerpos embrioides (es decir, agregados de células no adherentes esferoides) *in vitro*, y teratomas (tumores benignos) *in vivo*.

Una vez que las SCs se asignan a un tejido específico, evolucionan a SCs adultas multipotentes o unipotentes, formando tejidos compuestos por células a un nivel más especializado. Las SCs adultas residen en la mayoría de los órganos y tejidos (incluyendo músculo esquelético, páncreas, corazón y sistema nervioso central), pero principalmente en sitios con rápido

recambio celular como piel, médula ósea, mucosa intestinal e hígado. Residen en nichos con un microambiente específico necesario para su control y regulación.

Multipotentes

Son células que pueden derivar a los distintos tipos celulares de su propia capa o linaje embrionario de origen. La mayoría de las células madre adultas pertenecen a este grupo.

Unipotentes

Son células con un grado de diferenciación muy limitado, capaces de dar lugar únicamente a un tipo celular.

Según su ontogénesis se clasifican en: células madre embrionarias (ESCs del inglés *Embryonic Stem Cells*), células madre adultas (ASCs del inglés *Adult Stem Cells*) y células madre pluripotentes inducidas (iPS del inglés *Induced Pluripotent Stem*).

Desde el punto de vista clínico, ASCs son las más utilizadas por seguridad y eficacia demostrada, además de por su fácil obtención. No obstante presentan múltiples limitaciones aún por resolver tales como: la identificación de las señales moleculares que inician su activación, protocolos de aislamiento y cultivos más sencillos, etc. Se trata de células madre multipotentes y unipotentes, que incluyen una variedad de células indiferenciadas localizadas en tejidos adultos, independientemente de la edad del organismo. Se caracterizan por su alto potencial proliferativo (aunque menor que las ESCs), por su capacidad sustancial de autorrenovarse y por la capacidad de diferenciarse en al menos un tipo de célula madura funcional de los tejidos en los que residen.

I.7.2.2. Células Madre Mesenquimales (MSCs)

Las células madre adultas más utilizadas hoy día, en ensayos clínicos humanos, son las células madre mesenquimales (MSCs). Al igual que las ASCs, en general, tienen menor potencial proliferativo y plasticidad que las ESCs, sin embargo ofrecen numerosas ventajas: facilidad de obtención, gran potencial de expansión y crecimiento *ex vivo*, carencia de problemas éticos para su obtención y escasa tendencia a formar tumores. Las MSCs son células madre multipotentes, derivadas del estroma medular de varios tejidos humanos (Gálvez-Martín y cols., 2016).

El tejido mesenquimal o mesénquima es el tejido del organismo embrionario. Hace referencia a los tejidos de sostén o de relleno que conforman los órganos, a diferencia del parénquima o tejido principal de un órgano. Se divide en dos tipos:

- Tejido **mesenquimal no especializado**: formado en su totalidad por tejido conjuntivo laxo (sostiene órganos y epitelios y posee una gran variedad de fibras proteicas, colágeno y elastina) y tejido conjuntivo denso (posee abundantes fibras de colágeno, es más resistente pero menos flexible, está presente en tendones, ligamentos, en la dermis profunda, en el periostio y en el pericondrio).
- Tejido **mesenquimal especializado**: formado por el tejido adiposo, tejido cartilaginoso, tejido óseo, tejido hematopoyético, sangre y tejido muscular, estriado y liso.

Las MSCs se han aislado a partir de aspirados de médula ósea, tejido adiposo, músculo liso y cardíaco, líquido amniótico, placenta, sangre del cordón umbilical, sangre periférica y pulpa dental.

En la actualidad, la médula ósea, el tejido adiposo y la sangre del cordón umbilical son consideradas como las principales fuentes de obtención de MSCs, siendo las fuentes más fiables para su posterior aplicación clínica. Las MSCs de diferentes tejidos comparten características similares pero difieren significativamente en su proliferación, diferenciación y fenotipo molecular.

Aunque la sangre de cordón umbilical tiene un mayor potencial de expansión, su potencial de diferenciación es menor, al no hacerlo hacia adipocitos (Kern y cols., 2006). Este hecho junto a las limitaciones éticas y su origen alogénico hacen de la médula ósea y del tejido adiposo las fuentes más utilizadas, con las que se puede obtener un número elevado de células en cultivo *ex vivo*. Entre ambas fuentes se aprecian diferencias en inmunofenotipo ya que expresan diferentes marcadores (De Ugarte y cols., 2003), capacidad de diferenciación y expresión génica, perfil proteómico y propiedades inmunológicas (Noël y cols., 2008). No obstante la fuente más rica y accesible será el tejido adiposo.

I.7.2.2.1. Características de las Células Madre Mesenquimales

Presentan una morfología fibroblastoide, y aunque minoritaria, también se ha observado una forma romboide en cultivo. Estas pueden ser aisladas y expandidas en medio de cultivo debido a sus propiedades de adhesión al plástico, diferenciación y proliferación *in vitro* (Gnecchi y Melo 2008). Las MSCs son capaces de autorrenovarse y diferenciarse en múltiples linajes celulares de origen mesodérmico, tales como adipocitos, osteocitos, condrocitos. Bajo las condiciones apropiadas también pueden diferenciarse a linaje endodérmico y ectodérmico.

Además de las características anteriores, como requisito para ser consideradas MSCs deben expresar los antígenos mesenquimales CD73,

CD90 y CD105 y no tener antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, CD14 y CD11b. Además, se ha planteado que las MSCs pueden expresar los siguientes antígenos: CD13, CD29, CD44, CD116 y el receptor a del factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

En cuanto a las propiedades biológicas más relevantes destacan sus efectos inmunomoduladores, antiinflamatorios, angiogénicos y antirombóticos. Aunque los mecanismos por los que ejercen esta actividad todavía no están completamente definidos, se ha demostrado su capacidad de secretar citoquinas y factores de crecimiento, migrando al lugar donde existe el daño tisular y adquiriendo dichas propiedades (Phinney y Prockop 2007). Además presentan una actividad biológica intrínseca debido a su potencial de diferenciación *in vivo* a diferentes linajes.

I.7.2.3. Ventajas y Limitaciones del Uso de Células Madre

El conocimiento de las ventajas y limitaciones derivadas de la utilización de células madre, hace que se comprenda mejor este nuevo tipo de tratamiento así como sus posibles aplicaciones o no en determinadas enfermedades con vistas a alcanzar el éxito. En este sentido se ha de recordar que el objetivo de este nuevo concepto de tratamiento es el de alcanzar el máximo beneficio, mayor que con la terapia convencional, con el menor riesgo posible.

Tabla 5. Ventajas e inconvenientes de la terapia con células madre.

VENTAJAS	LIMITACIONES
Alternativa al tratamiento de enfermedades que hoy día no tienen cura	Las células madre pueden permanecer indiferenciadas en cuyo estado hay riesgo de proliferación incontrolada y de formación de tumores
Diversidad de aplicaciones terapéuticas	El desarrollo de un medicamento de terapia celular implica un alto costo económico que debe ser soportado por la entidad promotora, es un problema serio para las entidades públicas
Permiten el estudio de diferentes etapas de desarrollo que no pueden ser estudiadas directamente en un embrión humano y que a veces podrían estar vinculadas con defectos en el nacimiento, aborto o infertilidad	El empleo de las mismas, suele suscitar problemas éticos entre la población
Son un gran descubrimiento que actualmente salva vidas o facilita la de aquellos que están enfermos	A veces son difíciles de controlar por lo tanto la manera en el que la célula va a tratar la enfermedad debe ser optimizada y definida correctamente
Las células madre adultas están muy especializadas por lo que su inducción es muy sencilla y además no crean conflictos en el sistema inmunológico	Los efectos a largo plazo de las células madre como medicamentos aún son desconocidos

I.7.2.4. Células Madre y Piel

La piel es un órgano expuesto a continuas agresiones externas, de tipo mecánico, químico y ambiental. Es por esto que, la epidermis, la dermis y los anexos (folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas), se renuevan permanentemente, para mantener sus diversas funciones. Precisamente, las células madre multipotentes, ubicadas en la piel, contribuyen de forma activa a esta capacidad de auto-renovación. Así en respuesta a estímulos externos como heridas, comienzan a proliferar para regenerar el tejido de la piel (Blanpain y Fuchs 2006).

Entre las células madre cutáneas incluyen células madre epidérmicas (células madre interfoliculares y protuberantes), células madre dérmicas,

células madre sebáceas, células madre del folículo piloso, células madre de glándulas sudoríparas, células madre melanocíticas, células madre mesenquimáticas, células madre neurales y células madre endoteliales.

Las SCs de la piel residen en unidades morfológicas y funcionales especializadas con un microambiente específico, llamadas nichos. Estos nichos pueden contener varias células madre, así como células de apoyo que proporcionan un marco o señalización a las anteriores (Ovaida y Nie 2013). Dentro de la piel humana, se han detectado al menos cinco nichos diferentes (capa basal de la epidermis, protuberancia del folículo piloso, base de la glándula sebácea, papilas dérmicas y dermis), que albergan diferentes tipos de SCs (Choi y cols., 2015).

SCs Epidérmicas Interfoliculares

Las SCs epidérmicas interfoliculares se dispersan individualmente a través de la unión dérmico-epidérmica. Constituyen alrededor del 1% ~ 7% de las células basales epidérmicas. Se han descrito varios marcadores de SCs en humanos, que incluye una elevada expresión en la superficie de las integrinas $\alpha 6$ y $\beta 1$, relevantes para mantener la unión de las SCs epidérmicas a su membrana basal a través de los hemidesmosomas.

SCs del Bulbo Piloso

Se han identificado varios tipos de SCs en el folículo piloso: una población de SCs multipotentes reside en el bulbo piloso (durante la fase telogénica del desarrollo del cabello), estas son las SCs más abundantes de la piel, y otra debajo de la glándula sebácea asociada al folículo (en la fase anágena). Este componente folicular se establece durante la morfogénesis del cabello embrionario y resiste la degeneración periódica durante el ciclo de crecimiento del cabello. La estimulación de SCs para salir de su nicho, así como su proliferación y diferenciación para formar folículos pilosos

maduros está estrechamente relacionada con el ciclo de crecimiento del cabello.

SCs de la Cresta Neural Epidérmica

Además de estas SCs epidérmicas, existe otra población que se originan en la cresta neural embrionaria, llamadas SCs de la cresta neural epidérmica (EPI-NCSC del inglés *Epidermal Neural Crest SCs*), las cuales pueden dar lugar a linajes de células melanocíticas, neuronales y miogénicas, *in vitro* y diferenciarse hacia linajes mesenquimales, ya que son capaces de dar lugar a adipocitos, condrocitos y osteocitos. Debido a su plasticidad fisiológica, multipotencia, fácil acceso y escasos problemas éticos, estas EPI-NCSC constituyen una prometedora herramienta para la reparación de lesiones de médula espinal (Clewes y cols., 2011).

SCs dentro de la Glándula Pilosa

Se supone que las glándulas sebáceas, unidas al folículo piloso, descienden de diferentes poblaciones SCs foliculares; otros estudios describen la existencia de una población de SCs dentro de la propia glándula (Ghazizadeh y Taichman 2001).

SCs Melanocíticas

SCs melanocíticas derivan de la cresta neural y residen permanentemente en el bulbo piloso, en la epidermis basal y, probablemente, también en la dermis. Producen melanocitos productores de pigmento en la epidermis y en la matriz del cabello. Una disfunción de esta población de SCs da como resultado defectos en la pigmentación que se manifiestan fenotípicamente como el encanecimiento del cabello (Lang y cols., 2013).

SCs Dérmicas

Las SCs dentro de la dermis, el tejido adiposo y la hipodermis son esencialmente de origen mesodérmico, por lo tanto, mesenquimales. Estas se encuentran en el tejido conjuntivo de la dermis, rodean los folículos pilosos o se encuentran entre pericitos alrededor de los vasos sanguíneos. Además de los fibroblastos, las MSCs dérmicas generan miofibroblastos, células endoteliales, nervios, vasos sanguíneos, osteoblastos, condrocitos y adipocitos.

Todavía no hay un patrón que defina el mecanismo de reparación de la piel. Sin embargo, se sabe que existe una marcada interacción molecular entre sistemas. Así las MSCs ubicadas en la dermis y la hipodermis son críticas en el proceso de curación de heridas porque coordinan la respuesta de la reparación tisular al atraer otras células huésped, factores de crecimiento y proteínas secretoras de la matriz extracelular.

I.7.2.5. Aplicaciones de Células Madre en Dermatología

Los últimos hallazgos proponen a las células madre como unas de las terapias más prometedoras en el tratamiento de diferentes patologías dermatológicas. Entre las patologías estudiadas más comunes, están las enfermedades autoinmunes, lesiones de grandes quemados, lesiones cutáneas secundarias a radioterapia, úlceras crónicas, trastornos de la pigmentación y dermatología estética (Prodinger y cols., 2017).

En la actualidad el 50% de las heridas graves de la piel no responden a los tratamientos convencionales (Mustoe y Cols., 2006). El uso de MSCs en la cicatrización de heridas ha ido tomando relevancia en clínica, especialmente en aquellos que son difíciles de cicatrizar, como lesiones resultantes de diabetes, traumatismos graves, insuficiencia vascular,

quemaduras graves y extensas y muchas otras afecciones (Maxon y cols., 2012).

La curación de heridas es un proceso complejo y dinámico mediante el cual la piel intenta repararse después de una lesión. Como ya se ha comentado el proceso de reparación de la herida se puede dividir en tres fases (inflamación, proliferación y maduración), todas ellas susceptibles a múltiples factores que, al interferir, podrían provocar heridas crónicas (Reinke y Sorg 2012). En este contexto, las MSCs brindan una prometedora herramienta en la curación de heridas agudas y crónicas, mediante la consecución de múltiples objetivos: acelerar la reparación, amortiguar eventos inflamatorios sobre-exuberantes y reducir o eliminar la formación de cicatrices.

Las MSCs pueden actuar intrínsecamente como agentes terapéuticos, a través de la diferenciación celular, la modulación del microambiente y la respuesta inmunológica, la secreción directa de los factores de crecimiento, la neovascularización y la reepitelización, así como la movilización de las SCs residentes.

Las MSCs desempeñan un papel importante en la mediación de cada etapa del proceso de curación de la herida. Durante la fase inflamatoria, pueden coordinar los efectos de la inflamación estimulando las citoquinas antiinflamatorias, así como inhibiendo los efectos nocivos de las citoquinas proinflamatorias. Esta capacidad para promover la atenuación de la inflamación es particularmente crítica para el tratamiento de heridas crónicas, en las que altos niveles de inflamación pueden prevenir el proceso de regeneración del tejido. Las células madre mesenquimales contribuyen a la fase proliferativa de la regeneración a través de la secreción de factores de crecimiento como VEGF, bFGF, KGF y la promoción de la granulación y la epitelización. Estas células también pueden regular la remodelación de la

herida curada al promover la deposición de matriz extracelular organizada durante su reemplazo.

En los márgenes de la herida, estimulan la formación de tejido de granulación al aumentar la proliferación de células epidérmicas y el crecimiento de nuevos capilares sanguíneos. Además, el reclutamiento de células endoteliales se estimula a través de la liberación de factores proangiogénicos y factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento endotelial vascular y la angiopoyetina-1. Las MSCs modifican la producción del factor de necrosis tumoral α y disminuyen la función de las células NK en la fase inflamatoria, lo que reduce la actividad del interferón- γ . En la última fase de cicatrización, la formación de cicatrices se reduce a través de la secreción de PGE2 y la disminución de la proporción de TGF- β 1 a TGF- β 3, la regulación positiva de IL-10 y la regulación descendente de IL-6 e IL-8. Estos efectos están acompañados por una disminución en la producción de colágeno y la fibrosis. Además, las MSC también ejercen actividad antimicrobiana a través de la secreción de proteínas antimicrobianas o factores moduladores del sistema inmune (Isakson y cols., 2015). Por lo tanto, las MSCs no sólo son capaces de diferenciarse en múltiples linajes celulares sino que son capaces de secretar potentes factores bioactivos que permiten regular la función de otros tipos de células (Sorrel y Caplan 2010). Los mecanismos básicos por los cuales las MSCs podrían mejorar las heridas son: (i) comunicación paracrina con células de heridas residentes, células inflamatorias infiltrantes y células presentadoras de antígenos (ii) su diferenciación en células residentes o (iii) ambas.

Si la actividad paracrina es su función principal en la reparación de heridas, su presencia en estas será transitoria. Además, las interacciones paracrinas implican una yuxtaposición celular cercana con otras células, una característica que requeriría la integración de las MSCs en el lecho de la herida. Smith y cols. (2010), encontraron que las MSCs en cultivo con

fibroblastos dérmicos influyen en la cinética de proliferación, la cinética de migración y los perfiles de expresión génica de estas células. Por el momento, los mecanismos por los que produce factores paracrinos e interactúa con otros tipos de células que normalmente se encuentran en las heridas requieren de una investigación más extensa para así poder desarrollar un perfil funcional para estas células.

Sin embargo, sí se diferencian en células de tejido estructural tales como fibroblastos, células endoteliales vasculares o pericitos, se esperaría que su presencia en la herida fuera duradera. La información actual sobre la longevidad de las MSCs en las heridas varía. Por ejemplo, Falanga y cols. (2007), encontraron que la mayoría de sus MSCs aplicadas tópicamente habían dejado la herida en 25 días. Por el contrario, la inyección de MSCs en la región pericárdica reveló la presencia continua de MSCs durante 1 año. Estas variaciones pueden depender del tipo de tejido, tipo de herida, el método de etiquetar las células o el grado de heterogeneidad de las MSCs.

I.7.2.6. Vías de Administración de las MSCs en el Tratamiento de Heridas

Actualmente, se utilizan dos vías para la administración de MSCs en el tratamiento de heridas en general, y quemaduras en particular: administración sistémica o general y administración tópica o local. Sin embargo no se ha definido un método ideal para su administración eficaz. En este sentido se sigue investigando qué porcentaje de células administradas localmente en una herida tiene efectos sistémicos, con respecto a la respuesta inflamatoria e hipermetabólica. Tampoco está clara la eficacia de la administración no tópica, en cuanto a la viabilidad y la ubicación de las células madre tras su administración (Arno y cols., 2011).

I.7.2.6.1. Administración Sistémica

La administración sistémica imita la ruta de las MSCs endógenas a través del sistema circulatorio orientando finalmente a las células hasta la biofase. Durante el tránsito vascular, las MSCs corren el riesgo de ser eliminadas de la circulación, de forma temporal o permanente, en órganos como los pulmones, el bazo y el hígado. Esto puede retrasar su tránsito o reducir el número de células que finalmente lleguen hasta el órgano diana. Una vez alcanzado el órgano o tejido lesionado, al llegar a su sitio las MSCs deben salir de la vasculatura para ingresar en la región del estroma del tejido conectivo donde podrá desempeñar funciones principales. Además se trata de un procedimiento invasivo con riesgos asociados (Karp y Teo 2009).

Varios estudios confirman los efectos positivos de MSCs (en particular, MSC aislados de la piel, grasa y médula ósea) sobre la curación de heridas agudas y crónicas a través de la inducción y aceleración de procesos regenerativos. Existen datos preclínicos que demuestran como la inyección local de BM-MSCs (MSCs procedentes de médula ósea, del inglés *Bone Marrow*) en una herida incisional acorta significativamente el tiempo de curación al tiempo que estimula la angiogénesis, la reepitelización y la granulación (Wu y cols., 2007). También se ha demostrado una cicatrización acelerada de heridas de úlceras diabéticas tras el uso de BM-MSC (Badiavas y Falanga 2003).

Los inconvenientes propios de BM-MSCs han obstaculizado el progreso y desarrollo de estas investigaciones. Como contraparte otros estudios han investigado el efecto de células madre procedentes de tejido adiposo (AD-MSCs, del inglés *Adipose Derived*) sobre la curación de heridas tanto *in vitro* como *in vivo*. Cabe destacar que este tipo de células pueden aislarse fácilmente en cantidades relativamente altas y se da una eficacia de

recuperación satisfactoria (Hassan y cols., 2014). Además, se ha demostrado que la fase proliferativa de la curación implica la repoblación de adipocitos dentro de las heridas de la piel. Este hecho es muy significativo ya que ratones lipoatróficos muestran una cicatrización deficiente de la herida en comparación con los controles, suponiendo que los adipocitos son elementos clave de la comunicación intercelular durante la reparación de la herida que median la migración y la función de los fibroblastos (Schmidt y Horsley 2013). El efecto de curación de heridas de las AD-MSCs al reducir el tamaño de la herida y acelerar la reepitelización se ha confirmado en varios estudios (Kim y cols., 2011; Schmidt y Horsley 2013).

I.7.2.6.2. Administración Tópica

Una vía alternativa a la sistémica para la aplicación de MSCs en el lugar de la herida o lesión isquémica es la vía tópica. Obviamente las lesiones en piel y mucosas son candidatos idóneos para esta vía de administración. En concreto la piel es un ejemplo de órgano altamente accesible.

En este caso se habla de dos posibilidades: por un lado las MSCs migrarán al órgano diana a través de vías no vasculares, y por otro, comenzarán a liberar factores bioactivos desde el vehículo que se aplique sobre la herida.

Los mecanismos por los cuales las MSCs se concentran en las heridas varían en función del sistema de liberación o el modo de administración. Las formas hasta el momento empleadas incluyen la inyección próxima a la herida, un aerosol de fibrina y una esponja de colágeno. En todos los casos se observó una mejoría considerable aunque diferente.

Stoff y cols. (2009), inyectaron MSCs humanas concentradas en puntos adyacentes a heridas incisionales hechas en la piel de conejos. Las células migraron desde el lugar de la inyección atravesando la unión dérmica-

epidérmica de la herida el día 14, llegando a la herida el día 21. Según estos resultados las MSCs fueron capaces de migrar a través del tejido conectivo lo que sugiere algún tipo de mecanismo atractivo. Las heridas tratadas con MSCs recuperaron el 52% de la resistencia a la tracción normal de la piel en comparación con un 31% de restauración de la resistencia a la tracción en las heridas no tratadas. Esto se corresponde con una deposición más efectiva de fibras colágenas que también estaban más altamente organizadas.

En resumen, la cicatrización se redujo y hubo un aumento consecuente en la función del tejido. Los conejos utilizados en el estudio eran completamente inmunocompetentes, y no se administraron fármacos inmunosupresores a los animales; no hubo evidencia sobre el rechazo de MSCs xenogénicas inyectadas.

Falanga y cols. (2007), utilizaron un aerosol de fibrina con BM-MSCs autólogas sobre heridas de las extremidades inferiores. En este caso la mayoría de células se encontraron fuera de la herida el día 21 después de la aplicación. Sólo algunas células se encontraron en las heridas asociadas con estructuras vasculares. Las heridas tratadas con células sanaron significativamente más rápido que las no tratadas, mostrando además una histología más madura. Igualmente, Nambu y cols. (2009), utilizaron una matriz de colágeno y observaron la re-epitelialización del tejido en comparación con los controles.

Aunque la médula ósea, la piel y el tejido adiposo son las fuentes más utilizadas para obtener las SC para la regeneración de heridas, recientemente se ha investigado con éxito el tejido extraído de la placenta y el cordón umbilical humano. Tras comparar las BM-MSCs con las derivadas de la placenta o el tejido del cordón umbilical UC- MSCs (del inglés, *Umbilical Cord MSCs*) se observaron diferencias mínimas en el fenotipo celular, la diferenciación y otras propiedades (Barlow y cols., 2008).

I.7.2.7. Aplicación de MSCs en el Tratamiento de Quemaduras

El papel de las MSCs en el tratamiento de quemaduras ha ido creciendo a lo largo de los años debido a la gran cantidad de casos de quemaduras, especialmente en la región del medio oriente y específicamente en aquellas áreas con conflictos armados.

I.7.2.7.1. Papel de las MSCs en la Fisiología de la Quemadura

Con respecto a la fisiología por la cual las células madre mejoran el proceso de curación de heridas por quemaduras, se ha demostrado que dicho proceso involucra diferentes tipos de factores de crecimiento, receptores y citoquinas. Estos factores están relacionados con la localización, diferenciación y proliferación de células madre. En este contexto hay varios estudios.

Mansilla y cols. (2006), encontraron evidencia de células en el torrente sanguíneo con fenotipos idénticos a las BM-MSCs después de grandes quemaduras agudas de la piel. Por lo tanto, se concluyó que estas células madre pueden tener un papel en la promoción de la cicatrización de heridas en quemaduras. En un estudio similar. Fox y cols. (2008), reportaron niveles elevados de células progenitoras endoteliales derivadas de la médula ósea en pacientes con quemaduras. Estos niveles eran proporcionales a la extensión de la quemadura. El estudio también mostró un aumento de los niveles de citoquinas angiogénicas que pueden estar involucradas en la vía de señalización para promover la liberación de células madre derivadas de la médula ósea. Además, Cabrera y cols. (2012) demostraron que las

células madre tienen un papel activo en la curación de heridas por quemaduras al producir péptidos bioactivos, como la timosina 4 y otros.

Yang y cols. (2013), realizaron estudios sobre la vía de señalización de CXCR4 en la cicatrización de ratones irradiados. Los ratones que tienen una sobre-expresión de CXCR4, un receptor involucrado en la localización y migración de varios tipos de células madre, mostraron un tiempo de cicatrización acelerado de la herida. Además, Hu y cols. (2013) inyectaron células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea en ratones y estudiaron el efecto del bloqueo de los receptores CXCR4. Descubrieron que el bloqueo de la vía CXCL12/CXCR4, causó el cierre retardado de la herida en las heridas por quemadura infligidas. Por lo tanto, las células madre parecen ser atraídas y adheridas al sitio de la quemadura por la vía CXCL12/CXCR4 lo que involucra a los receptores CXCR4.

I.7.2.7.2. MSCs en la Curación de Quemaduras

El uso de células madre para la cicatrización de heridas por quemaduras, se remonta al año 2003 con Shumakov y cols. (2003). Ellos fueron los primeros en utilizar BM-MSCs en la cicatrización de heridas por quemaduras observando una infiltración celular disminuida de la herida y una formación acelerada de nuevos vasos y tejido de granulación en comparación con el uso de fibroblastos embrionarios. Un poco más tarde, Rasulov y cols. (2005) fueron los primeros en utilizar BM-MSCs en pacientes con quemaduras cutáneas extensas (grado III) con la consiguiente cicatrización más rápida y neoangiogénesis activa. Igualmente se observó una neoangiogénesis aumentada y más densa cuando se inyectaron MSCs sobre quemaduras inducidas en un modelo murino.

Las MSCs no solo promueven una cicatrización más rápida de las heridas por quemaduras y disminución de la fibrosis dérmica, sino que

también evitan la progresión de las lesiones como así lo demostraron Singer y cols. (2013). Estos autores realizaron un experimento donde infligía quemaduras térmicas a ratas, con varias quemaduras rectangulares en cada rata separadas por espacios intermedios no quemados. Algunas de las ratas recibieron inyecciones en la vena de la cola con MSCs, mientras que otras recibieron inyecciones de solución salina. Después de 7 días, todos los espacios sin quemar de las ratas control estaban necróticos. Sin embargo, el 20% de los espacios sin quemar en ratas tratadas con MSCs no presentaban necrosis. En consecuencia, también se demostró que las células madre desempeñan un posible papel en la prevención de la progresión de las lesiones por quemaduras. Liu y cols. (2014), también estudiaron el efecto de las UC-MSCs en la curación de quemaduras graves infligidas en ratas. Los autores encontraron que la inyección de las células madre aceleró la cicatrización de la herida en comparación con los controles, disminuyó el recuento de células inflamatorias, aumentó la neovascularización así como los niveles de VEGF.

A pesar de todos estos prometedores avances todavía existen varias dificultades que deben ser solventadas:

- Las MSCs deben cultivarse en cantidades suficientes para una aplicación tópica significativa. Además es importante la obtención de un fenotipo estable, establecer la dosis más adecuada, etc.
- Se ha de considerar el microambiente de la herida, a menudo muy hostil. Esto supone un inconveniente tanto para las células endógenas como para las exógenas. Debido a ello las células madre implantadas mueren a menudo o no se integran adecuadamente en el tejido circundante.
- Es importante su integración en el medio biológico. Las características terapéuticas de estas células se activan al ponerse en contacto con los

tejidos dañados o con otras células de la herida para efectuar una respuesta terapéutica, por tanto el vehículo debe permitir su completa liberación. Pero la mayor dificultad reside en cómo aplicar esas células ya que estas necesitan de un vehículo que facilite su contacto con la herida y que las mantenga viables.

Por tanto, el éxito de la respuesta terapéutica tras el tratamiento con células madre en pacientes con quemaduras, requiere de un soporte que facilite la supervivencia, proliferación, diferenciación, movilización y la adhesión de las células. Estos vehículos o matrices no sólo servirán para mejorar la señalización paracrina de las células sino también la cicatrización y asepsia de las heridas (Drago y cols., 2010).

I.7.2.8. Scaffolds y MSCs (Ingeniería de Tejidos)

A nivel galénico, una de las principales limitaciones actuales es el desarrollo de estrategias que aseguren que estas células lleguen a la lesión de manera oportuna y en cantidad suficiente para maximizar sus beneficios terapéuticos.

El elemento que posibilita la vehiculización de las células y/u otros componentes bioactivos facilitando la formación de tejidos funcionales u órganos se le conoce como andamio o *scaffold*. El *scaffold* está constituido, por tres componentes principales: un soporte material, un componente celular y aditivos activos. El soporte material o matriz, es el elemento estructural básico y lo constituye un biomaterial, y los aditivos activos son los encargados de regular o inducir la respuesta celular deseada en el lugar del implante. Por ejemplo: factores de crecimiento, vectores de transmisión génica y/o fármacos.

Las funciones clave de estos *scaffolds* son: (i) vehiculizar las células sembradas hasta la biofase, (ii) estimular las interacciones célula-biomaterial, (iii) promover la adhesión celular, (iv) permitir el transporte adecuado de gases y nutrientes y los factores de crecimiento para asegurar la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células, (v) conferir un grado de inflamación despreciable o toxicidad *in vivo*, y (vi) controlar la estructura y función del tejido diseñado por ingeniería (Langer y Tirrell, 2004).

Los *scaffolds* deben cumplir con una serie de características que se detallan a continuación.

Biocompatibilidad

El *scaffold* debe garantizar la supervivencia y según la aplicación o tipo celular que vehiculice, la diferenciación celular en su interior. Además, una vez implantado debe interactuar positivamente con otras células permitiendo su adhesión, crecimiento y migración así como tener una respuesta inmune negativa para impedir procesos de inflamación que conduzcan al rechazo del material implantado.

Biodegradabilidad

El *scaffold* es una estructura temporal, que el organismo debería metabolizar una vez haya cumplido su función. Una vez cumplido su objetivo, el *scaffold* debería degradarse progresiva y simultáneamente con la restauración del nuevo tejido o función. Además los subproductos de la degradación no deben ser tóxicos y deben excretarse del cuerpo sin interferir con otros órganos o con las propiedades originales del propio *scaffold*.

Propiedades mecánicas

El *scaffold* debe tener unas características mecánicas que se adapten al sitio en el que va a ser implantado, de forma que imite lo mejor posible el tejido y condiciones *in vivo*, y dañe lo menos posible la zona circundante durante su administración. Debe mantener sus propiedades físicas durante un tiempo adecuado mientras tiene lugar la regeneración del tejido, antes de su biodegradación. Estas propiedades mecánicas deben estar en equilibrio con la liberación de los activos o células que contiene. A menudo, un *scaffold* más denso proporciona una mayor resistencia mecánica y un andamio más poroso proporciona una mejor entrega de activos, nutrientes, etc.

Arquitectura del andamiaje

El *scaffold* debería presentar poros en cantidad, tamaño y conectividad adecuados, que permitan la supervivencia celular así como, una adecuada difusión de nutrientes y productos de desecho. Además, el *scaffold* debe mimetizar el entorno del lugar donde será implantado, por lo que debería adaptar su geometría y conformación espacial al órgano diana permitiendo la completa interacción de las células con el medio que les rodea. El *scaffold* puede adoptar varias formas: matriz 3D, matriz nanofibrosa, hidrogel o matriz 2D, microesfera, etc.

Tecnología de producción del andamiaje

La fabricación del *scaffold* debe ser rentable y escalable desde un nivel de laboratorio hasta un nivel industrial.

I.7.2.8.1. Scaffold-Hidrogel

El diseño de un andamio con características óptimas es, como se mencionó anteriormente, uno de los componentes principales para el éxito de la ingeniería de tejidos. Durante la última década, los andamios tipo hidrogel han recibido una atención considerable debido a su similitud estructural y en composición con la matriz extracelular natural ECM (del inglés, natural *Extracellular Matrix*), además de proporcionar un ambiente deseable para la proliferación y supervivencia celular (Lee y Mooney 2001).

Los hidrogeles son redes tridimensionales compuestas de polímeros hidrófilos reticulados a través de enlaces covalentes o atracciones físicas intramoleculares e intermoleculares (El-Sherbiny y Yacoub 2013). Se componen de una fase sólida, que generalmente representa menos del 10% del volumen total del gel y una fase líquida. En los hidrogeles, la fase líquida es agua (y en ocasiones ciertos coadyuvantes).

La fase sólida garantiza la consistencia del gel, lo que le permite absorber grandes cantidades de agua mientras permanece insoluble en la fase líquida. La alta hidrofiliidad de los hidrogeles se debe particularmente a la presencia de restos hidrófilos tales como grupos carboxilo, amida, amino e hidroxilo distribuidos a lo largo del esqueleto de las cadenas poliméricas. Por tal motivo, los hidrogeles pueden absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos, hinchándose fácilmente sin disolverse. Su alto contenido de agua los hace compatibles con la mayoría de los tejidos vivos. Los hidrogeles generalmente se hinchan hasta alcanzar su estado de equilibrio entre las fuerzas impulsoras osmóticas, que estimulan la entrada de agua o fluidos biológicos en la matriz hidrófila, y las fuerzas de cohesión ejercidas por las cadenas de polímero dentro del hidrogel. Estas fuerzas de cohesión resisten la expansión del hidrogel y dependen, particularmente, de la densidad de reticulación del hidrogel. En

general, cuanto más hidrofílico es el polímero que forma el hidrogel, mayor es la cantidad total de agua absorbida por el hidrogel. Igualmente, cuanto mayor sea la extensión de reticulación de un hidrogel, menor será el grado de hinchamiento del gel.

En estado hinchado, los hidrogeles son suaves, gomosos y flexibles, con gran parecido a los tejidos vivos, lo que minimiza el daño al tejido circundante durante y tras su implantación en el paciente. Las propiedades mecánicas de los hidrogeles tienden a imitar a las de los tejidos corporales blandos, lo que permite que los geles aseguren la funcionalidad y características morfológicas del tejido a reparar. Esta es la razón por la que los hidrogeles se utilizan a menudo como andamios biomédicos para el reemplazo de tejidos, y sean idóneos, en el tratamiento de heridas, en general, y quemaduras, en particular (Dash y cols., 2011).

Los hidrogeles en sus formas secas generalmente se llaman "xerogeles", mientras que los hidrogeles porosos secos resultantes del uso de técnicas de secado como la liofilización o la extracción con solventes se denominan "aerogeles". La literatura ofrece diferentes clasificaciones; algunas de las más usuales son las siguientes (El-Sherbiny y Yacoub 2013).

- Según su origen: los hidrogeles se pueden clasificar como naturales, sintéticos y semisintéticos. Ello dependerá de la naturaleza del polímero utilizado.
- Según la durabilidad del hidrogel: Los hidrogeles pueden ser duraderos (como la mayoría de los hidrogeles a base de poliacrilato) o biodegradables (como los hidrogeles a base de polisacáridos), según sus características de estabilidad en un entorno fisiológico.
- Según su carga: los hidrogeles podrán ser no iónicos, catiónicos, aniónicos y anfotéricos en función del tipo de carga de los grupos funcionales presentes en las cadenas de los polímeros que componen el hidrogel.

- Según su tamaño: los hidrogeles pueden disponerse formando redes macroscópicas o estructuras más pequeñas, dando lugar a microgeles o nanogeles. Estos dos últimos por lo general se definen como dispersiones acuosas de partículas o redes coloidales de tamaño micro o nanométrico.
- De acuerdo con la respuesta del hidrogel a los estímulos ambientales: estos geles sufren una transición de fase reversible debido a un estímulo externo como por ejemplo un cambio de temperatura, pH, campo eléctrico, fuerza iónica, ultrasonidos, etc.
- En función del tipo de enlaces:
 - Hidrogeles físicamente reticulados. Este tipo de hidrogeles dan lugar al concepto de hidrogeles reversibles, los cuales experimentan una transición de su estructura tridimensional estable a una solución de polímero. Los enlaces entrecruzados se forman a partir de fuerzas de atracción no covalentes entre las cadenas poliméricas. Estas fuerzas son a menudo puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas y electroestáticas. Como limitación, el hidrogel podría sufrir un deterioro incontrolado de las propiedades originales.
 - Hidrogeles químicamente reticulados. Las reticulaciones químicas son estructuras permanentes, excepto cuando se introducen enlaces químicos lábiles, de ahí que este tipo de hidrogeles sean más estables que los físicamente reticulados. La reticulación es un método común para controlar con precisión la densidad del hidrogel, sin embargo, debe considerarse la toxicidad de las moléculas de reticulación, y la formación de enlaces cruzados no degradables, lo que puede ser una desventaja en la mayoría de las aplicaciones de ingeniería de tisular.

I.8. BIOMATERIALES

La combinación de células con biomateriales es uno de los principales desafíos en el tratamiento de heridas producidas por quemaduras. La Sociedad Europea de Biomateriales decidió, en 1991, definir los biomateriales como aquellos *“materiales utilizados para evaluar, curar, corregir o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo humano”*. Tal como dice la definición de biomaterial, el fin de éste será entrar en contacto con un sistema biológico por lo que debe poseer unas propiedades características tanto mecánicas como biológicas.

La característica esencial y que deben cumplir todos los biomateriales es la biocompatibilidad, la cual se entiende como *“la cualidad de no inducir efectos tóxicos o dañinos sobre los sistemas biológicos donde actúan, devolviendo una respuesta apropiada por parte del receptor y con un fin específico”*. Debido a las características del sistema inmunológico cuando se introduce un cuerpo extraño en el organismo éste tiende a rechazarlo o incluso a atacarlo, generando dolores, inflamaciones, que pueden provocar la retirada de dicho material. Por lo tanto, se debe garantizar la biocompatibilidad antes de proceder a la administración.

Otra característica a tener en cuenta en la gran mayoría de biomateriales es su biodegradabilidad, que se define como la resistencia de una sustancia a ser descompuesta en los elementos químicos que la componen por la acción de organismos vivos o bajo condiciones ambientales.

Además, debido a la progresiva pérdida de masa, las propiedades mecánicas se verán afectadas. Por lo tanto otro aspecto a tener en cuenta a la hora de diseñar un biomaterial serán sus propiedades mecánicas.

Según su naturaleza se clasifican en:

- Metales. Poseen buenas propiedades mecánicas. Usados, por ejemplo, en prótesis ortopédicas, implantes dentales.
- Polímeros. Tienen propiedades cercanas a los tejidos vivos. Son los biomateriales más usados en implantes e ingeniería de tejidos.
- Cerámicos. Son químicamente inertes y estables. Usados, por ejemplo, en prótesis óseas, válvulas de corazón.

I.8.1. Biopolímeros

Un biopolímero es un polímero cuyo fin es el de interactuar con un sistema biológico con el fin de evaluar, curar, corregir o reemplazar algún tejido, órgano o función del organismo. Son macromoléculas formadas por las uniones covalente de dos o más unidades simples llamadas monómeras, que han sido obtenidas mediante un proceso de polimerización. A su vez las cadenas están unidas entre sí por enlaces de tipo secundario como fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, etc. que son débiles.

Cuando se parte de un solo tipo de molécula se habla de homopolimerización y homopolímero. Para conseguir la adaptación de las propiedades para una aplicación determinada es común utilizar la copolimerización, proceso de polimerización en que se utilizan dos o más monómeros químicamente diferentes. Los copolímeros se clasifican según la secuencia de los monómeros como copolímeros de bloque, de injerto y de azar.

También es importante que estos materiales mantengan su funcionalidad en ambientes agresivos durante el periodo deseado. Este periodo deseado es un factor decisivo en la biodegradación. No es una característica de todos los biopolímeros, ya que sólo es necesario en aquellos cuya aplicación sea

temporal, como por ejemplo las suturas o los sistemas de liberación de fármacos.

Una posible clasificación de biopolímeros según su origen, organiza a éstos en tres grandes categorías:

- Biopolímeros naturales, sintetizados por los seres vivos, como ácidos nucleicos (ADN, ARN, etc.), proteínas (fibrinas, globulinas, colágeno, gelatina etc.), polisacáridos (celulosa, alginatos, ácido hialurónico, etc.).
- Biopolímeros derivados, sintetizados artificialmente, pero a partir de sustancias naturales, como los celuloideos.
- Biopolímeros sintéticos, empleados en implantes, como PLGA ácido poli láctico-co glicólico, siliconas, poloxámeros, policaprolactona, ácido polivinílico, etc.
- Biocerámicos: hidroxiapatita y fosfato tricálcico.

Entre las formas farmacéuticas que se pueden desarrollar mediante la conjunción de un polímero con un fármaco, se encuentran hidrogeles, micelas, microcápsulas, nanopartículas, etc. A pesar del amplio número de estudios la mayoría no se han trasladado a las etapas clínicas o solo se quedan con los estudios en modelos *in vivo*. De ahí que se encuentren en plena fase de investigación pre-clínica a nivel de diseño, elaboración y caracterización.

De este modo son muchos los trabajos publicados que reportan una amplia gama de biopolímeros con una gran cantidad de fármacos diferentes y destinados a una multitud de enfermedades.

I.8.1.1. Biopolímeros Utilizados como *Scaffolds* en el Tratamiento de Heridas por Quemaduras

La selección de los biomateriales que constituirán el *scaffold* influirá en las características principales de este y dependerá de las aplicaciones. Así, los materiales cerámicos, por ejemplo, se utilizan para desarrollar *scaffolds* en ingeniería de tejido óseo debido a sus propiedades biológicas favorables y fuerte resistencia mecánica. Sin embargo, debido a sus propiedades mecánicas intrínsecamente frágiles, no se usan, comúnmente, en la ingeniería de tejidos blandos, como la piel, donde los biopolímeros de origen natural serían los más adecuados. Sus propiedades mecánicas, estructurales y biológicas los hace muy similares a la ECM, y por tanto, muy útiles en el tratamiento de quemaduras (Lee y Mooney 2001).

A continuación se describen los polímeros seleccionados para el desarrollo de las investigaciones de esta Tesis Doctoral.

I.8.1.1.1. Chitosan

El chitosán es un biopolisacárido que se obtiene mediante la desacetilación alcalina del mucopolisacárido natural chitina que puede estar presente tanto en crustáceos, insectos, e incluso en las paredes celulares de hongos. La chitina es uno de los polisacáridos más abundantes. El chitosan tiene una estructura lineal compuesta por unidades de N-acetil-d-glucosamina y β -(1-4)-D-glucosamina, siendo la primera las unidades acetiladas y la segunda las unidades desacetiladas.

Debido a su alta biocompatibilidad y fácil biodegradación es por lo que se utiliza en la industria farmacéutica, tanto para la elaboración de sistemas de liberación de fármacos como en la elaboración de *scaffolds* en ingeniería de

tejidos. Sin embargo, también se ha demostrado que el quitosano posee propiedades farmacológicas. Así se han descrito actividades biológicas como antiulceroso, antiácido, hemostático, antimicrobiano y cicatrizantes de la piel (Ahsan y cols., 2017).

I.8.1.1.2. Glicosaminoglicanos

Los glicosaminoglicanos (GAGs) son heteropolisacáridos formados por cadenas de dímeros que se repiten, y en las que uno de los dos monosacáridos es siempre un aminoazúcar (N-acetilgalactosamina o N-acetilglucosamina) y el otro es un ácido urónico, (ácido-glucurónico o ácido L-idurónico). Están presentes en todas las superficies celulares de los animales y en la matriz extracelular, donde se sabe que se unen y regulan diferentes proteínas (factores de crecimiento, enzimas, citoquinas, etc.).

Los GAGs han sido obtenidos a partir de los tejidos de animales de granja, si bien debido a distintas zoonosis se desarrollaron otras fuentes de obtención como animales acuáticos como calamares, moluscos y peces.

Los GAGs que poseen un importante papel biológico pueden ser clasificados en cuatro grupos principales heparín/heparín sulfato, condroitín sulfato/dermatán sulfato, Keratán sulfato y hialuronato. Realizan una amplia variedad de importantes funciones biológicas, entre las que destacan sus funciones en la regeneración y cicatrización de la piel (Kaczmarek y cols., 2018).



HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

II. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

Actualmente los agentes nucleares/radiológicos se encuentran entre aquellos con mayor poder de destrucción. Las principales fuentes de esta radiación pueden ser de origen natural, reactores atómicos, debido a un accidente y fuga en las instalaciones, tratamientos médicos, o bien, al uso intencionado por parte de una nación hostil u organizaciones terroristas.

Importantes incidentes accidentales o intencionales de naturaleza radiológica y nuclear, aunque inusuales, nos han hecho ser conscientes de los efectos devastadores que podrían causar. Ejemplo de ello fueron, el desastre ocurrido en la central nuclear de Chernobyl en 1986, debido al sobrecalentamiento del núcleo del reactor nuclear, o más recientemente, el accidente de Fukushima en 2011 como resultado del daño causado por el tsunami al este de Japón.

Además de las catástrofes naturales, diferentes noticias, sobre la producción o el uso de armas nucleares han creado gran inquietud internacional, concretamente, las pruebas de Corea del Norte o información sobre la tenencia de uranio, altamente enriquecido, en Irán. Pero sin duda el riesgo más peligroso para la sociedad es el uso potencial de armas radiológicas o de destrucción masiva (ADM) por grupos terroristas contra civiles.

En último lugar, la fuente de esta radiación más frecuente procede de tratamientos médicos, derivados de la medicina nuclear o la radioterapia.

En cualquier caso, la exposición involuntaria a la radiación se ha convertido en una grave amenaza en las últimas décadas siendo dos las vías de contaminación:

- Contaminación externa: depósito de una sustancia radiactiva sobre la superficie exterior del cuerpo (piel, anexos, mucosas), producida como

consecuencia de la exposición a polvo radiactivo u otros materiales radiactivos.

- Contaminación interna: mediante la absorción de material radiactivo a través de piel dañada, inhalación o ingestión de materiales radiactivos transferidos desde manos contaminadas.

Ante cualquiera de las posibles amenazas NRBQ, y particularmente en el caso de contaminación radiológica/nuclear, la piel y mucosas (siendo la mucosa bucal y vaginal las de mayor incidencia) presentan un interés especial por diversas razones:

- Junto a las mucosas, la piel es altamente sensible a la exposición de agentes NRBQ comprometiendo su integridad en diferentes grados, según la naturaleza del agente.
- La piel posee una cinética de renovación constante, al igual que el tejido hematopoyético y las mucosas oral e intestinal, lo que le confiere características muy particulares en cuanto a la respuesta al daño radio-inducido.
- La piel es un órgano vital que aísla del exterior y mantiene la homeostasis, cuya afectación, en casos severos, puede poner en riesgo la vida del paciente. La piel lesionada no asegura su función de barrera protectora.

Tras la exposición radionuclear, se suceden todo tipo de lesiones, en mucosas y piel, desde las más leves, como eritema, descamación, edema, pérdida de pelo, a graves lesiones, como quemaduras, ulceraciones y necrosis. Si no se tratan, servirían como punto de entrada de radionucleidos, microbios, agentes mecánicos y químicos. En general, se observa que cualquier herida o alteración mucocutánea incrementaría la

gravedad de la lesión, la contaminación sistémica y/o la salud integral del paciente.

Pese a ser conscientes de la amenaza por agentes radiológicos/nucleares, y de las múltiples fuentes, accidentales, terapéuticas y/o terroristas, así como de la gravedad y lagunas que representan las lesiones en piel y mucosas causadas por las radiaciones ionizantes, no se dispone de medicamentos aprobados, eficaces y seguros para su tratamiento. De hecho, la mayoría de los productos comercializados no presentan evidencias clínicas, ofrecen conclusiones dispares e incluso opiniones contradictorias.

En este sentido el uso de medicamentos adaptados al paciente, a la fisiopatología de la lesión, con formas farmacéuticas de fácil y rápida administración, en caso de eventos inesperados y/o masivos, podrían evitar el daño a corto y largo plazo ocasionado por los agentes radiológicos sobre piel y mucosas, así como aminorar o evitar el daño sistémico. Además, en este tipo de eventos radiológicos la exposición a la radiación suele estar acompañada también del desprendimiento de una elevada cantidad de energía térmica por lo que a menudo las lesiones cutáneas serán de ambas índoles.

En esta línea, la infección es uno de los principales factores que impide la evolución fisiológica de la cicatrización de las heridas y que contribuye en la morbimortalidad de enfermos con quemaduras tanto de origen radiológico como térmico. Los motivos de la mayor susceptibilidad a la infección incluyen la inmunodepresión, a nivel celular y humoral, tanto para el sistema inmunitario innato como adaptativo, la pérdida de la barrera protectora de la piel y el excesivo síndrome de respuesta inflamatoria sistémica causante de un desequilibrio sistémico general.

Aunque las infecciones bacterianas constituyen la principal causa de sepsis en quemaduras térmicas, las infecciones fúngicas superficiales o

invasivas presentan un crecimiento preocupante en las unidades sanitarias asistenciales especializadas en quemaduras. Unida a la disminución en la respuesta inmune, la infección fúngica se ve también favorecida por el uso de antimicrobianos tópicos o sistémicos, mayor supervivencia del enfermo (con mayor probabilidad a infecciones) y el uso de determinados fármacos.

Las especies del género *Candida* siguen siendo las principales responsables de la infección fúngica. En la actualidad los azoles, en concreto, los imidazoles son de elección para el tratamiento de la mayoría de las micosis por ser los fármacos tópicos de mayor potencia, más seguros y con escasa absorción a través de piel y mucosas.

El arsenal terapéutico actual incluye varias alternativas farmacológicas, entre ellas el clotrimazol. Debido a su amplio espectro de acción, este se ha utilizado como referencia en la mayoría de ensayos clínicos y, constituye la prescripción más frecuente y extendida. Sin embargo, al igual que otros fármacos del mismo u otros grupos, presenta limitaciones relativas a su formulación, eficacia, toxicidad, y administración. Las presentaciones comerciales en nuestro país son: Canesten[®] crema 1%, Canesten[®] solución 1%, Canesten[®] polvos 1%, Gine Canesten[®] crema 2% y 10%, comprimidos vaginales 100 mg y 500 mg.

El mercado de formulaciones tópicas de clotrimazol es bastante restrictivo, limitándose a las vías cutánea y vaginal. La única formulación bucal de clotrimazol es Candid[®] solution, comercializada en India. Destacar, que el origen más frecuente de la infección fúngica invasiva es la herida cutánea por quemadura, aunque se puede dar por otros lugares como en el tracto gastrointestinal, siendo la mucositis la forma más habitual, de ahí la importancia de una formulación bucal. Además, el medicamento más utilizado, la crema comercializada, puede producir reacciones locales en la piel (como dermatitis de contacto) debido a su contenido en alcohol cetosteárico.

A los anteriores inconvenientes se suma la existencia de ciertas poblaciones (pacientes inmunocomprometidos o con diabetes mellitus) donde se ha descrito una mayor prevalencia de infecciones causadas por especies de *Candida* no *albicans*, con disminución de la sensibilidad a la formulación vulvovaginal. Este hecho debe tenerse en cuenta en el tratamiento de infecciones causadas por estas especies, por ejemplo *C. glabrata*.

Por otro lado, la cicatrización de las heridas es un proceso complicado que involucra la proliferación celular, migración y reconstrucción de tejido. En la lesión por quemaduras se pueden distinguir varias fases. Durante la fase final o fase hipermetabólica los pacientes con heridas o quemaduras experimentan un período prolongado de inflamación con una elevada producción de radicales libres, los cuales pueden causar daño sistémico en los tejidos. Además, la lesión por quemadura puede iniciar una respuesta inflamatoria sistémica que produce reacciones inflamatorias, toxinas, ROS y especies de nitrógeno reactivo (RNS). Ambas especies reactivas actúan conjuntamente para dañar las células, causando estrés. Los radicales libres formados tras la exposición a la radiación ionizante, dan como resultado una cascada de efectos que incluyen, daño al ADN, oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos que conduce a la muerte celular apoptótica, interferencia en las vías de señalización celular, detención del ciclo celular e inflamación relacionada con el factor kappa vinculante (NFkB), entre otros. Todos estos procesos son perjudiciales para la proliferación de nuevas células en el proceso epitelial de curación de heridas. El organismo dispone de antioxidantes endógenos pero no son suficientes para compensar el estrés oxidativo en tales condiciones. Cabe esperar que el uso de agentes antioxidantes como las vitaminas A, D y E podrían reducir estos efectos. Adicionalmente a su capacidad antioxidante cada uno de ellos contribuye a

restablecer el entorno para la curación de heridas con otras propiedades farmacológicas.

Por último, hay que destacar que los avances más recientes en el tratamiento de heridas producidas por la exposición a las radiaciones ionizantes están orientados en el uso de MSCs como estrategia para promover la regeneración del tejido. Este tipo de terapia avanzada abre un nuevo campo de posibilidades, a veces la última esperanza, en la curación de heridas y mejora de la calidad de vida. El reto de esta incipiente terapia será la vehiculización de las MSCs en un soporte compatible y que mimetice las condiciones y el entorno fisiológico donde dichas células ejercerán su acción.

Desgraciadamente, todas estas estrategias terapéuticas no están faltas de limitaciones o requisitos que restringen su eficacia, como se justifica a continuación.

La naturaleza altamente lipofílica del antifúngico y antioxidantes los hace particularmente adecuados para dispersarse en el estrato córneo dando lugar a un efecto reservorio. Sin embargo, limitará su correcta formulación en determinados excipientes. De forma similar las prometedoras propiedades de las células se verán contra restadas por su escasa viabilidad.

Por eso, el papel del excipiente como parte activa de este tipo de medicamentos será fundamental en la eficacia del tratamiento, no sólo como soporte para la supervivencia de las células-regeneración del tejido, sino por su actividad farmacológica adicional a los principios activos.

Puntualizar que la extensión de la superficie de la lesión, o bien la complejidad en su acceso (sobre todo en mucosas) suponen circunstancias que incrementan la dificultad en el tratamiento. De ahí que sea fundamental una forma farmacéutica de fácil administración, con acceso a cualquier cavidad.

Los vehículos seleccionados para el tratamiento que nos ocupa también, deberían cubrir todas las vías de administración susceptibles de medicación, mejorar la formulación de los activos, eficacia, baja toxicidad y capacidad de alcanzar y mantenerse en la biofase. En este sentido, las nanoemulsiones, emulsiones múltiples, hidrogeles termosensibles y *scaffold*-hidrogel constituyen sistemas de vehiculización de liberación de principios activos con grandes perspectivas de futuro, debido a sus numerosas propiedades y aplicaciones.

Sobre la base a todo lo expuesto anteriormente, el diseño de nuevas formas de dosificación tópicas para la vehiculización de fármacos convencionales (clotrimazol, vitaminas A, D y E) o nuevos activos (células madre mesenquimales) representa un desafío en el tratamiento de las lesiones mucocutáneas causadas por agentes radiológicos.



OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

III. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El aumento de posibles amenazas NRBQ, la mayor incidencia de cáncer tratado con raditerapia, la falta de formulaciones específicas y las particularidades de las lesiones producidas plantea el desarrollo de un tratamiento efectivo que reduzca la gravedad de las lesiones producidas por agentes radiológicos.

Por tanto, el principal objetivo de esta investigación será el diseño, desarrollo y caracterización de formas de dosificación tópicas frente la amenaza de agentes radiológicos.

Para ello los objetivos específicos serán:

- Conocer las estrategias de tratamiento actuales y futuras para la lesión por radiación de la piel.
- El diseño, desarrollo y caracterización de una nanoemulsión y una emulsión múltiple como sistemas de liberación de clotrimazol en piel y mucosas.
- El diseño, desarrollo y caracterización de un *scaffold*-hidrogel como plataforma para MSCs.
- Diseño, desarrollo y caracterización de un hidrogel termosensible portador de diferentes activos antioxidantes.

Bajo estas premisas y como plan de trabajo, a continuación se exponen los principales puntos de planificación. La aplicación de uno u otro dependerá de la naturaleza y características de cada formulación:

- a) Estudio general de los diferentes agentes NRBQ.

- b) Estudio exhaustivo de los agentes radiológicos. Evaluación sobre las posibilidades de contaminación, origen de las fuentes y lesiones causadas.
- c) Análisis sobre las alternativas terapéuticas. Actualización del conocimiento sobre nuevas formas de dosificación y avances en terapia celular.
- d) Diseño y optimización de las diferentes formulaciones. Selección cualitativa y cuantitativa de componentes.
- e) Normalización de la técnica de elaboración.
- f) Caracterización físico-química de los sistemas resultantes: pH, forma, tamaño, propiedades eléctricas y superficiales, conductividad, porosidad, capacidad adhesiva, capacidad de hinchamiento y de degradación *in vitro* y temperatura/ tiempo de gelificación. Varios de estos parámetros se estudiarán bajo diferentes condiciones fisiológicas.
- g) Predicción de la estabilidad física de las formulaciones.
- h) Estudio reológico de las formas de dosificación obtenidas.
- i) Evaluación de la esprayabilidad y extrudabilidad de las formulaciones.
- j) Determinación de la capacidad de incorporación de activos en los vehículos.
- k) Evaluación de la cinética de liberación del antifúngico desde las formulaciones.
- l) Evaluación *ex vivo* del grado de penetración o retención mucocutánea del antifúngico en función del vehículo.
- m) Estudio de la tolerancia dérmica y propiedades biomecánicas tras aplicar las formulas diseñadas.
- n) Caracterización biológica del medicamento celular: viabilidad celular, distribución en el *scaffold*.
- o) Estudio *in vitro* de la eficacia antimicrobiana de las formulaciones.

- p) Análisis del comportamiento *in vivo* del hidrogel termosensible antioxidante sobre quemaduras. Evaluación histológica de piel animal.



RESULTADOS

Artículo 1

THERAPY FOR PREVENTION AND TREATMENT OF SKIN IONIZING RADIATION DAMAGE: A REVIEW

*(Terapia para la prevención y el tratamiento del daño de la
piel producido por la radiación ionizante: Revisión)*

*José L. Soriano, Ana C. Calpena, Eliana B. Souto, Beatriz
Clares*

International Journal of Radiation Biology

(2018, DOI: 10.1080/09553002.2019.1562254)

ISSN:	0955-3002
eISSN:	1362-3095
Editorial:	Taylor & Francis LTD (Inglaterra)
Factor de Impacto:	1.970
Categoría:	Nuclear science & Technology
Rango:	3/33
Decil:	1° (percentil 92.424)

Resumen

Los accidentes radiológicos o los actos terroristas que utilizan material radiactivo, así como la exposición a radiación en procesos médicos o industriales son potenciales fuentes de riesgo para la salud humana. Todos estos riesgos comparten un elemento común, la radiación ionizante. La gravedad de la lesión producida por la radiación ionizante dependerá de numerosas variables independientes tales como la dosis, el tipo de radiación y tejido, etc. Como resultado de la exposición a la radiación ionizante tiene lugar efectos biológicos de forma aguda o a largo plazo. Como en el caso de otros tejidos auto-regenerativos (como el sistema hematopoyético y el epitelio intestinal), la piel es también extremadamente sensible a la radiación ionizante. De esta forma, el correcto tratamiento de los efectos de la radiación en la piel puede mejorar el beneficio terapéutico de la radiación médica, así como reducir la mortalidad asociada a cualquier incidente y/o accidente radiológico o ataque terrorista. Por esta razón, las distintas estrategias terapéuticas actuales y futuras para el daño cutáneo producido por la radiación se revisa en este trabajo.

Desafortunadamente no hay suficiente evidencia para establecer un tratamiento estándar para prevenir o mitigar el daño cutáneo de la radiación. Por tanto, es necesaria la investigación continuada para conseguir terapias efectivas para este importante problema de salud.

Therapy for prevention and treatment of skin ionizing radiation damage: A review

José L. Soriano ^a, Ana C. Calpena ^{b,c}, Eliana B. Souto ^{d,e}, Beatriz Clares ^{a,c,f,*}

^a *Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, 18071 Granada, Spain*

^b *Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain*

^c *Nanoscience and Nanotechnology Institute (IN2UB), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain*

^d *Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra (FFUC), Pólo das Ciências da Saúde, Azinhaga de Santa Comba, 3000-548 Coimbra, Portugal*

^e *CEB - Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga, Portugal*

^f *Biosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), SAS-University of Granada, Granada, Spain*

***Corresponding author at:** Dra. Beatriz Clares, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus de la Cartuja s/n, 18071 Granada, España. Tel: +34 958246664; Fax: +34 958248958; E-mail: beatrizclares@ugr.es

Abstract

Purpose: Radiologic accidents or terrorist acts involving radioactive material, as well as radiation exposure in medical or industrial procedures are potential sources of risk for human health. All these risks share a common element, the ionizing radiation. The extent of ionizing radiation injury will depend on a number of independent variables such as dose, type of radiation and tissue, etc. As a result of ionizing radiation exposure the biological effects take place in acute and long term manner. As in the case of others self-renewal tissues (hematopoietic system and intestinal epithelium), skin is also extremely sensitive to ionizing radiation. In this way, the correct management of radiation skin effects might improve the therapeutic benefit of medical radiation therapy, as well as reduce the mortality associated with any radiological incident and/or accident or terrorist attack. For this reason current and potential future treatment approaches for skin radiation injury are reviewed in this work.

Conclusions: Unfortunately, there is not sufficiently evidence for establishing a standard treatment to prevent or mitigate radiation cutaneous injury. Thus, continuous research is necessary to achieve effective therapies in this important health problem.

Keywords: Ionizing radiation, skin; acute effects; late effects; treatment; review

Introduction

Over recent years, there have been important accidental or intentional incidents of radiological and nuclear nature, which have shocked the world. Although such incidents are unusual, they have made us aware of the potentially devastating effects that they could cause. In case of release of radioactive material in a controlled environment a number of containment and management measures are normally available.

On the other hand, nuclear power plant disasters as Chernobyl accident in 1986 due to overheating nuclear reactor core, or more recently the Fukushima accident in 2011 as a result of damage caused by the tsunami in Eastern Japan, have caused two of the greatest environmental catastrophes of the history (Zhang et al. 2013).

Furthermore, the threat provoked by the exposure to high doses of radiation due to the terrorist use of radiologic weapons is an ongoing risk (Singh et al. 2015). However, the most dangerous risk to society is the use of weapons of mass destruction (WMDs) by terrorist groups against civilians. This has materialized the threat of “nuclear terrorism”. This type of weapon is classified as improvised nuclear devices (INDs) acting by a fission reaction, or radiological dispersal devices (RDDs), which cause the so-called "dirty" or radiological bomb. This term is currently used to refer explosive devices that spread radioactive elements in the atmosphere.

Another source of radiation exposure also exists. This source is related to the medical procedures and industry (Flynn and Goans 2006). In medical procedures such as nuclear medicine and radio-therapy although is targeted at a particular site, overlying tissues could be also affected.

The common element of all these above mentioned potential risks to human integrity is the ionizing radiation. Ionizing radiation refers to the radiation with enough energy that, during an interaction with an atom, is able to remove tightly bound electrons from the orbit of an atom, causing the atom to become charged or ionized (WHO 2016). There are different types of ionizing radiation. It could be composed of electromagnetic waves or particles (in order of increasing ability to penetrate materials): alpha particles, beta particles, gamma and x-rays, and neutrons (Figure 1) (Leikin and Mcfee 2007).

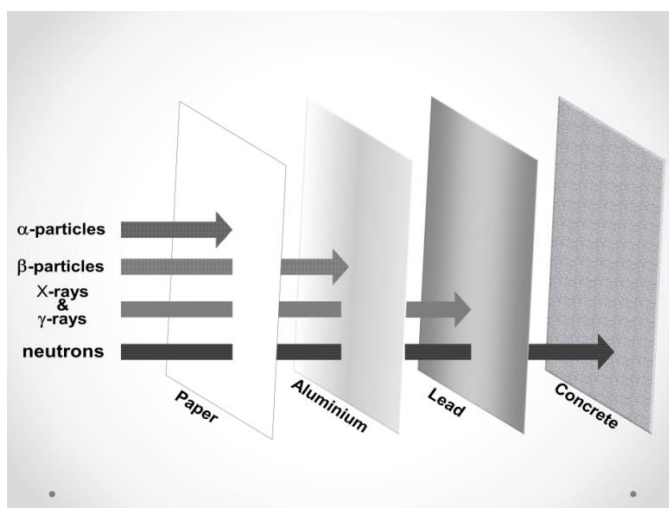


Figure 1. Types of ionizing radiation and their penetration ability.

Only a few agents have been approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) specifically for treating victims in a radiation-exposure scenario. Among them, granulocyte colony stimulating factors such as Neupogen[®] (filgrastim, Amgen, Inc.) (FDA 2015) and Neulasta[®] (pegfilgrastim, Amgen, Inc.) (Singh et al. 2016). These agents are aimed to mitigate the radiation damage in the hematopoietic system. Other agents approved by FDA are chelators. These, are used for chelating and/or reducing body burdens of internalized radionuclides are chelators, such as potassium iodide (ThyroShield), trisodium zinc diethylenetriaminepentaacetate (Zn-DTPA), trisodium calcium diethylenetriaminepentaacetate (Ca-DTPA) and prussian blue (ferric hexacyanoferrate) (Singh et al. 2016).

Besides bone marrow, the skin is one of the most easily affected tissues by ionizing radiation because of the existence of continuously proliferating and maturing cells (Prise and Saran 2011). Management of radiation skin effects might improve the therapeutic benefit of medical radiation therapy, as well as reduce the mortality expected in any RDD attack or radiological incident and/or accident (Ryan 2012). However, there are no agents particularly approved for skin injury caused by ionizing radiation. For this reason the main objective of this review is to offer a complete overview about current and possible future treatment strategies for skin radiation injury.

Radiation injury

Radiation injury appears as a result of the morphological and functional changes caused by the deposition of energy in the tissue (Olascoaga et al. 2008). Figure 2 schematizes the pathophysiology of the of radiation-induced skin damage. However, effect of radiation on humans varies among individuals depending on a number of factors including the following: distance from the source of exposure, the dose of exposure, the type of radiation, quantity of energy and type of tissue irradiated. Additionally, an individual may have been unaware of the radiation exposure until the

appearance of early injury signs. The 50% lethal dose (LD₅₀) radiation dose for humans is considered to be between 3 and 4Gy in the absence of supportive care and between 6 and 7 Gy when supportive care is provided. Individuals with body exposures higher than 10 Gy will not have chance of survival (Dainiak et al. 2011; DiCarlo et al. 2011; López and Martín 2011).

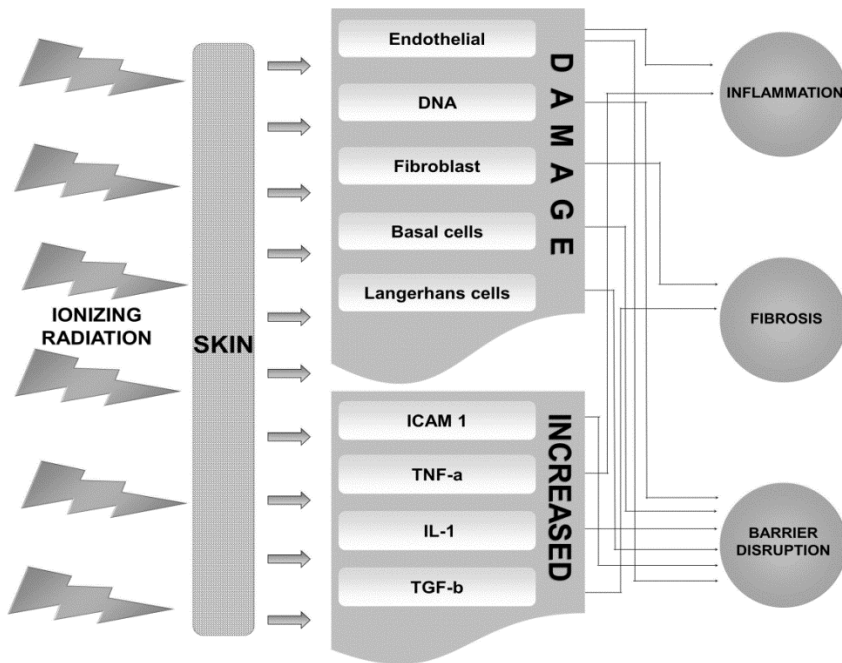


Figure 2. Physiopathology schema of radiation-induced skin damage. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM 1), tumor necrosis factor-alpha (TNF-a), interleukin-1 (IL-1), transforming growth factor beta (TGF-b).

Acute radiation syndrome (ARS), also known as radiation illness, is a collection of symptoms and signs caused by a high ionizing radiation exposure of a large portion or the whole body in a short period of time (Donnelly et al. 2010). Tissues most sensitive to radiation are those with rapidly dividing cells such as spermatocytes (testis), hematopoietic stem cells (bone marrow) and crypt (intestinal mucosa). The radiation damage to the cell can be exerted directly, in which the radiation attacks the DNA molecule directly, or indirectly, by which the radiation hits other important molecules of the cell (water, organic molecules, etc.). In the first case, the radiation causes important cell damage or the cell death. In the second, this action leads to free-radical formation. These free-radicals are highly reactive species with other important molecules for the cell survival included DNA. If this DNA damage (direct or indirect) is caused in one of the two strands (in the majority of cases), it could be repaired by DNA repair mechanism using the other strand as a template. However, if the damage is caused in both strands (only in a minority of cases), the repairing processes are

much less effective giving rise to chromosomes aberrations, and thus, anomalous cells or cell death.

The clinical syndromes of ARS based on differences in cellular sensitivity to ionizing radiation have been reported to affect skin, hematopoietic, gastrointestinal, and cerebrovascular systems (Chao 2007). On this basis, specialized literature classifies them in three classic syndromes of ARS: hematopoietic syndrome (doses > 1 Gy), gastrointestinal syndrome (doses > 12 Gy), and neurovascular syndrome (doses > 20-30 Gy). However, cutaneous injury caused by ionizing radiation exposure is not considered as a syndrome of ARS because it may appear without manifesting ARS symptoms (Singh et al. 2015). Each of these syndromes shows similar clinical pattern which can be divided into four stages: prodromal, latent, manifest illness, and recovery or death (Gourmelon et al. 2010).

On the other hand, chronic radiation syndrome occurs when an individual is exposed to ionizing radiation over an extended period of time to repeated small doses (Reeves and Ainsworth 1995). Symptoms of this type of syndrome are: skin atrophy, fibrous formation of the skin after previous burns, eye cataracts, etc. Cancer could occur after whole body radiation due to genetic damage and may appear at any time during life (Berger et al. 2006). Latent period for a solid form of cancer ranges from 20 to 30 years, while for leukemia is between 7 and 10 years (Berger et al. 2006).

Other concepts to be taken into account related to the ionized radiation injury are deterministic and stochastic effects. Deterministic effects are those resulted from a threshold dose under which no clinical effects occur. Contrary, stochastic effects are not associated with a threshold level, but with long-term exposure. Hence the probability of appearance increases as dose increases, so that, the effects may or may not occur. Other authors do not use these definitions. They use the terms haploclastic and polycyclic depending on the number of cells involved in these processes and basic mechanisms (Hulse and Mole 1982).

Skin epithelium

It is well-known the general features of skin. Skin is the largest organ of the human body with a surface of 2 m² approximately. Skin performs with a series of biological functions such as protection against the surrounding environment, thermoregulation, sensory perception, excretion and absorption.

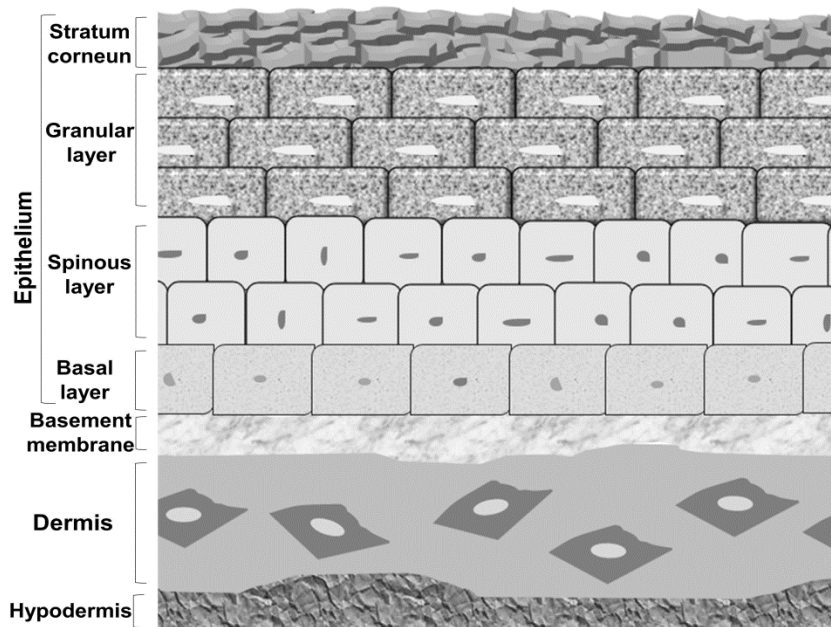


Figure 3. Diagrammatic representation of skin epithelial histology.

Figure 3 schematizes the main layers of skin. Dermis and epidermis are the two main layers of skin, which are separated by a dermal-epidermal junction protein thin layer called basement membrane. The epidermis is the outer region of human skin which comes from the embryotic ectoderm and contains no blood vessels. It consists of stratified squamous epithelium primarily composed of keratinocytes, and other types of cells such as melanocytes, Langerhans cells and Merkel cells. The lowest portion of the epidermis is the basal layer, which is in contact with the basement membrane (Larcher et al. 2007). The basal layer contains proliferating cells undergoing continuous division and provides a source of cells that move up through supra basal layers of the epidermis. Beneath the basement membrane is the dermis. The dermis, which is derived from mesoderm, is an underlying connective tissue that contains nerve and vascular networks, lymphatics, as well as epidermal appendages such as glands (sebaceous, endocrine and apocrine), hair follicles and nails. In both cases, sebaceous glands and hair follicles, proliferation takes place. The former in the basal layer of the sebaceous gland, and the latter in matrix cells of the hair bulb. Other types of cells in dermis are fibroblasts, macrophages and mast cells. Finally, the hypodermis is the connective and adipose tissue underlying the skin and located below the dermis. However, it is not actually considered as a part of skin.

Cutaneous radiation injury

The skin epithelium is a tissue with high rate of dividing cells (Prise and Saran 2011). In fact, epidermis is approximately renewed every 3 weeks. Therefore, skin is highly susceptible to radiation damage due to its self-renewal capacity, which is maintained

by different pools of skin stem cells (McQuestion 2011). Cutaneous radiation injury (CRI) is defined as the damage caused in skin and underlying tissues by exposure to a high dose of ionizing radiation (REMM 2011). The dose threshold for CRI varies widely according to parameters already mentioned. However, a range between 350 and 500 cGy has been proposed by medical literature (REMM 2011). CRI can also appear as acute (early effects) and chronic (late effects). The difference between these two effects in terms of periods of time lies in the proliferation velocity and reproductive cycles of the broad range of skin cell types affected (Dion et al. 1989).

It should be noted that reported literature envisages data from ionizing radiation exposure from accidental or therapeutic sources, and to a lesser extent, from studies of victims of major disasters such as Chernobyl or Fukushima. However, skin injuries of casualties at Hiroshima and Nagasaki in 1945 were caused by heat rather than ionizing radiation (Wiener and Barrett 1986).

Acute effects

Acute signs and symptoms of CRI occur within days to weeks. However, are dependent on the dose, in this way, the higher the dose the more quickly the appearance. Hence, transient erythema could appear after radiation exposures of ~2 Gy in hours. Faint erythema and epilation could appear after radiation exposures of ~8 Gy in 1 week. Defined erythema and hyperpigmentation could appear at exposure doses of ~15 Gy in 2-3 weeks. Dry desquamation can occur with exposures at ~22 Gy in 4 week, approximately. Moist desquamation can emerge at exposures of ~35 Gy in about 5 weeks, and ulceration at >40 Gy exposures in 6 weeks (Ryan 2012). Many authors and guidelines have proposed different stages for acute effects over time (Cervený et al. 1989; Barabanova 2001; Fliedner et al. 2001; Goans et al. 2001; Steinert et al. 2003; Vuong et al. 2004; Peter 2005; Bolderston et al. 2006; REMM 2011; AGH 2012). Three stages are accepted: prodromal stage (within hours of exposure), latent (1–2 days postexposure), and manifest illness stage (days to weeks post-exposure). In cases of beta radiation exposure, a stage called third wave of erythema is also added. According to these stages, acute signs and symptoms begin with transient and inconsistent erythema associated with itching and tingling and dysesthesias. These are followed by the latent phase, in which prodromal symptoms may stabilize or even improve. The duration of this stage is inversely proportional to the dose received. In the manifest illness phase, a second wave of erythema and slight edema could take place, hair loss, hyperpigmentation and other symptoms depending on the severity of injury that could vary from dry desquamation or ulceration to necrosis. The mentioned third wave erythema phase includes the following effects: new wave of erythema, blood vessels damage, and thus edema with increasing pain and change of color of the skin. New ulcers and necrosis could also appear (REMM 2011; CDCP 2017).

The severity of the damage and resulting symptoms may vary. There is no a common scoring scale internationally followed, quite the contrary. However, the most commonly used scoring system is the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) (NCI 2017). According to the last version of CTCAE the grade varies from 1 to 5. The associated skin injuries to each grade are reported in Table 1.

Table 1 Classification of acute radiation dermatitis. According to National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events Version 5 (NCI 2017).

Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Grade 5
Faint erythema or dry desquamation	Moderate to brisk erythema; patchy moist desquamation, mostly confined to skin folds and creases; moderate edema	Moist desquamation in areas other than skin folds and creases; bleeding induced by minor trauma or abrasion	Life-threatening consequences; skin necrosis or ulceration of full thickness dermis; spontaneous bleeding from involved site; skin graft indicated	Death

Other scoring systems such as Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG), the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) (Cox et al. 1995), the Skin Toxicity Assessment Tool (Berthelet et al. 2004), the Oncology Nursing Society (ONS) (Catlin-Huth et al. 2002), Radiation-Induced Skin Reaction Assessment Scale (RISRAS) (Noble-Adams 1999a, 1999b), the Medical Treatment Protocols for Radiation Accident Victims as a Basis for a Computerized Guidance System (METREPOL) (Douglas and Fowler 1976) and Skindex-16 (Chren et al. 2001) can be consulted in literature. Each one has a series of advantages and disadvantages. Although CTCAE and RTOG/EORTC systems are usually used, other scoring scales such as ONS and METREPOL provide higher varying scaling levels to represent the actual skin effects. The majority do not consider subjective aspects of skin damage such as pain and discomfort. Contrary, Late Effects Normal Tissues (LENT)-Subjective, Objective, Management, Analytic (SOMA) scale consider a record of the patients' symptoms (Routledge et al. 2003), or even the own opinion of the patients as in the case of Skindex-16, and not simply based on a simple observation of the health professionals.

Late effects

Late effects of radiation injury are those appearing weeks to years after exposure. It may be that the emergence of these effects is not always preceded by acute effects (Jaschke et al. 2017). These effects include an insidious and variable onset of symptoms such as delayed ulcers, fibrosis, atrophy, pigmentary changes, telangiectasia, loss of skin appendages and hair follicles, sebaceous and sudoriferous glands and the development of cutaneous malignancies such as skin tumors (Bray et al. 2016; Spalek 2016). Subcutaneous dystrophic calcification has also been associated with these late adverse effects (Mahomed et al. 2011). Specialized literature suggests that late effects are related to an imbalance of proinflammatory and profibrotic cytokines (Spalek 2016).

Resultados

Contrary to the case of acute effects the CTCAE does not consider a scoring scale to graduate the severity of the damage, in the case of late effects. However, the RTOG/EORTC addresses acute grading for both acute and late skin toxicities. Table 2 summarizes the RTOG/EORTC scoring schema (Cox et al. 1995).

Table 2 Radiation Therapy Oncology Group Foundation (RTOG) late radiation morbidity scoring schema.

Organ Tissue	Grade					
	0	1	2	3	4	5
Skin	None	Slight atrophy; Pigmentation change; Some hair loss	Patch atrophy; Moderate telangiectasia; Total hair loss	Marked atrophy; Gross telangiectasia	Ulceration	Death
	None	Slight induration (fibrosia) and loss of subcutaneous fat	Moderate fibrosis but asymptomatic Slight field contracture <10% linear reduction	Severe induration and loss of subcutaneous tissue Field contracture >10% linear measurement	Necrosis	Death

On the other hand, the risk of apparition of non-melanoma skin cancer increases some years after radiation exposure (Suárez et al. 2007). Particularly, carcinomas developing from keratinocytes (basal cell carcinomas, keratoacanthomas, and squamous cell carcinomas) are radiation-related tumors in skin (Karagas et al. 2007; Martin et al. 2016). However, it is not clear a direct relation between radiation exposure and melanoma incidence (Sugiyama et al., 2014).

Treatments

Medical treatment of patients who have been exposed to ionizing radiation (accidental or deliberate) is a complicated task because of the invisibility during the latent stage, and sometimes even markedly complex due to the patient himself is not conscious of the radiation exposure until the apparition of early signs (Ward et al. 2012). The management of irradiated patients will also depend on a series of factors sometimes classified as extrinsic and intrinsic factors. Extrinsic factors are those related to the radiation properties (dose, type, quality, etc.) and zone of exposure (area, volume, type, etc.). On the other hand, intrinsic factors are those associated with individual condition of each person in particular (age, sex, nutritional status, other diseases, etc.). Finally, treatments may be first of all classified as preventive or management strategies (Chan, Webster, et al. 2014), but currently there is not a standard approach for the prevention and treatment of radio-induced skin lesions.

Prevention of skin damage

Focusing on that radiation exposure coming from medical treatments, some products are used to minimize the skin damage prior radiation therapy. The vast majority are intended to provide moisturizing and anti-inflammatory properties in

order to prevent acute radiation skin reactions. In an attempt to schematize the reported alternatives to prevent skin damage after radiation exposure, in Table 3 are summarized different approaches. Firstly, they are classified according to the route of administration (topical or systemic). Among topical agents, literature reflects several strategies. Washing practices with water and soaps, and the use of adequate skin care products as well as dressings or films. Proper skin hygiene by washing is recommended, as well as the use of a lanolin-free hydrophilic cream to increase the skin moisture and maintain skin pliability (Table 3). Contrary, others authors claim that topical moisturizers, gels, emulsions, or dressings might produce a bolus effect if are applied shortly before exposure because it may increase the dose of radiation (Bernier et al. 2008; Zhu et al. 2016). The use of antiperspirants did not involve additional advantages nor disadvantages (Bennett 2009; Théberge et al. 2009; Watson et al. 2012). However, their use is recommended in order to maintain the normal socially accepted hygiene practices of patient providing psychosocial benefits (Wong et al. 2013). Di Franco et al. (2013) concluded that a good skin hydration can result in a positive effect on the skin tolerance. But really, there is a lack of consistency and no clinical evidence to support some skin care products that currently are being used for prevention of skin toxicity is available (Laffin and Smyth 2011; O'Donovan et al. 2015). The utilization of intensity-modulated radiotherapy is aimed to decrease the irradiation dose to healthy tissue. A few studies reported reduced skin toxicity using an intensity modulated radiation therapy versus conventional therapy in breast cancer treatment. However, this methodology is not yet widely used as daily routine by health services (Feight et al. 2011). More recently, it has been assayed in conjunction with other planning strategies (López Alfonso et al. 2018).

Among the wealth of reported prophylactic topical agents aimed to prevent or ameliorate the skin damage, the use of topical corticosteroids and acid creams (hyaluronic acid) seems to be more supported (Bolderston et al. 2006; Salvo et al. 2010). But, its use of is not routinely recommended because of undesirable side effects as thinning, moist desquamation of risk of bacterial infections (Butcher and Williamson 2012).

Non-steroidal anti-inflammatories, mainly trolamine has been proposed by numerous authors (Table 3), but only one study seems to report real improvement (Abbas et al. 2012). In this line, the use of plant derivatives as Aloe vera or Calendula-based formulations have additionally been inconclusive (Williams et al. 1996; Heggie et al. 2002; Pommier et al. 2004; Sharp et al. 2013), as in the case of sucralfate (Evensen et al. 2001; Wells et al. 2004), the use of Aloe vera has even been not recommended by the MASCC Skin Toxicity Study Group (Wong et al., 2013). Other prophylactic agents with topical application are antimicrobials (sulfadiazine), vasoconstrictors (epinephrine), acids (hyaluronic and ascorbic acids), and others agents (miscellaneous). The immense majority of published works ascertain that there is insufficient evidence to recommend specific topical agents. Indeed in some cases like Calendula, its use is not recommended (Chan et al. 2012).

Table 3 Reported agents for prevention skin damage derived from radiation exposure.

Route	Group	Agent	Reference		
Topical	Washing practices	Water/soap	Roy, et al. 2001 Campbell and Illingworth 1992 Westbury et al. 2000		
			Ultra Emu Oil [®] Theta-Cream [®] Allantoin Solaris lotion	Rollmann et al. 2015 Röper et al. 2004 Chan, Mann, et al. 2014 Matcyevesky et al. 2007	
	Skin care products	Hydroactive colloid gel	Censabella et al. 2017 Censabella et al. 2014 Glover 2017		
			Urea	Momm et al. 2003 Pardo Masferrer et al. 2010	
			Phospholipid-based cream Xonrid [®] gel	Merchant et al. 2007 Iacovelli et al. 2017	
	Dressings	Polyurethane dressing	Schmeel et al. 2018 Aquino-Parsons et al. 2010		
		Silver leaf nylon Gauze	Niazi et al. 2012 Vuong et al. 2004 Kouvaris et al. 2001		
	Films	Polyurethane film Acrylate terpolymer No-sting barrier film Adhesive polymer	Herst et al. 2014 Wooding et al. 2018 Graham et al. 2013 Graham et al. 2004 Hazuka et al. 1997		
			Intensity modulated radiotherapy	DeLand et al. 2007 Fife et al. 2010 Robijns et al. 2018 Freedman et al. 2006 Freedman et al. 2009 Pignol, et al. 2008	
			Steroidal anti-inflammatory	Hydrocortisone	Meghrajani et al. 2016 Schmuth et al. 2002
				Betamethasone	Farhan et al. 2003. Omidvari et al. 2007 Ulff et al. 2017
	Beclomethasone	Shukla et al. 2006			
	Non-steroidal anti-inflammatory	Trolamine Indomethacin	Fisher et al. 2000 Szumacher et al. 2001 Fenig et al. 2001 Ren et al. 2005 Elliott et al. 2006 Ribet et al. 2008 Gosselin et al. 2010 Abbas et al. 2012 Milas et al. 1992		

	Olive oil	Olsen et al. 2001
	Chamomile	Williams et al. 1996
	Calendula	Cui et al. 2015
	Wheatgrass	Maiche et al. 1991
	Lianbai liquid	Pommier et al. 2004
	Silymarin	Sharp et al. 2013
	Ginkgo biloba/green tea extracts*	Wheat et al. 2006
	Hypericum perforatum and Azadirachta Indica oil	Ma et al. 2007
	Curcumin/esculentoside	Becker-Schiebe et al. 2011
	Green thea*	Dal Belo et al. 2011
Antimicrobials	Sulfadiazine	Franco et al. 2017
Vasoconstrictors	Epinephrine*	Rao, Hegde, Baliga-Rao, Lobo, et al. 2017
		Okunieff et al. 2006
		Xiao et al. 2006
		Guo et al. 2010
		Hu et al. 2011
		Hemati et al. 2012
		Fahl 2016
		Liguori et al. 1997
		Pinnix et al. 2012
		Kirova et al. 2011
		Primavera et al. 2006
		Leonardi et al. 2008
		Elmashad et al. 2015
		Halperin et al. 1993
		Maiche et al. 1994
		Evensen et al. 2001
		Wells et al. 2004
		Nasser et al. 2017
		Miko Enomoto et al. 2005
		Kong et al. 2013
		Løkkevik et al. 1996
		Ertekin et al. 2004
		Lin et al. 2006
		Gujral et al. 2001
		Dale et al. 2001
		Kaul et al. 1999
		Aygenç et al. 2004
		Magnusson et al. 2009
		Lievens et al. 1998
		Kouvaris et al. 2007
		Dunst et al. 2000
		Holler et al. 2009
		Cakir et al. 2014
		Bairati et al. 2005
		Martella et al. 2010

* Studies not done in humans

Regarding systemic agents for prevention of radiation skin damage have been widely reported (Table 3). Among them, sucralfate, amifostine and pentoxifylline seem to be the most accepted radioprotective agents. Numerous authors and

guidelines consider that current evidence is not sufficient to support the recommendation of any other systemic agent for prevention, and thus further research is required, because the potential risks outweigh their benefits. Furthermore, the preventive skin damage of other agents such as melatonin, an endogenous hormone mainly synthesized and secreted by the pineal gland, and vitamin E has also been reported (Sarma and Kesavan 1993; Kim et al. 2001; Hussein et al. 2005). However, there is not sufficient evidence or clinical trials aimed to investigate this fact in the literature.

Other approach in the prevention of radiation exposure is the gene therapy for radioprotection. It involves the gene transfer to specific tissues and the delivery of a therapeutic gene (antioxidant gene, growth factor gene, etc.) through an appropriate vector. In this context, antioxidant proteins and growth factors have been studied. Super oxide dismutase (SOD) reduces the creation of superoxide and other reactive oxygen species by catalyzing the conversion of superoxide (O_2^-) into hydrogen peroxide and oxygen, and catalase reduces the creation of hydrogen peroxide by catalyzing the decomposition of hydrogen peroxide into water and oxygen. SOD and catalase gene therapy has been assessed to prevent radiation damage. Fibroblast, vascular endothelial and keratinocyte growth factors have also been evaluated (Everett and Curiel 2015). However, the main investigation field is currently focused on the development of effective vectors to target the therapeutic gene to desired tissues.

In summary, after the evaluation of the great variety of agents to prevent the skin damage induced by ionizing radiation there is not a general support or consensus for a specific product. This lack of consensus leads each department to use a different intervention to prevent radiation-induced skin reactions and only a few have published some general indications.

Management of skin damage

Management guidelines for radiation skin injury are those already commented (Bolderston et al. 2006; Feight et al. 2011; Wong et al. 2013; Chan, Webster, et al. 2014). The majority of treatments already commented as preventive interventions are also used for the management of radiation-induced skin reactions with similar results. In order to review the different strategies for the intervention in the management of radiation skin effects, these have been classified in the following sections.

Acute cutaneous reactions

Different treatments of skin damage derived from radiation exposure are depicted in Table 4. Acute cutaneous reactions are classified in 4 different grades. Grade 1 treatment is usually similar to that already discussed in the previous section. Grade 2 and 3 treatments against moist desquamation should be continued throughout all the acute phase. One of the most reported therapy is the use of dressings which have demonstrated some encouraging results. Several types of dressing have been proposed, hydrogel dressings, silicone dressings such as Mepilex[®], silver based dressings, even impregnated gauzes (Kouvaris et al. 2001). The main goals in the primary wound care are to maintain clean preventing from infections and to preserve the healthy tissue avoiding new tissue damage. Among proposed dressing, literature seems to highlight specialized soft silicone-based dressings.

Table 4 Reported agents for treatment of acute skin damage derived from radiation exposure.

	Injury	Group	Agent	Reference			
Acute cutaneous reactions	Grade 1	Erythema/dry desquamation	General prevention measures	See Table 3			
	Grade 2 and Grade 3	Moist desquamation	Dressings	Hydrogel dressings	Gollins et al. 2008 Macmillan et al. 2007 Mak et al. 2000		
				Hydrocolloid dressings	Margolin et al. 1990		
				Polyurethane dressing	Diggelmann et al. 2010 Zhong et al. 2013 Paterson et al. 2012		
				Silver based dressings Gauze impregnated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	Vavassis et al. 2008 Kouvaris et al. 2001		
				Steroids	Prednisolone	Halnan 1962 Bostrom et al. 2001	
					Mometasone furoate	Miller et al. 2011 Hindley et al. 2014	
					Betamethasone	Ulf et al. 2013	
				Miscellaneous	Antibiotic treatment if infections are present	Silver sulfadiazine	Hemati et al. 2012
						Sucralfate cream	Delaney et al. 1997
							Honey
	Grade 4	Wound care or wound specialist management	Surgical treatment	Superoxide dismutase	Manzanas Garcia et al. 2008		
				Autologous Stem Cells	Lataillade et al. 2007 Bey et al. 2010		

The use of corticosteroids is not supported despite showing optimal effects in some studies (Halnan 1962; Bostrom et al., 2001; Miller et al., 2011; Ulf et al., 2001; Hindley et al., 2014). It is due to the potential skin thinning effect that may favor the appearance of opportunistic infections (Barnes 2006). In these conditions topical antimicrobials, like sulfadiazine silver, as well as antifungal agents like clotrimazole (Soriano-Ruiz et al. 2019) are recommended (Olascoaga et al. 2008). Similarly, in the case of preventive treatments the effectiveness of other agents, as could be sucralfate cream (Delaney et al. 1997), honey (Robson and Cooper, 2009) and superoxide dismutase (Manzanas García et al., 2008), is not supported by available data (Chan, Webster, et al. 2014). In the case of the Grade 4 with severe skin reactions, skin

necrosis and ulcerations should be treated by surgical treatments (Lataillade et al. 2007) and autologous stem cells therapy (Bey et al. 2010). A specific section about stem cells therapy aimed for radiation skin injury is addressed below.

It is also reasonable to take into consideration that a combined radiation and burn injury is likely to occur in determined mass casualty radiation emergency events. In these conditions, post-injury complications are even worse than the same dose of radiation alone, although radiation and burn injuries have different time-dependent pathophysiological mechanisms (Palmer et al, 2011). Current medical management of radiation combined injury involves normal supportive therapy with administration of fluids/electrolytes, blood products and prophylactic antibiotics, and besides an individual supportive therapy with specific blood products or stem cells and cytokines (DiCarlo et al. 2011).

Chronic cutaneous reactions

Chronic radiation reactions are complicated to treat injuries that need specific treatments and in this context they are being addressed individually in this review. In Table 5 are reviewed the reported management of these late cutaneous effects of radiation.

Table 5 Reported agents for treatment of late skin damage derived from radiation exposure.

	Injury	Group	Agent	Reference	
Chronic cutaneous reactions	Telangiectasias	Laser therapy	pulsed-dye laser	Lanigan and Joannides 2003	
				Nymann et al. 2009 Rossi et al. 2014	
	Dermatitis			Curcumin	Ryan et al. 2011
				Pravastatin*	Holler et al. 2009
	Chronic ulcerations and wounds	Dressings		Silver-based	Hymes et al. 2006.
				tetrachlorodecaoxide	Parikh et al. 2016
		Laser therapy		Low-intensity helium laser	Schindl et al. 2000
					Growth factors
			fibroblast growth factor	Iervolino et al. 2013 Hom et al. 2005 Kinoshita et al. 2012	
				Fibrosis	Laser therapy
antioxidants		Fractional CO ₂ laser	MGH 2013		

		Gothard et al. 2004 Delanian et al. 2005 Delanian et al. 1994 Benyahia et al. 1996 Campana et al. 2004 Manzanas Garcia et al. 2008 Horton et al. 2013
	Superoxide dismutase	
Hyperbaric oxygen	Quercetin*	Carl et al. 2001 Pritchard et al. 2001 Gothard et al. 2004 Teas et al. 2004
Cytokines Inhibitors	Interferon-gamma	Peter et al. 1999 Gottlober et al. 2001
	halofuginone*	Xavier et al. 2004 Nagler et al. 2007
	phenylbutyrate, trichostatin A, and valproic acid	Chung et al. 2004
	Smad3 protein inhibitor*	Lee et al. 2010

* Studies not done in humans

Telangiectasias and dermatitis. Telangiectasia is the dilation of small vessels under the skin or mucosal surface commonly named as spider veins. Although this physical manifestation is not too serious it might cause some psychological distress for the patient. Severe cases may result in bleeding. The laser therapy with pulse dye laser is generally the proposed treatment (Lanigan and Joannides 2003; Nymann et al. 2009; Rossi et al. 2014). There is very little evidence for its recommendation in radiation injury (Wong et al. 2013). However, nowadays it is often used in esthetic medicine and cosmetic interventions (Spalek 2016).

The appearance of chronic dermatitis is other frequent effect of continuous radiation. Curcumin, a potent antioxidant and anti-inflammatory agent, has been proposed for the treatment of severe radiation-induced dermatitis (Okunieff et al. 2006; Ryan et al. 2014).

Regarding vascular dysfunction events after radiation exposure of skin, a study reporting the use of pravastatin suggests that it may limit the initiation and the progression of skin lesions after radiation by increasing endothelial nitric oxide synthase (Holler et al. 2009).

Chronic ulcerations and wounds. The wound care of chronic ulcerations and wounds derived from radiation injury should follow the general procedures in wound care (Hymes et al. 2006). The administration of topical antiseptics, such as silver sulfadiazine, povidone, even systemic antibiotics may be recommended for prevent infections (Drosou et al. 2003). The management guidelines of chronic wounds and ulcerations derived from radiation report the use of dressings. These dressings do not adhere to wound protecting from environment and can absorb exudates. These dressings can also contain antimicrobial agents such as silver derivatives (Hymes et al. 2006), macrophage-activating drugs such as tetrachlorodecaoxide (Parikh et al. 2016),

or autolytic agents to facilitate debridement of necrotic tissue promoting healing (Ramundo and Gray 2008). Furthermore, the use of laser therapy has also been reported. Concretely, the use of low-intensity Helium-neon laser irradiation with improved results (Schindl et al. 2000).

Another approach for the management of chronic ulcerations is that focused on the topical administration of growth factors, being the platelet-derived growth factor the most reported (Mustoe et al. 1989; Wollina et al. 2001; Iervolino et al. 2013), as well as fibroblast growth factor (Hom et al. 2005; Kinoshita et al. 2012). Despite this, the use of growth factors in wounds derived from radiation should be evaluated because in many cases the patient is under oncologic treatment and these factors stimulate the tumor growth (Jacobson et al. 2017). Nevertheless, in some severe cases of deep ulceration and/or necrosis, only surgical procedures can be applied by removing necrotic tissue and reconstruction with skin grafts and flaps or skin substitutes (Gonyon and Zenn 2003; Fujioka 2014).

Cutaneous fibrosis. Skin fibrosis is arguably the worst late radiation effect, usually considered irreversible. Ionizing radiation ultimately triggers the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts leading to an excess of collagen and extracellular matrix components that form fibers in the cutaneous and subcutaneous tissue.

A wide variety of treatments have been recommended for radiation-induced fibrosis. Some of them support a physical therapy based on deep massage and motion exercises to maintain mobility. Laser therapy has also been tested by some authors for radiation-induced fibrosis, including pulse dye laser and fractional CO₂ laser (MGH 2013), as well as this laser technique combined with epidermal grafting (Tran et al. 2015).

The use of pentoxifylline a methylxanthine derivative alone or in combination with tocopherol (Vitamin E) has been shown to improve tissue compliance (Table 5). However, studies in the opposite sense also exist, which reported gastrointestinal side effects (Famoso et al. 2017). Other antioxidants as superoxide dismutase have also been assayed. This is an endogenous scavenging enzyme with significant reduction of long term radiation-induced breast fibrosis (Delanian et al. 1994). Similarly, other studies also suggest greater degree of local comfort of patients treated with topical superoxide dismutase (Benyahia et al. 1996; Campana et al. 2004; Manzanar García et al. 2008). A study evaluated quercetin for the reduction of radiation-induced cutaneous fibrosis in animals (Horton et al. 2013), but further evidence is needed.

The benefit of hyperbaric oxygen therapy in the treatment of radiation-induced cutaneous fibrosis is not clearly demonstrated (Pasquier et al. 2004), although some other studies have described pain relief and reduction of erythema and edema (Carl et al. 2001; Pritchard et al. 2001; Gothard, Stanton, et al. 2004; Teas et al. 2004). Equally, Interferon gamma has been proposed as treatment in radiation-induced cutaneous fibrosis. Unfortunately, there is very little literature of its use (Peter et al. 1999). Nevertheless, there is a dimerized soluble cytokine which is licensed for patient with chronic granulomatous disease (Gottlober et al. 2001).

Other approach of cutaneous radiation-induced fibrosis treatment is the administration of anti-transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) because numerous cytokines, including TGF- β 1, are increased within irradiated tissue (Muller and Meineke 2007). Conversely, halofuginone was used as an inhibitor of this TGF- β 1

with positive effects on radiation-induced fibrosis in an animal model (Xavier et al. 2004). Other study demonstrated that halofuginone inhibits collagen gene expression in mice, reducing fibrosis (Nagler et al. 2007). Other chemicals such as phenylbutyrate and valproic acid which are histone deacetylase inhibitors have also been reported to be reduce the generation of radiation-induced cytokines such as TGF- β 1, TGF- β 2 and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), with potential use against fibrosis (Chung et al. 2004). In this context, inhibitors of the Smad3 protein involved in the regulation of TGF- β signaling has also been evaluated (Lee et al. 2010), although further studies need to be conducted (Segaert and Van Cutsem 2005).

Finally, as mentioned in the previous section, the most severe cases which cannot be managed by other methods, surgical procedures should be addressed.

Stem cell therapy

A special mention should also be made of stem cell therapy. The efficacy of stem cell treatment has been reported in several types of skin injuries including radiation-induced.

Mesenchymal or stromal stem cells (MSCs) have the capacity to proliferate and differentiate *in vitro* into diverse cells of the mesoderm-type lineages, as osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, myocytes, and fibroblasts, among others (Galvez et al. 2014). In addition to bone marrow, MSCs can be isolated from skeletal muscle, connective tissue, human trabecular bones, adipose tissue, periosteum, fetal blood, liver, umbilical cord and umbilical cord blood (Galvez et al. 2014). This cellular approach for radiation-induced skin injury has been proposed as the reference treatment by the International Atomic Energy Agency (IAEA 2009). MSCs play an important role in skin regenerative processes (Galvez-Martín et al. 2017). Their use in humans has been reported with optimal results, using allogenic fibroblast-like bone marrow MSCs in patient with extensive skin thermal burn (Rasulov et al. 2005). In other case, a combined numerical dosimetry-guided surgery with cellular therapy using autologous bone marrow derived MSCs was applied to skin burn caused by accidental exposition to a radioactive source resulting in amelioration of pain and improved healing progression (Lataillade et al. 2007). Optimal results were also obtained with a similar strategy by Bey et al. (2010) in a radiation lesion located on the arm treated with autologous MSCs from bone marrow, and Kotenko et al. (2012) in two patients with local radiation injury treated with MSCs from autologous bone marrow in skin wounds located in the interscapular region of the first patient and in the leg of the second.

Furthermore, cellular therapy based on adipose derived MSCs is widely reported to be the most promising because of a number of advantages: ease of isolation and source abundance, anti-inflammatory, anti-apoptotic and pro-angiogenic effects (Nauta et al. 2013), these MSCs also possess higher proliferative ability and a lower senescence than other types of stem cells (Izadpanah et al. 2006). Studies reporting the use of adipose derived MSCs have also demonstrated to be very effective in humans. In a study, radiated skin of patients was treated with purified autologous lipoaspirate (adipose-derived adults MSCs) using an injection cannula (Rigotti et al. 2007). Optimal results at clinical and histological level were reported. Likewise, Kølle et al. (2013) also demonstrated that an autologous graft enriched with adipose-

derived MSCs injected by a cannula generated higher amount of newly formed connective tissue and lower necrosis than the control graft.

Depending on therapeutic purposes, MSCs can be implanted *in vivo* via either systemic or local approaches. In principle, local administration would be the best route to their use in skin healing and regeneration by injection. However, rather than simply administrating MSCs into the target site, MSCs are often seeded into biomaterials-based scaffolds which should provide an microenvironment that mimics the *in vivo* extracellular matrix in a number of important aspects for cells morphogenesis, differentiation, proliferation, adhesion and migration (Dvir et al. 2011). Akita et al. (2010a, 2010b) reported experimental treatments using artificial skin as scaffolds for adipose derived MSCs in chronic radiation wounds improving tissue regeneration.

Conclusion an future trends

Despite the high prevalence of radiation-induced skin injury, the management of this remains a difficult medical challenge because there is not a standard treatment. A number of management guidelines have proposed several preventive and curative care strategies, but a multidisciplinary approach is needed to improve current therapies providing a framework for preventing and reducing symptoms of cutaneous radiation. For this reason, the research of novel treatments accompanied by clinical trials is necessary to provide more evidence. Among these new treatments, MSCs seem to be the therapeutic strategy with the best promising results. The enhancement of this therapeutic approach by genetic modifications, the use of biomaterials as scaffolds and preconditioning actions to support its optimization are the research lines in the near future.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (RTC-2016-5451-1) through the European Regional Development Funds (ERDF).

Notes on contributors

José L. Soriano, BSc. is a Postgraduate student, Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain.

Ana C. Calpena, PhD, is Professor of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Eliana B. Souto, PhD, is Professor of Pharmaceutical Technology, Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Coimbra, Portugal.

Beatriz Clares, PhD, is Professor of Pharmaceutical Technology, Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain.

ORCID

Ana C. Calpena: <https://orcid.org/0000-0002-4989-4821>

Eliana B. Souto: <https://orcid.org/0000-0002-9737-6017>

Beatriz Clares: <https://orcid.org/0000-0001-6126-7890>

References

- Abbas H, Bensadoun RJ. 2012. Trolamine emulsion for the prevention of radiation dermatitis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Support Care Cancer*. 20(1):185–190.
- Akita S, Akino K, Hirano A, Ohtsuru A, Yamashita S. 2010a. Mesenchymal stem cell therapy for cutaneous radiation syndrome. *Health Phys*. 98(6):858–862.
- Akita S, Akino K, Hirano A, Ohtsuru A, Yamashita S. 2010b. Noncultured autologous adipose-derived stem cells therapy for chronic radiation injury. *Stem Cells Int*. 2010:532704.
- Aquino-Parsons C, Lomas S, Smith K, Hayes J, Lew S, Bates AT, Macdonald AG. 2010. Phase III study of silver leaf nylon dressing vs standard care for reduction of inframammary moist desquamation in patients undergoing adjuvant whole breast radiation therapy. *J Med Imaging Radiat Sci*. 41(4):215–221.
- [AGH] Australian Department of Health. 2012. Australian clinical guidelines for radiological emergencies. Canberra: Department of Health. [accessed 2018 May 28]:[154 p.].
<http://www.health.gov.au/internet/publications/publishing.nsf/Content/ohp-radiological-toc~ohp-radiological-20-app-e~ohp-radiological-20.01-cutaneous>.
- Aygenç E, Celikkanat S, Kaymakci M, Aksaray F, Ozdem C. 2004. Prophylactic effect of pentoxifylline on radiotherapy complications: a clinical study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 130(3):351–356.
- Bairati I, Meyer F, Gélinas M, Fortin A, Nabid A, Brochet F, Mercier JP, Têtu B, Harel F, Abdous B, et al. 2005. Randomized trial of antioxidant vitamins to prevent acute adverse effects of radiation therapy in head and neck cancer patients. *J Clin Oncol*. 23(24):5805–5813.
- Barabanova AJ. 2001. Local radiation injury. In: Gusev IA, Guskova AK, Mettler FA Jr, editors. *Medical management of radiation accidents*. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press; p. 223–240.
- Barnes PJ. 2006. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol*. 148(3):245–54.
- Becker-Schiebe M, Mengs U, Schaefer M, Bulitta M, Hoffmann W. 2011. Topical use of a silymarin-based preparation to prevent radiodermatitis. *Strahlenther Onkol*. 187:485–491.
- Bennett C. 2009. An investigation into the use of a non-metallic deodorant during radiotherapy treatment: a randomised controlled trial. *J Rad in Practice*. 8(1):3–9.
- Benyahia B, Campana F, Perdereau B, Gez E, Fourquet A, Magdelenat H. 1996. The effects of superoxide dismutase topical treatment on human skin radiofibrosis: a pathological study. *Breast*. 5(2):75–81.
- Berger ME, Christensen DM, Lowry PC, Jones OW, Wiley AL. 2006. *Medical management of radiation*

- injuries: current approaches. *Occup. Med. (Lond)*. 56(3):162–172.
- Bernier J, Bonner J, Vermorken JB, Bensadoun RJ, Dummer R, Giralt J, Kornek G, Hartley A, Mesia R, Robert C, et al. 2008. Consensus guidelines for the management of radiation dermatitis and coexisting acne-like rash in patients receiving radiotherapy plus EGFR inhibitors for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol*. 19(1):142–149.
- Berthelet E, Truong PT, Musso K, Grant V, Kwan W, Moravan V, Patterson K, Olivotto IA. 2004. Preliminary reliability and validity testing of a new Skin Toxicity Assessment Tool (STAT) in breast cancer patients undergoing radiotherapy. *Am J Clin Oncol*. 27:626–631.
- Bey E, Prat M, Duhamel P, Benderitter M, Brachet M, Trompier F, Battaglini P, Ernou I, Boutin L, Gourven M, et al. 2010. Emerging therapy for improving wound repair of severe radiation burns using local bone marrow-derived stem cell administrations. *Wound Repair Regen*. 18(1):50–58.
- Bolderston A, Lloyd NS, Wong RK, Holden L, Robb-Blenderman L. 2006. The prevention and management of acute skin reactions related to radiation therapy: a systematic review and practice guideline. *Support Care Cancer*. 14(8):802–817.
- Bostrom A, Lindman H, Swartling C, Berne B, Bergh J. 2001. Potent corticosteroid cream (mometasone furoate) significantly reduces acute radiation dermatitis: results from a double-blind, randomized study. *Radiother Oncol*. 59(3):257–265.
- Bray FN, Simmons BJ, Wolfson AH, Nouri K. 2016. Acute and chronic cutaneous reactions to ionizing radiation therapy. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 6(2):185–206.
- Butcher K, Williamson K. 2012. Management of erythema and skin preservation; advice for patients receiving radical radiotherapy to the breast: a systematic literature review. *J Radiother Pract*. 11(1):44–54.
- Cakir ZU, Demirel C, Ugurlu P, Saruhan BG, Ketani S, Seker U, Zincircioglu SB. 2014. Radioprotective effects of melatonin on the skin histology in the rat. *J Int Med Res*. 7(3):73–77.
- Campana F, Zervoudis S, Perdereau B, Gez E, Fourquet A, Badiu C, Tsakiris G, Koulaloglou S. 2004. Topical superoxide dismutase reduces post-irradiation breast cancer fibrosis. *J Cell Mol Med*. 8(1):109–116.
- Campbell IR, Illingworth MH. Can patients wash during radiotherapy to the breast or chest wall? A randomized controlled trial. *Clin Oncol*. 1992;4:78–82.
- Carl UM, Feldmeier JJ, Schmitt G, Hartmann KA. 2001. Hyperbaric oxygen therapy for late sequelae in women receiving radiation after breast-conserving surgery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 49(4):1029–1031.
- Catlin-Huth C, Haas ML, Pollock V. 2002. Radiation therapy patient care record: a tool for documenting nursing care. Pittsburgh (PA): Oncology Nursing Society.
- Censabella S, Claes S, Orlandini M, Braekers R, Thijs H, Bulens P. 2017. Efficacy of a hydroactive colloid gel versus historical controls for the prevention of radiotherapy-induced moist desquamation in breast cancer patients. *Eur J Oncol Nurs*. 29:1–7.
- Censabella S, Claes S, Orlandini M, Braekers R, Thijs H, Bulens P. 2014. Retrospective study of radiotherapy-

- induced skin reactions in breast cancer patients: reduced incidence of moist desquamation with a hydroactive colloid gel versus dexpanthenol. *Eur J Oncol Nurs.* 18(5):499–504.
- [CDCP] Centers for Disease Control and Prevention (US). 2017. Cutaneous radiation injury (CRI): a fact sheet for clinicians. Washington (DC): Department of Health and Human Services. [accessed 2018 May 6]:[16 p.]. <https://emergency.cdc.gov/radiation/pdf/cri.pdf>.
- Cervený TJ, Mac Vittie TJ, Young RW. 1989. Textbook of military medicine; Part 1, warfare, weaponry, and the casualty: acute radiation syndrome in humans. Falls Church (VA): TMM Publications, Office of the Surgeon General. p.17–36
- Chan RJ, Larsen E, Chan P. 2012. Re-examining the evidence in radiation dermatitis management literature: an overview and a critical appraisal of systematic reviews. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 84(3): 357–362.
- Chan RJ, Mann J, Tripcony L, Keller J, Cheuk R, Blades R, Keogh S, Poole C, Walsh C. 2014. Natural oil-based emulsion containing allantoin versus aqueous cream for managing radiation-induced skin reactions in patients with cancer: a phase 3, double-blind, randomized, controlled trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 90:756–764.
- Chan RJ, Webster J, Chung B, Marquart L, Ahmed M, Garantziotis S. 2014. Prevention and treatment of acute radiation-induced skin reactions: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Cancer.* 14:53.
- Chao NJ. 2007. Accidental or intentional exposure to ionizing radiation: biodosimetry and treatment options. *Exp Hematol.* 35(4 Suppl 1):24–27.
- Chren MM, Lasek RJ, Sahay AP, Sands LP. 2001. Measurement properties of Skindex-16: a brief quality-of-life measure for patients with skin diseases. *J Cutan Med Surg.* 5(2):105–110.
- Chung YL, Wang AJ, Yao LF. 2004. Antitumor histone deacetylase inhibitors suppress cutaneous radiation syndrome: implications for increasing therapeutic gain in cancer radiotherapy. *Mol Cancer Ther.* 3(3):317–325.
- Cox JD, Stetz J, Pajak TF. 1995. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 31:1341–1346.
- Cui Z, Xin M, Yin H, Zhang J, Han F. 2015. Topical use of olive oil preparation to prevent radiodermatitis: results of a prospective study in nasopharyngeal carcinoma patients. *Int J Clin Exp Med.* 8(7):11000–11006.
- Dainiak N, Gent RN, Carr Z, Schneider R, Bader J, Buglova E, Chao N, Coleman CN, Ganser A, Gorin C, et al. 2011. Literature review and global consensus on management of acute radiation syndrome affecting nonhematopoietic organ systems. *Disaster Med Public Health Prep.* 5(3):183–201.
- Dal Belo SE, Gaspar LR, Maia Campos PM. 2011. Photoprotective effects of topical formulations containing a combination of Ginkgo biloba and green tea extracts. *Phytother Res.* 25(12):1854–1860.
- Dale PS, Tamhankar CP, George D, Daftary GV. 2001. Co-medication with hydrolytic enzymes in radiation

- therapy of uterine cervix: evidence of the reduction of acute side effects. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2001;47(Suppl): 29–34.
- DeLand MM, Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG. 2007. Treatment of radiation-induced dermatitis with light-emitting diode (led) photomodulation. *Lasers Surg Med.* 39(2):164–168.
- Delaney G, Fisher R, Hook C, Barton M. 1997. Sucralfate cream in the management of moist desquamation during radiotherapy. *Australas Radiol* 41(3):270–275.
- Delanian S, Baillet F, Huart J, Lefaix JL, Maulard C, Housset M. 1994. Successful treatment of radiation-induced fibrosis using liposomal Cu/Zn superoxide dismutase: clinical trial. *Radiother Oncol.* 32(1):12–20.
- Delanian S, Porcher R, Rudant J, Lefaix JL. 2005. Kinetics of response to long-term treatment combining pentoxifylline and tocopherol in patients with superficial radiation-induced fibrosis. *J Clin Oncol.* 23(34):8570–8579.
- Di Franco R, Sammarco E, Calvanese MG, De Natale F, Falivene S, Di Lecce A, Giugliano FM, Murino P, Manzo R, Cappabianca S, et al. 2013. Preventing the acute skin side effects in patients treated with radiotherapy for breast cancer: the use of corneometry in order to evaluate the protective effect of moisturizing creams. *Radiat Oncol.* 8:57.
- DiCarlo AL, Maher C, Hick JL, Hanfling D, Dainiak N, Chao N, Bader JL, Coleman CN, Weinstock DM. 2011. Radiation injury after a nuclear detonation: medical consequences and the need for scarce resources allocation. *Disaster Med Public Health Prep.* 5(Suppl 1):S32–S44.
- Diggelmann KV, Zytovicz AE, Tuaine JM, Bennett NC, Kelly LE, Herst PM. 2010. Mepilex Lite dressings for the management of radiation-induced erythema: a systematic inpatient controlled clinical trial. *Br J Radiol.* 83(995):971–978
- Dion MW, Hussey DH, Doornbos JF, Vigliotti AP, Wen BC, Anderson B. 1990. Preliminary results of a pilot study of pentoxifylline in the treatment of late radiation soft tissue necrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 19(2):401–407.
- Dion MW, Hussey DH, Osborne JW. 1989. The effect of pentoxifylline on early and late radiation injury following fractionated irradiation in C3H mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 17:101–107.
- Donnelly EH, Nemhauser JB, Smith JM, Kazzi ZN, Farfán EB, Chang AS, Naeem SF. 2010. Acute radiation syndrome: assessment and management. *South Med J.* 103:541–546.
- Douglas BG, Fowler JF. 1976. The effect of multiple small doses of X rays on skin reactions in the mouse and a basic interpretation. *Radiat Res.* 178(2):125–138.
- Drosou A, Falabella A, Kirsner RS. 2003. Antiseptics on wounds: an area of controversy. *Wounds.* 15(5):149–66.
- Dunst J, Semlin S, Pigorsch S, Müller AC, Reese T. 2000. Intermittent use of amifostine during postoperative radiochemotherapy and acute toxicity in rectal cancer patients. *Strahlenther Onkol.* 176(9):416–421.
- Dvir T, Timko BP, Kohane DS, Langer R. 2011. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat Nanotechnol.* 6(1):13–22.
- Elliott EA, Wright JR, Swann RS, Nguyen-Tân F, Takita C, Bucci MK,

- Garden AS, Kim H, Hug EB, Ryu J, et al. 2006. Radiation therapy oncology group trial 99-13. 2006. Phase III Trial of an emulsion containing trolamine for the prevention of radiation dermatitis in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: results of radiation therapy oncology group trial 99-13. *J Clin Oncol.* 24(13):2092–2097.
- Elmashad NM, Hussien FZ, Eltatawy RA. 2015. Efficacy of Topical Hyaluronic acid during adjuvant breast cancer radiotherapy for radiation dermatitis prophylaxis. *Life Sci.* 12(6):42–53.
- Ertekin MV, Tekin SB, Erdogan F, Karslioglu I, Gepdiremen A, Sezen O, Balci E, Gundogdu C. 2004. The effect of zinc sulphate in the prevention of radiation-induced dermatitis. *J Radiat Res (Tokyo).* 45(4):543–548.
- Evensen JF, Bjordal K, Jacobsen A, Lokkevik E, Tausjo JE. 2001. Effects of Na-sucrose octasulfate on skin and mucosa reactions during radiotherapy of head and neck cancers. *Acta Oncol.* 40(6):751–755.
- Everett WH, Curiel DT. 2015. Gene therapy for radioprotection. *Cancer Gene Ther.* 22(4):172–180.
- Fahl WE. 2016. Complete prevention of radiation-induced dermatitis using topical adrenergic vasoconstrictors. *Arch Dermatol Res.* 308(10):751–757.
- Famoso JM, Laughlin B, McBride A, Gonzalez VJ. 2017. Pentoxifylline and vitamin E drug compliance after adjuvant breast radiation therapy. *Adv Radiat Oncol.* 3(1):19–24.
- Farhan F, Kazemian A, Alagheband H. 2007. Topical betamethasone for the prevention of acute radiation dermatitis in breast cancer patients. *Iran J Radiat Res.* 1(2):105–111 .
- Feight D, Baney T, Bruce S, McQuestion M. 2011. Putting evidence into practice. *Clin J Oncol Nurs.* 15(5):481–492.
- Fenig E, Brenner B, Katz A, Sulkes J, Lapidot M, Schachter J, Malik H, Sulkes A, Gutman H. 2001. Topical biafine and lipiderm for the prevention of radiation dermatitis: a randomized prospective trial. *Oncol Rep.* 8(2):305–309.
- Fife D, Rayhan DJ, Behnam S, Ortiz A, Elkeeb L, Aquino L, Eduardo Roa D, Ramsinghani N, Kuo J, Newcomb R, et al. 2010. A randomized, controlled, double-blind study of light emitting diode photomodulation for the prevention of radiation dermatitis in patients with breast cancer. *Dermatol Surg.* 36(12):1921–1927.
- Fischer M, Wohlrab J, Marsch W. 2001. Crux medicorum ulcerated radiation-induced fibrosis successful therapy with pentoxifylline and vitamin E (case report). *Eur J Dermatol.* 11(1):38–40.
- Fisher J, Scott C, Stevens R, Marconi B, Champion L, Freedman G, Asrari F, Pilepich MV, Gagnon JD, Wong G. 2000. Randomized phase III study comparing best supportive care to biafine as a prophylactic agent for radiation-induced skin toxicity for women undergoing breast irradiation: radiation therapy oncology group (RTOG) 97–13. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 48(5):1307–1310.
- Fliedner TM, Friesecke I, Beyrer K. 2001. Medical management of radiation accidents - manual on the acute radiation syndrome. London: The British Institute of Radiology.
- Flynn DF, Goans RE. 2006. Nuclear terrorism: triage and medical management of radiation and combined-injury casualties. *Surg Clin North Am.* 86(3):601–636.

- Freedman GM, Anderson PR, Li J, Eisenberg DF, Hanlon AL, Wang L, Nicolaou N. 2006. Intensity modulated radiation therapy (IMRT) decreases acute skin toxicity for women receiving radiation for breast cancer. *Am J Clin Oncol.* 29(1):66–70.
- Freedman GM, Li T, Nicolaou N, Chen Y, Ma CC, Anderson PR. 2009. Breast intensity-modulated radiation therapy reduces time spent with acute dermatitis for women of all breast sizes during radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 74(3):689–694.
- [FDA] Food and Drug Administration (US). 2015. FDA approves Neupogen for treatment of patients with radiation-induced myelosuppression following a radiological/nuclear incident. Silver Spring (MD): U.S. Food and Drug Administration. [accessed 2018 November 12]. <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-counterterrorism/medical-counterevents/aboutmcmi/ucm443245.htm>
- Franco P, Rampino M, Ostellino O, Schena M, Pecorari G, Garzino Demo P, Fasolis M, Arcadipane F, Martini S, Cavallin C, et al. 2017 Management of acute skin toxicity with Hypericum perforatum and neem oil during platinum-based concurrent chemoradiation in head and neck cancer patients. *Med Oncol.* 34(2):30.
- Fujioka M. 2014. Surgical reconstruction of radiation injuries. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 3(1):25–37.
- Galvez P, Hmadcha A, Soria B, Calpena A, Clares B. 2014. Study of the stability of packaging and storage conditions of human mesenchymal stem cell for intra-arterial clinical application in patient with critical limb ischemia. *Eur J Pharm Biopharm.* 86(3):459–468.
- Galvez-Martín P, Martín JM, Ruiz AM, Clares B. 2017. Encapsulation in cell therapy: Methodologies, materials, and clinical applications. *Curr Pharm Biotechnol.* 18(5):365–377.
- Glover D. 2017. A novel treatment to delay the onset of radiotherapy-induced skin reaction. *Wounds UK.* 13(3):64–71
- Goans RE, Holloway EC, Berger ME, Ricks RC. 2001. Early dose assessment in critically accidents. *Health Phys.* 81(4):446–449.
- Gollins S, Gaffney C, Slade S, Swindell R. 2008. RCT on gentian violet versus a hydrogel dressing for radiotherapy-induced moist skin desquamation. *J Wound Care.* 17(6):268–270, 272, 274–265.
- Gonyon DL, Zenn MR. 2003. Simple approach to the radiated scalp wound using INTEGRA skin substitute. *Ann Plast Surg.* 50(3):315–320.
- Gosselin TK, Schneider SM, Plambeck MA, Rowe K. 2010. A prospective randomized, placebo-controlled skin care study in women diagnosed with breast cancer undergoing radiation therapy. *Oncol Nurs Forum.* 37(5):619–626.
- Gothard L, Cornes P, Earl J, Hall E, MacLaren J, Mortimer P, Peacock J, Peckitt C, Woods M, Yarnold J. 2004. Double blind placebo-controlled randomised trial of vitamin E and pentoxifylline in patients with chronic arm lymphoedema and fibrosis after surgery and radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol.* 73(2):133–139
- Gothard L, Stanton A, MacLaren J, Lawrence D, Hall E, Mortimer P, Parkin E, Pritchard J, Risdall J, Sawyer R, et al. 2004. Non-

- randomised phase II trial of hyperbaric oxygen therapy in patients with chronic arm lymphoedema and tissue fibrosis after radiotherapy for early breast cancer. *Radiother Oncol.* 70(3):217–224.
- Gottlob P, Steinert M, Bahren W, Weber L, Gerngross H, Peter RU. 2001. Interferon-gamma in 5 patients with cutaneous radiation syndrome after radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 50(1):159–166.
- Gourmelon P, Benderitter M, Bertho JM, Huet C, Gorin NC, De Revel P. 2010. European consensus on the medical management of acute radiation syndrome and analysis of the radiation accidents in Belgium and Senegal. *Health Phys.* 98(6):825–832.
- Graham P, Browne L, Capp A, Fox C, Graham J, Hollis J, Nasser E. 2004. Randomized, paired comparison of no-sting barrier film versus sorbolene cream (10% glycerine) skin care during post mastectomy irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 58(1):241–246.
- Graham PH, Plant N, Graham JL, Browne L, Borg M, Capp A, Delaney GP, Harvey J, Kenny L, Francis M, et al. 2013. A paired, double-blind, randomized comparison of a moisturizing durable barrier cream to 10% glycerine cream in the prophylactic management of postmastectomy irradiation skin care: trans Tasman Radiation Oncology Group (TROG) 04.01. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 86(1):45–50.
- Gujral MS, Patnaik PM, Kaul R, Parikh HK, Conrard C, Tamhankar CP, Daftary GV. 2001. Efficacy of hydrolytic enzymes in preventing radiation therapy-induced side effects in patients with head and neck cancers. *Cancer Chemother Pharmacol.* 47(Suppl):23–28.
- Guo S, Hu Y, Liu P, Wang Y, Guo D, Wang D, Liao H. 2010. [Protective activity of different concentration of tea polyphenols and its major compound EGCG against whole body irradiation-induced injury in mice]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 35(10):1328–1231. Chinese.
- Haddad P, Amouzgar-Hashemi F, Samsami S, Chinichian S, Oghabian MA. 2013. Aloe vera for prevention of radiation-induced dermatitis: a self-controlled clinical trial. *Curr Oncol.* 20(4):e345–348.
- Halnan KE. 1962. The effect of corticosteroids on the radiation skin reaction. A random trial to assess the value of local application of prednisolone and neomycin ointment after x-ray treatment of basal cell carcinoma. *Br J Radiol.* 35:403–408.
- Halperin EC, Gaspar L, George S, Darr D, Pinnell S. 1993. A double-blind, randomized, prospective trial to evaluate topical vitamin C solution for the prevention of radiation dermatitis. CNS Cancer Consortium. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 26(3):413–416.
- Hazuka MB, Goebel RH, McCutchan S, Sousa K, Greff RF. 1997. A new approach to the prevention of radiation-induced skin desquamation using a polymer adhesive skin sealant (PASS): final results of a prospective study. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 16:A239
- Heggie S, Bryant GP, Tripcony L, Keller J, Rose P, Glendenning M, Heath J. 2002. A phase III study on the efficacy of topical aloe vera gel on irradiated breast tissue. *Cancer Nurs.* 256:442–451.
- Hemati S, Asnaashari O, Sarvizadeh M, Motlagh BN, Akbari M, Tajvidi M, Gookizadeh A. 2012. Topical

- silver sulfadiazine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. *Support Care Cancer*. 20(8):1613–1618.
- Herst PM, Bennett NC, Sutherland AE, Peszynski RI, Paterson DB, Jasperse ML. 2014. Prophylactic use of Mepitel Film prevents radiation-induced moist desquamation in an intra-patient randomised controlled clinical trial of 78 breast cancer patients. *Radiother Oncol*. 110(1):137–143.
- Hindley A, Zain Z, Wood L, Whitehead A, Sanneh A, Barber D, Hornsby R. 2014. Mometasone furoate cream reduces acute radiation dermatitis in patients receiving breast radiation therapy: results of a randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 90(4):748–755.
- Holler V, Buard V, Gaugler MH, Guipaud O, Baudelin C, Sache A, Perez Mdel R, Squiban C, Tamarat R, Milliat F, et al. 2009. Pravastatin limits radiation-induced vascular dysfunction in the skin. *J Invest Dermatol*. 129(5):1280–1291.
- Hom DB, Unger GM, Pernell KJ, Manivel JC. 2005. Improving surgical wound healing with basic fibroblast growth factor after radiation. *Laryngoscope*. 115(3):412–422.
- Hoopfer D, Holloway C, Gabos Z, Alidrisi M, Chafe S, Krause B, Lees A, Mehta N, Tankel K, Strickland F, et al. 2015. Three-arm randomized phase III trial: quality aloe and placebo cream versus powder as skin treatment during breast cancer radiation therapy. *Clin Breast Cancer*. 15(3):e181–e184.
- Horton JA, Li F, Chung EJ, Hudak K, White A, Krausz K, Gonzalez F, Citrin D. 2013. Quercetin inhibits radiation-induced skin fibrosis. *Radiat Res*. 180(2):205–215.
- Hu Y, Guo DH, Liu P, Cao JJ, Wang YP, Yin J, Zhu Y, Rahman K. 2011. Bioactive components from the tea polyphenols influence on endogenous antioxidant defense system and modulate inflammatory cytokines after total-body irradiation in mice. *Phytomedicine*. 18(11):970–975.
- Hulse EV, Mole RH. 1982. Reflections on the terms stochastic and non-stochastic as currently used in radiological protection. *Br J Radiol*. 55(653): 321–324.
- Hussein MR, Abu-Dief EE, Abd El-Reheem MH, Abd-Elrahman A. 2005. Ultrastructural evaluation of the radioprotective effects of melatonin against X-ray-induced skin damage in Albino rats. *Int J Exp Pathol*. 86(1):45–55.
- Hymes SR, Strom EA, Fife C. Radiation dermatitis: clinical presentation, pathophysiology, and treatment 2006. *J Am Acad Dermatol*. 54(1):28–46.
- Iacovelli NA, Naimo S, Bonfantini F, Cavallo A, Bossi P, Fallai C, Pignoli E, Alfieri S, Bergamini C, Favales F, et al. 2017. Preemptive treatment with Xonrid[®], a medical device to reduce radiation induced dermatitis in head and neck cancer patients receiving curative treatment: a pilot study. *Support Care Cancer*. 25(6):1787–1795.
- Iervolino V, Di Costanzo G, Azzaro R, Diodato AM, Di Macchia CA, Di Meo T, Petruzzello A, Loquercio G, Muto P, Apice G, et al. 2013. Platelet gel in cutaneous radiation dermatitis. *Support Care Cancer*. 21(1):287–293.
- [IAEA] International Atomic Energy Agency. 2009. The radiological accident in Nueva Aldea. Vienna. [accessed 2018 October 14]:[101 p.].

- https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/Pub1389_web.pdf
- Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, Bunnell BA. 2006. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem.* 99(5):1285–1297.
- Jacobson G, Bhatia S, Smith BJ, Button AM, Bodeker K, Buatti J. 2013. Randomized trial of pentoxifylline and vitamin E vs standard follow-up after breast irradiation to prevent breast fibrosis, evaluated by tissue compliance meter. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 85(3):604–608.
- Jacobson LK, Johnson MB, Dedhia RD, Niknam-Bienia S, Wong AK. 2017. Impaired wound healing after radiation therapy: A systematic review of pathogenesis and treatment. *JPRAS Open.* 13:92–105.
- Jaschke W, Schmuth M, Trianni A, Bartal G. 2017. Radiation-induced skin injuries to patients: what the interventional radiologist needs to know. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 40:1131–1140.
- Karagas MR, Nelson HH, Zens MS, Linet M, Stukel TA, Spencer S, Applebaum KM, Mott L, Mabuchi K. 2007. Squamous cell and basal cell carcinoma of the skin in relation to radiation therapy and potential modification of risk by sun exposure. *Epidemiology.* 18:776–784.
- Kaul R, Mishra BK, Sutradar P, Choudhary V, Gujral MS. 1999. The role of Wobe-Mugos in reducing acute sequelae of radiation in head and neck cancers--a clinical phase III randomized trial. *Indian J Cancer.* 36(2–4):141–148.
- Kim BC, Shon BS, Ryoo YW, Kim SP, Lee KS. 2001. Melatonin reduces x-ray irradiation-induced oxidative damages in cultured human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 26(3):194–200.
- Kinoshita N, Tsuda M, Hamuy R, Hamuy R, Nakashima M, Nakamura-Kurashige T, Matsuu-Matsuyama M, Hirano A, Akita S. 2012. The usefulness of basic fibroblast growth factor for radiation-exposed tissue. *Wound Repair Regen.* 20(1):91–102.
- Kirova YM, Fromantin I, De Rycke Y, Fourquet A, Morvan E, Padiglione S, Falcou MC, Campana F, Bollet MA. 2011. Can we decrease the skin reaction in breast cancer patients using hyaluronic acid during radiation therapy? Results of phase III randomised trial. *Radiother Oncol.* 100(2):205–209.
- Kølle SF, Fischer-Nielsen A, Mathiasen AB, Elberg JJ, Oliveri RS, Glovinski PV, Kastrup J, Kirchhoff M, Rasmussen BS, Talman ML, et al. 2013. Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue derived stem cells for graft survival: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet.* 382(9898):1113–1120.
- Kong M, Hong SE. 2013. Topical use of recombinant human epidermal growth factor (EGF)-based cream to prevent radiation dermatitis in breast cancer patients: a single-blind randomized preliminary study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 14(8):4859–4864.
- Kotenko K, Moroz B, Nadezhina N, Galstyan I, Eremin I, Deshevoy J, Lebedev V, Slobodina T, Grinakovskaya D, Zhgutov Y, et al. 2012. Successful treatment of localised radiation lesions in rats and humans by mesenchymal stem cell transplantation. *Radiat Prot Dosimetry.* 151(4):661–665.

- Kouvaris JR, Kouloulis VE, Plataniotis GA, Balafouta EJ, Vlahos LJ. 2001. Dermatitis during radiation for vulvar carcinoma: Prevention and treatment with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor impregnated gauze. *Wound Repair Regen.* 9(3):187–193.
- Kouvaris JR, Kouloulis VE, Vlahos LJ. 2007. Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector. *Oncologist.* 12(6):738–747.
- Laffin N, Smyth W. 2011. Prevention of radiation-induced moist desquamation in the tropics. A literature review of non-prescription skin care products. *Wound Practice and Research.* 19(3):136–144.
- Lanigan SW, Joannides T. 2003. Pulsed dye laser treatment of telangiectasia after radiotherapy for carcinoma of the breast. *Br J Dermatol.* 148(1):77–79.
- Larcher F, Dellambra E, Rico L, Bondanza S, Murillas R, Cattoglio C, Mavilio F, Jorcano JL, Zambruno G, Del Rio M. 2007. Long-term engraftment of single genetically modified human epidermal holoclones enables safety preassessment of cutaneous gene therapy. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 15:1670–1676.
- Lataillade JJ, Doucet C, Bey E, Carsin H, Huet C, Clairand I, Bottollier-Depois JF, Chapel A, Ernou I, Gourven M, et al. 2007. New approach to radiation burn treatment by dosimetry guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy. *Regen Med.* 2(5):785–794.
- Lee JW, Tutela JP, Zoumalan RA, Thanik VD, Nguyen PD, Varjabedian L, Warren SM, Saadeh PB. 2010. Inhibition of Smad3 expression in radiation-induced fibrosis using a novel method for topical transcutaneous gene therapy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 136(7):714–719.
- Lefaix JL, Delanian S, Vozenin MC, Lepalt JJ, Tricaud Y, Martin M. 1999. Striking regression of subcutaneous fibrosis induced by high doses of gamma rays using a combination of pentoxifylline and alpha-tocopherol: an experimental study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 43(4):839–847.
- Leikin JB, Mcfee RB. 2007. A primer for nuclear terrorism preparedness. In: Leikin JB, Mcfee RB, Kerscher R, editors. *Handbook of nuclear, biological and chemical agent exposure.* Boca Raton (FL): CRC Press; p. 526–555.
- Leonardi MC, Gariboldi S, Ivaldi GB, Ferrari A, Serafini F, Didier F, Mariani L, Castiglioni S, Orecchia R. 2008. A double-blind, randomised, vehicle-controlled clinical study to evaluate the efficacy of MAS065D in limiting the effects of radiation on the skin: interim analysis. *Eur J Dermatol.* 18(3):317–321.
- Lievens Y, Haustermans K, Van den Weyngaert D, Van den Bogaert W, Scalliet P, Hutsebaut L, Fowler J, Lambin P. 1998. Does sucralfate reduce the acute side-effects in head and neck cancer treated with radiotherapy? A double-blind randomized trial. *Radiother Oncol.* 47(2):149–153.
- Liguori V, Guillemain C, Pesce GF, Mirimanoff RO, Bernier J. 1997. Double-blind, randomized clinical study comparing hyaluronic acid cream to placebo in patients treated with radiotherapy. *Radiother Oncol.* 42(2):155–161.
- Lin LC, Que J, Lin LK, Lin FC. 2006. Zinc supplementation to improve

- mucositis and dermatitis in patients after radiotherapy for head-and-neck cancers: a double-blind, randomised study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 65(3):745–750.
- Løkkevik E, Skovlund E, Reitan JB, Hannisdal E, Tanum G. 1996. Skin treatment with bepanthen cream versus no cream during radiotherapy - a randomized controlled trial. *Acta Oncol Stockh Swed.* 35(8):1021–1026.
- López Alfonso JC, Parsai S, Joshi N, Godley A, Shah C, Koyfman SA, Caudell JJ, Fuller CD, Enderling H, Scott JG. 2018. Temporally feathered intensity-modulated radiation therapy: A planning technique to reduce normal tissue toxicity. *Med Phys.* 45(7):3466–3474.
- López M, Martín M. 2011. Medical management of the acute radiation syndrome. *Rep Pract Oncol Radiother.* 16(4):138–146.
- Ma H, Zhang X, Bai M, Wang X. 2007. Clinical effects of lianbai liquid in prevention and treatment of dermal injury caused by radiotherapy. *J Tradit Chin Med.* 27(3):193–196.
- Macmillan MS, Wells M, MacBride S, Raab GM, Munro A, MacDougall H. 2007. Randomized comparison of dry dressings versus hydrogel in management of radiation-induced moist desquamation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 68(3):864–872.
- Magnusson M, Höglund P, Johansson K, Jönsson C, Killander F, Malmström P, Weddig A, Kjellén E. 2009. Pentoxifylline and vitamin E treatment for prevention of radiation-induced side-effects in women with breast cancer: a phase two, double-blind, placebo-controlled randomised clinical trial (Ptx-5). *Eur J Cancer.* 45(14):2488–2495.
- Mahomed F, Rikhotso E, Altini M. 2011. Subcutaneous calcinosis as late sequela of radiotherapy to the neck. *J Oral Maxillofac Surg.* 69(6):123–127.
- Maiche A, Isokangas OP, Grohn P. 1994. Skin protection by sucralfate cream during electron beam therapy. *Acta Oncol.* 33(2):201–203.
- Maiche AG, Grohn P, Maki-Hokkonen H. 1991. Effect of chamomile cream and almond ointment on acute radiation skin reaction. *Acta Oncol.* 30(3):395–396.
- Mak SS, Molassiotis A, Wan WM, Lee IY, Chan ES. 2000. The effects of hydrocolloid dressing and gentian violet on radiation-induced moist desquamation wound healing. *Cancer Nurs.* 23(3):220–229.
- Manzanas García A, López Carrizosa MC, Vallejo Ocaña C, Samper Ots P, Delgado Pérez JM, Carretero Accame E, Gómez-Serranillos P, de la Morena del Valle L. 2008. Superoxidase dismutase (SOD) topical use in oncologic patients: treatment of acute cutaneous toxicity secondary to radiotherapy. *Clin Transl Oncol.* 10(3):163–167.
- Margolin SG, Breneman JC, Denman DL, LaChapelle P, Weckbach L, Aron BS. 1990. Management of radiation-induced moist skin desquamation using hydrocolloid dressing. *Cancer Nurs.* 13(2):71–80.
- Martella S, Rietjens M, Lohsiriwat V, Lazzari R, Vavassori A, Jereczek BA, Lazzati V, Leonardi MC, Petit JY. 2010. Acute radiation dermatitis in breast cancer: topical therapy with vitamin E acetate in lipophilic gel base. *Ecancermedicalscience.* 4:190.
- Martin MT, Vulin A, Hendry JH. 2016. Human epidermal stem cells: Role in adverse skin reactions and carcinogenesis from radiation. *Mutat Res.* 770(Pt B):349–368.

- [MGH] Massachusetts General Hospital (US). 2013. Pilot study of the effect of laser on reversing chronic radiation injury. Bethesda (MD): National Library of Medicine. [accessed 2018 September 28]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01910818>.
- Matceyevsky D, Hahoshen NY, Vexler A, Noam A, Khafif A, Ben-Yosef R. 2007. Assessing the effectiveness of Dead Sea products as prophylactic agents for acute radiochemotherapy-induced skin and mucosal toxicity in patients with head and neck cancers: a phase 2 study. *Isr Med Assoc J.* 9:439–442.
- McQuestion M. 2011. Evidence-based skin care management in radiation therapy: clinical update. *Semin Oncol Nurs.* 27:1–7.
- Meghrajani CF, Co HS, Arcillas JG, Maaño CC, Cupino NA. 2016. A randomized, double-blind trial on the use of 1% hydrocortisone cream for the prevention of acute radiation dermatitis. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 9(3):483–491.
- Merchant TE, Bosley C, Smith J, Baratti P, Pritchard D, Davis T, Li C, Xiong X. 2007. A phase III trial comparing an anionic phospholipid-based cream and aloe vera-based gel in the prevention of radiation dermatitis in pediatric patients. *Radiat Oncol.* 2:45.
- Miko Enomoto T, Johnson T, Peterson N, Homer L, Walts D, Johnson N. 2005. Combination glutathione and anthocyanins as an alternative for skin care during external-beam radiation. *Am J Surg.* 189(5):627–630.
- Milas L, Nishiguchi I, Hunter N, Murray D, Fleck R, Ito H, Travis E. 1992. Radiation protection against early and late effects of ionizing irradiation by the prostaglandin inhibitor indomethacin. *Adv Space Res.* 12(2–3):265–271.
- Miller RC, Schwartz DJ, Sloan JA, Griffin PC, Deming RL, Anders JC, Stoffel TJ, Haselow RE, Schaefer PL, Bearden JD 3rd, et al. 2011. Mometasone furoate effect on acute skin toxicity in breast cancer patients receiving radiotherapy: a phase III double-blind, randomized trial from the North Central Cancer Treatment Group N06C4. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 79(5):1460–1466.
- Momm F, Weibenberger C, Bartelt S, Henke M. 2003. Moist skin care can diminish acute radiation-induced skin toxicity. *Strahlenther Onkol.* 179(10):708–712.
- Muller K, Meineke V. 2007. Radiation-induced alterations in cytokine production by skin cells. *Exp Hematol.* 35(4 Suppl 1):96–104.
- Mustoe TA, Purdy J, Gramates P, Deuel TF, Thomason A, Pierce GF. 1989. Reversal of impaired wound healing in irradiated rats by platelet-derived growth factor-BB. *Am J Surg.* 158(4):345–350.
- Nagler A, Ohana M, Leiba M, Levdansky L, Gorodetsky R. 2007. Effect of halofuginone, a collagen alpha1(I) inhibitor, on wound healing in normal and irradiated skin: implication for hematopoietic stem cell transplantation. *Acta Haematol.* 118(2):77–83.
- Nasser NJ, Fenig S, Ravid A, Nouriel A, Ozery N, Gardyn S, Koren R, Fenig E. 2017. Vitamin D ointment for prevention of radiation dermatitis in breast cancer patients. *NPJ Breast Cancer.* 3:10.
- [NCI] National Cancer Institute (US). 2017. Common Terminology Criteria for Adverse Events Version 5. Washington (DC): Department of

- Health and Human Services. [accessed 2018 September 15]:[147 p.].
https://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/CTCAE_v5_Quick_Reference_8.5x11.pdf.
- Nauta A, Seidel C, Deveza L, Montoro D, Grova M, Ko SH, Hyun J, Gurtner GC, Longaker MT, Yang F. 2013. Adipose derived stromal cells overexpressing vascular endothelial growth factor accelerate mouse excisional wound healing. *Mol Ther.* 21(2):445–455.
- Niazi TM, Vuong T, Azoulay L, Marijnen C, Bujko K, Nasr E, Lambert C, Duclos M, Faria S, David M, et al. 2012. Silver clear nylon dressing is effective in preventing radiation-induced dermatitis in patients with lower gastrointestinal cancer: results from a phase III study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 84(3):e305–e310.
- Noble-Adams, R. 1999a. Radiation-induced skin reactions 2: Development of a measurement tool. *Br J Nurs.* 8(18):1208–1211.
- Noble-Adams, R. 1999b. Radiation-induced skin reactions 3: Evaluating the RISRAS. *Br J Nurs.* 8(19):1305–1312.
- Nymann P, Hedelund L, Haedersdal M. 2009. Intense pulsed light vs. long-pulsed dye laser treatment of telangiectasia after radiotherapy for breast cancer: a randomized split-lesion trial of two different treatments. *Br J Dermatol.* 160(6):1237–1241.
- O'Donovan A, Coleman M, Harris R, Herst P. 2015. Prophylaxis and management of acute radiation-induced skin toxicity: a survey of practice across Europe and the USA. *Eur J Cancer Care (Engl).* 24(3):425–435.
- Okunieff P, Augustine E, Hicks JE, Cornelison TL, Altemus RM, Naydich BG, Ding I, Huser AK, Abraham EH, Smith JJ, et al. 2004. Pentoxifylline in the treatment of radiation-induced fibrosis. *J Clin Oncol.* 22(11):2207–2213.
- Okunieff P, Xu J, Hu D, Liu W, Zhang L, Morrow G, Pentland A, Ryan JL, Ding I. 2006. Curcumin protects against radiation-induced acute and chronic cutaneous toxicity in mice and decreases mRNA expression of inflammatory and fibrogenic cytokines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 65(3):890–898.
- Olascoaga A, Vilar-Compte D, Poitevin-Chacón A, Contreras-Ruiz J. 2008. Wound healing in radiated skin: pathophysiology and treatment options. *Int Wound J.* 5(2):246–257.
- Olsen DL, Raub W, Bradley C, Johnson M, Macias JL, Love V, Markoe A. 2001. The effect of aloe vera gel/mild soap alone in preventing skin reaction in patients undergoing radiation therapy. *Oncol Nurs Forum.* 28(3):543–547.
- Omidvari S, Saboori H, Mohammadianpanah M, Mosalaei A, Ahmadloo N, Mosleh-Shirazi MA, Jowkar F, Namaz S. 2007. Topical betamethasone for prevention of radiation dermatitis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 73(3):209.
- Palmer JL, Deburghgraeve CR, Bird MD, Hauer-Jensen M, Kovacs EJ. 2011. Development of a combined radiation and burn injury model. *J Burn Care Res.* 32(2):317–323.
- Pardo Masferrer J, Murcia Mejía M, Vidal Fernández M, Alvarado Astudillo A, Hernández Armenteros ML, Macías Hernández V, Soto Pérez R, Mirada Ferre A. 2010. Prophylaxis with a cream containing urea reduces the incidence and severity of radio-

- induced dermatitis. *Clin Transl Oncol.* 12(1):43–48.
- Parikh R, Bakhshi G, Naik M, Gaikwad B, Jadhav K, Tayade M. 2016. The efficacy and safety of tetrachlorodecaoxide in comparison with super-oxidised solution in wound healing. *Arch Plast Surg.* 43(5):395–401.
- Pasquier D, Hoelscher T, Schmutz J, Dische S, Mathieu D, Baumann M, Lartigau E. 2004. Hyperbaric oxygen therapy in the treatment of radio-induced lesions in normal tissues: A literature review. *Radiother Oncol.* 72(1):1–13.
- Paterson DB, Poonam P, Bennett NC, Peszynski RI, van Beekhuizen M, Jasperse ML, Herst PM. 2012. Randomized intra-patient controlled trial of Mepilex Lite dressings versus aqueous cream in managing radiation-induced skin reactions postmastectomy. *J. Cancer Sci. Ther.* 4:347–356.
- Peter RU, Gottlöber P, Nadeshina N, Krähn G, Braun-Falco O, Plewig G. 1999. Interferon gamma in survivors of the Chernobyl power plant accident: new therapeutic option for radiation-induced fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 45(1):147–152.
- Peter RU. 2005. Cutaneous radiation syndrome in multi-organ failure. *BJR.* 1(Suppl. 27):180–184.
- Pignol JP, Olivotto I, Rakovitch E, Gardner S, Sixel K, Beckham W, Vu TT, Truong P, Ackerman I, Paszat L. 2008. A multicenter randomized trial of breast intensity-modulated radiation therapy to reduce acute radiation dermatitis. *J Clin Oncol.* 26(13):2085–2092.
- Pinnix C, Perkins GH, Strom EA, Tereffe W, Woodward W, Oh JL, Arriaga L, Munsell MF, Kelly P, Hoffman KE, et al. 2012. Topical hyaluronic acid vs. standard of care for the prevention of radiation dermatitis after adjuvant radiotherapy for breast cancer: single-blind randomized phase III clinical trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 83(4):1089–1094.
- Pommier P, Gomez F, Sunyach MP, D’Hombres A, Carrie C, Montbarbon X. 2004. Phase III randomized trial of *Calendula officinalis* compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. *J Clin Oncol.* 22(8):1447–1453.
- Primavera G, Carrera M, Berardesca E, Pinnaró P, Messina M, Arcangeli G. 2006. A double-blind, vehicle-controlled clinical study to evaluate the efficacy of MAS065D (XClair), a hyaluronic acid-based formulation, in the management of radiation-induced dermatitis. *Cutan Ocul Toxicol.* 25(3):165–171.
- Prise KM, A Saran. 2011. Concise review: stem cell effects in radiation risk. *Stem Cells.* 29:1315–1321.
- Pritchard J, Anand P, Broome J, Davis C, Gothard L, Hall E, Maher J, McKinna F, Millington J, Misra VP, et al. 2001. Double-blind randomized phase II study of hyperbaric oxygen in patients with radiation-induced brachial plexopathy. *Radiother Oncol.* 58(1):279–286.
- [REMM] Radiation Emergency Medical Management (US). 2011. Radiation Emergency Medical Management. Cutaneous radiation syndrome. Washington (DC): Department of Health and Human Services. [accessed 2018 June 26]:[1 p.]. <http://www.remm.nlm.gov/cutaneoussyndrome.htm>

- Ramundo J, Gray M. 2008. Enzymatic wound debridement. *J Wound Ostomy Continence Nurs.* 35(3):273–280.
- Rao S, Hegde SK, Baliga-Rao MP, Lobo J, Palatty PL, George T, Baliga MS. 2017. Sandal wood oil and turmeric-based cream prevents ionizing radiation-induced dermatitis in breast cancer patients: clinical study. *Medicines (Basel).* 4(3):E43.
- Rao S, Hegde SK, Baliga-Rao MP, Palatty PL, George T, Baliga MS. 2017. An Aloe vera-based cosmeceutical cream delays and mitigates ionizing radiation-induced dermatitis in head and neck cancer patients undergoing curative radiotherapy: A Clinical Study. *Medicines (Basel).* 4(3):E44.
- Rasulov MF, Vasilchenkov AV, Onishchenko NA, Krashennikov ME, Kravchenko VI, Gorshenin TL, Pidtsan RE, Potapov IV. 2005. First experience of the use bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns. *Bull Exp Biol Med.* 139(1):141–144.
- Reeves GI, Ainsworth EJ. 1995. Description of the chronic radiation syndrome in humans irradiated in the former Soviet Union. *Radiat. Res.* 142(2): 242–243.
- Ren ZP, Li XM, Wu CQ, Wu D, Chen SY, Liu YJ, Zuo MS. 2005. Clinical observation of trolamine cream in the prevention and treatment of acute radioactive dermatitis in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Chin J Clin Oncol* 32:870–875.
- Ribet V, Salas S, Levecq JM, Bastit L, Alfonsi M, De Rauglaudre G, Talon B, Allavena C, Miot C, Boisseau JM, et al. 2008. [Interest of a sterilised anti-burning gel in radiation dermatitis: results of a comparative study]. *Ann Dermatol Venereol.* 1:5–10. French.
- Rigotti G, Marchi A, Galiè M, Baroni G, Benati D, Krampera M, Pasini A, Sbarbati A. 2007. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 119(5):1409–1424.
- Robijns J, Censabella S, Claes S, Pannekoeke L, Bussé L, Colson D, Kaminski I, Bulens P, Maes A, Noé L, et al. 2018. Prevention of acute radiodermatitis by photobiomodulation: A randomized, placebo-controlled trial in breast cancer patients (TRANSDERMIS trial). *Lasers Surg Med.* DOI: 10.1002/lsm.22804.
- Robson V, Cooper R. 2009. Using leptospermum honey to manage wounds impaired by radiotherapy: A case series. *Ostomy Wound Management.* 55(1):38–47.
- Rollmann DC, Novotny PJ, Petersen IA, Garces YI, Bauer HJ, Yan ES, Wahner-Roedler D, Vincent A, Sloan JA, Issa Laack NN. Double-Blind. 2015. Placebo-controlled pilot study of processed ultra Emu oil versus placebo in the prevention of radiation dermatitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 92(3):650–658.
- Röper B, Kaisig D, Auer F, Mergen E, Molls M. 2004. Thêta-cream versus bepanthol lotion in breast cancer patients under radiotherapy. A new prophylactic agent in skin care?. *Strahlenther Onkol.* 180:315–322.
- Rossi AM, Nehal KS, Lee EH. 2014. Radiation-induced breast telangiectasias treated with the pulsed dye laser. *J Clin Aesthet Dermatol.* 7(12):34–37.
- Routledge JA, Burns MP, Swindell R, Khoo VS, West CM, Davidson SE.

2003. Evaluation of the LENT-SOMA scales for the prospective assessment of treatment morbidity in cervical carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 56(2):502–510.
- Roy I, Fortin A, Larochelle M. 2001. The impact of skin washing with water and soap during breast irradiation: a randomized study. *Radiother Oncol.* 58(3):333–3339.
- Ryan JL. 2012. Ionizing radiation: the good, the bad, and the ugly. *J Invest Dermatol.* 132(3 Pt 2):985–993.
- Ryan JL, Heckler CE, Ling M, Katz A, Williams JP, Pentland AP, Morrow GR. 2014. Curcumin intervention and plasma biomarkers for radiation dermatitis in breast cancer patients. *J Invest Dermatol.* 180(1):34–43.
- Ryan Wolf J, Heckler CE, Guido JJ, Peoples AR, Gewandter JS, Ling M, Vinciguerra VP, Anderson T, Evans L, Wade J, et al. 2018. Oral curcumin for radiation dermatitis: a URCC NCORP study of 686 breast cancer patients. *Support Care Cancer.* 26(5):1543–1552.
- Salvo N, Barnes E, van Draanen J, Stacey E, Mitera G, Breen D, Giotis A, Czarnota G, Pang J, De Angelis C. 2010. Prophylaxis and management of acute radiation-induced skin reactions: a systematic review of the literature. *Curr Oncol.* 17(4):94–112.
- Sarma L, Kesavan PC. 1993. Protective effects of vitamins C and E against γ -ray-induced chromosomal damage in mouse. *Int J Radiat Biol.* 63(6):759–764.
- Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H, Mossbacher U, Schindl L. 2000. Low intensity laser irradiation in the treatment of recalcitrant radiation ulcers in patients with breast cancer—long-term results of 3 cases. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 16(1):34–37.
- Schmeel LC, Koch D, Stumpf S, Leitzen C, Simon B, Schüller H, Vornholt S, Schoroth F, Müdder T, Röhner F, et al. 2018. Prophylactically applied Hydrofilm polyurethane film dressings reduce radiation dermatitis in adjuvant radiation therapy of breast cancer patients. *Acta Oncol.* 57(7):908–915.
- Schmuth M, Wimmer MA, Hofer S, Sztankay A, Weinlich G, Linder DM, Elias PM, Fritsch PO, Fritsch E. 2002. Topical corticosteroid therapy for acute radiation dermatitis: a prospective, randomized, double-blind study. *Br J Dermatol.* 146(6):983–991.
- Segaert S, Van Cutsem E. 2005. Clinical signs, pathophysiology and management of skin toxicity during therapy with epidermal growth factor receptor inhibitors. *Ann Oncol.* 16(9):1425–1433.
- Sharp L, Finnila K, Johansson H, Abrahamsson M, Hatschek T, Bergenmar M. 2013. No differences between Calendula cream and aqueous cream in the prevention of acute radiation skin reactions—results from a randomised blinded trial. *Eur J Oncol Nurs.* 17(4):429–435.
- Shukla PN, Gairola M, Mohanti BK, Rath GK. 2006. Prophylactic beclomethasone spray to the skin during postoperative radiotherapy of carcinoma breast: a prospective randomized study. *Indian J Cancer.* 43(4):180–184.
- Singh VK, Romaine PL, Newman VL, Seed TM. 2016. Medical countermeasures for unwanted CBRN exposures: part II radiological and nuclear threats with review of recent countermeasure patents. *Expert Opin Ther Pat.* 26(12):1399–1408.
- Singh VK, Romaine PL, Seed TM. 2015. Medical countermeasures for

- radiation exposure and related Injuries: characterization of medicines, FDA-approval status and inclusion into the strategic national stockpile. *Health Phys.* 108(6):607–630.
- [SOR] Society and College of Radiographers. 2011. Summary of intervention for acute radiotherapy induced skin reactions in cancer patients: A clinical guideline recommended for use by The Society and; College of Radiographers. London: Society and College of Radiographers. [accessed 2018 October 10]:[5 p.]. file:///C:/Users/Usuario/Downloads/society_of_radiographers_-__.pdf.
- Spalek M. 2016. Chronic radiation-induced dermatitis: challenges and solutions. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 9:473–482.
- Soriano-Ruiz JL, Calpena-Capmany AC, Cañadas-Enrich C, Febrer NB, Suñer-Carbó J, Souto EB, Clares-Naveros B. 2019. Biopharmaceutical profile of a clotrimazole nanoemulsion: Evaluation on skin and mucosae as anticandidal agent. *Int J Pharm.* 554:105–115.
- Steinert M, Weiss M, Gottlöber P, Belyi D, Gergel O, Bebesko V, Nadejina N, Galstian I, Wagemaker G, Fliedner TM, et al. 2003. Delayed effects of accidental cutaneous radiation exposure: fifteen years of follow-up after the Chernobyl accident. *J Am Acad Dermatol.* 49(3):417–423.
- Suárez B, López-Abente G, Martínez C, Navarro C, Tormo MJ, Rosso S, Schraub S, Gafà L, Sancho-Garnier H, Wechsler J, Zanetti R. 2007. Occupation and skin cancer: the results of the HELIOS-I multicenter case-control study. *BMC Public Health.* 7(1):180.
- Sugiyama H, Misumi M, Kishikawa M, Iseki M, Yonehara S, Hayashi T, Soda M, Tokuoka S, Shimizu Y, Sakata R, et al. 2014. Skin cancer incidence among atomic bomb survivors from 1958 to 1996. *Radiat. Res.* 181:531–539.
- Szumacher E, Wighton A, Franssen E, Chow E, Tsao M, Ackerman I, Andersson L, Kim J, Wojcicka A, Ung Y, et al. 2001. Phase II study assessing the effectiveness of Biafine cream as a prophylactic agent for radiation-induced acute skin toxicity to the breast in women undergoing radiotherapy with concomitant CMF chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 51(1):81–86.
- Teas J, Cunningham JE, Cone L, Jansen K, Raghavan SK, Nitcheva DK, Xie D, Butler WM. 2004. Can hyperbaric oxygen therapy reduce breast cancer treatment-related lymphedema? a pilot study. *J Womens Health (Larchmt).* 13(9):1008–1018.
- Théberge V, Harel F, Dagnault A. 2009. Use of axillary deodorant and effect on acute skin toxicity during radiotherapy for breast cancer: a prospective randomized noninferiority trial. *Int J Rad Oncol Biol Phys.* 75(4):1048–1052.
- Tran TN, Hoang MV, Phan QA, Phung TL, Purschke M, Ferinelli WA, Sabir S, Ziegler A, Nelson S, Anderson RR. 2015. Fractional epidermal grafting in combination with laser therapy as a novel approach in treating radiation dermatitis. *Semin Cutan Med Surg.* 34(1):42–47.
- Ulf E, Maroti M, Serup J, Falkmer U. 2013. A potent steroid cream is superior to emollients in reducing acute radiation dermatitis in breast cancer patients treated with adjuvant radiotherapy. A randomised study of betamethasone versus two

- moisturizing creams. *Radiother Oncol.* 108(2):287–292.
- Ulf E, Maroti M, Serup J, Nilsson M, Falkmer U. 2017. Prophylactic treatment with a potent corticosteroid cream ameliorates radiodermatitis, independent of radiation schedule: a randomized double blinded study. *Radiother Oncol.* 122(1):50–53.
- Vavassis P, Gelinias M, Chabot Tr J, Nguyen-Tân PF. 2008. Phase 2 study of silver leaf dressing for treatment of radiation-induced dermatitis in patients receiving radiotherapy to the head and neck. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 37(1):124–129.
- Vuong T, Franco E, Lehnert S, Lambert C, Portelance L, Nasr E, Faria S, Hay J, Larsson S, Shenouda G, et al. 2004. Silver leaf nylon dressing to prevent radiation dermatitis in patients undergoing chemotherapy and external beam radiotherapy to the perineum. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 59(3):809–814.
- Ward KA, Jaimes JP, Coots NV. 2012. Cutaneous manifestations of acute radiation exposure: a review. *Int J Dermatol.* 51(11):1282–1291.
- Watson LC, Gies D, Thompson E, Thomas B. 2012. Randomized control trial: evaluating aluminum-based antiperspirant use, axilla skin toxicity, and reported quality of life in women receiving external beam radiotherapy for treatment of stage 0, I, and II breast cancer. *Int J Rad Oncol Biol Phys.* 83(1):28–34.
- Wells M, Macmillan M, Raab G, MacBride S, Bell N, MacKinnon K, MacDougall H, Samuel L, Munro A. 2004. Does aqueous or sucralfate cream affect the severity of erythematous radiation skin reactions? A randomised controlled trial. *Radiother Oncol.* 73(2):153–162.
- Westbury C, Hines F, Hawkes E, Ashley S, Brada M. 2000. Advice on hair and scalp care during cranial radiotherapy: a prospective randomized trial. *Radiother Oncol.* 54:109–116.
- Wheat J, Currie G, Coulter K. 2006. Wheatgrass extract as a topical skin agent for acute radiation skin toxicity in breast radiation therapy: a randomised controlled trial. *J Aust Tradit Med Soc.* 12(3):135–137.
- Wiener SL, Barrett J. 1986. *Trauma Management for Civilian and Military Physicians.* Philadelphia (PA): W. B. Saunders. Chapter 7, Thermonuclear weapons; p. 497–506.
- Williams MS, Burk M, Loprinzi CL, Hill M, Schomberg PJ, Nearhood K, O'Fallon JR, Laurie JA, Shanahan TG, Moore RL, et al. 1996. Phase III double-blind evaluation of an aloe vera gel as a prophylactic agent for radiation-induced skin toxicity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 36(2):345–349.
- Wollina U, Liebold K, Konrad H. 2001. Treatment of chronic radiation ulcers with recombinant platelet-derived growth factor and a hydrophilic copolymer membrane. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 15(5):455–457.
- Wong RK, Bensadoun RJ, Boers-Doets CB, Bryce J, Chan A, Epstein JB, Eaby-Sandy B, Lacouture ME. 2013. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of acute and late radiation reactions from the MASCC Skin Toxicity Study Group. *Support Care Cancer.* 21(10):2933–2948.
- Wooding H, Yan J, Yuan L, Chyou TY, Gao S, Ward I, Herst PM. 2018. The effect of Mepitel Film on acute radiation-induced skin reactions in head and neck cancer patients: a

- feasibility study. *Br J Radiol.* 91(1081):20170298.
- [WHO] World Health Organization. 2016. Ionizing radiation, health effects and protective measures. [accessed 2018 November 18]:[1 p.]. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ionizing-radiation-health-effects-and-protective-measures>
- Xavier S, Piek E, Fujii M, Javelaud D, Mauviel A, Flanders KC, Samuni AM, Felici A, Reiss M, Yarkoni S, et al. 2004. Amelioration of radiation-induced fibrosis: inhibition of transforming growth factor-beta signaling by halofuginone. *J Biol Chem.* 279(15):15167–15176.
- Xiao Z, Su Y, Yang S, Yin L, Wang W, Yi Y, Fenton BM, Zhang L, Okunieff P. 2006. Protective effect of esculentoside A on radiation-induced dermatitis and fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 65(3):882–889.
- Zhang Y, Sadgrove MP, Sueda K, Yang YS, Pacyniak EK, Kagel JR, Braun BA, Zamboni WC, Mumper RJ, Jay M. 2013a. Nonaqueous gel for the transdermal delivery of a DTPA penta-ethyl ester prodrug. *AAPS J.* 15(2):523–532.
- Zhang Y, Zhang S, Shao X. 2013b. Topical agent therapy for prevention and treatment of radiodermatitis: a meta-analysis. *Support Care Cancer.* 21(4):1025–1031.
- Zhong WH, Tang QF, Hu LY, Feng HX. 2013. Mepilex Lite dressings for managing acute radiation dermatitis in nasopharyngeal carcinoma patients: a systematic controlled clinical trial. *Med Oncol.* 30(4):761.
- Zhu G, Lin JC, Kim SB, Bernier J, Agarwal JP, Vermorken JB, Thinh DHQ, Cheng HC, Yun HJ, Chitapanarux I, et al. 2016. Asian expert recommendation on management of skin and mucosal effects of radiation, with or without the addition of cetuximab or chemotherapy, in treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 16: 42–55.

Artículo 2

BIOPHARMACEUTICAL PROFILE OF A CLOTRIMAZOLE NANOEMULSION: EVALUATION ON SKIN AND MUCOSAE AS ANTICANDIDAL AGENT

*(Perfil biofarmacéutico de una nanoemulsión de clotrimazol:
Evaluación en piel y mucosas como agente anticandidiásico)*

*José L. Soriano-Ruiz, Ana C. Calpena-Campmany, Cristina
Cañadas-Enrich, Nuria Bozal-de Febrer, Joaquim Suñer-
Carbó, Eliana B. Souto, Beatriz Clares-Naveros*

International Journal of Pharmaceutics

(2019, Vol. 554, Pág. 105–115)

(DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.002>)

ISSN:	0378-5173
eISSN:	1873-3476
Editorial:	Elsevier Science BV (Holanda)
Factor de Impacto:	3.862
Categoría:	Pharmacology & Pharmacy
Posición:	46/261
Cuartil:	1°

Resumen

El clotrimazol (CLT) se formula en una nanoemulsión (NE) para el tratamiento tópico de candidiasis, compuesta por un 10% de labrafac[®] lipophile, un 60% de la mezcla labrasol[®]:capryol[®] 90 (proporción 4:1) y un 30% de propilenglicol. Se evaluaron las propiedades fisicoquímicas, la estabilidad, la reología, la liberación *in vitro* del fármaco, la permeación *ex vivo* del fármaco a través de piel humana y mucosa bucal, sublingual y vaginal de cerdo, la eficacia antifúngica, así como, la tolerancia en piel *in vivo*. Las formulaciones 1% CLT-NE (CLT-NE1) y 2% CLT-NE (CLT-NE2) exhibieron tamaños de gota de 153 ± 17.25 y 186 ± 15.38 nm, bajos índices de polidispersión, potenciales zeta negativos y valores de pH biocompatibles con la piel.

La nanoemulsiones de CLT exhibieron perfiles típicos Newtonianos con valores de viscosidad de 42.14 ± 0.037 mPa·s and 41.35 ± 0.041 mPa·s, respectivamente y mayores propiedades de extensibilidad que las formulaciones comerciales de referencia, manteniendo sus propiedades fisicoquímicas durante 180 días. Las nanoemulsiones aportaban una liberación de fármaco sostenida de acuerdo con el modelo de primer orden. Se observaron propiedades similares de permeación entre la formulación CLT-NE1 y la referencia comercial. Sin embargo, las cantidades de CLT retenidas en las mucosas fueron significativamente mayores en el caso de la formulación CLT-NE2 en comparación con la referencia. Las eficacias antifúngicas fueron también mayores que las de las referencias comerciales, y el estudio de tolerancia *in vivo* confirmó la idoneidad de la aplicación tópica, lo que hacen a las nanoemulsiones de CLT desarrolladas una gran herramienta para la investigación clínica de los tratamientos tópicos contra la candidiasis.

Biopharmaceutical profile of a clotrimazole nanoemulsion: Evaluation on skin and mucosae as anticandidal agent

José L. Soriano-Ruiz ^a, Ana C. Calpena-Campmany ^{b,c}, Cristina Cañadas-Enrich ^b, Nuria Bozal-de Febrer ^d, Joaquim Suñer-Carbó ^b, Eliana B. Souto ^e, Beatriz Clares-Naveros ^{a,c,*}

^a Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, University of Granada, University Campus of Cartuja, 18071 Granada, Spain

^b Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, School of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 27-31 Joan XXIII Ave., 08028 Barcelona, Spain

^c Nanoscience and Nanotechnology Institute (IN2UB), University of Barcelona, 645 Diagonal Ave., 08028 Barcelona, Spain

^d Department of Biology, Healthcare and the Environment, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 27-31 Joan XXIII Ave., 08028 Barcelona, Spain

^e Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Polo das Ciências da Saúde, Azinhaga de Santa Comba, 3000-548 Coimbra, Portugal

* **Corresponding author at:** Dr. Beatriz Clares, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus de la Cartuja s/n, 18071 Granada, España. Tel: +34 958246664; Fax: +34 958248958; E-mail: beatrizclares@ugr.es

Abstract

Clotrimazole (CLT) was formulated in a nanoemulsion (NE) for the topical treatment of candidiasis consisting of 10% labrafac[®] lipophile, 60% labrasol[®]:capryol[®] 90 mixture (ratio 4:1) and 30% propylene glycol. Physicochemical properties, stability, rheology, *in vitro* drug release, *ex vivo* drug permeation through human skin and porcine buccal, sublingual and vaginal mucosae, antifungal efficacy, as well as *in vivo* skin tolerance were evaluated. 1% CLT-NE (CLT-NE1) and 2% CLT-NE (CLT-NE2) exhibited 153±17.25 and 186 ±15.38 nm droplet sizes, low polydispersity indexes, negative zeta potentials and biocompatible pH values. The CLT-NEs exhibited typical Newtonian profiles with viscosities of 42.14±0.037 mPa·s and 41.35±0.041 mPa·s, respectively and higher extensibility properties than commercial counterparts retaining their physicochemical properties for 180 days. NEs provided a sustained release of drug according to the first order model. Similar skin permeation properties were observed between CLT-NE1 and commercial reference. However, significant higher CLT amounts retained in mucosae were provided by CLT-NE2 when compared with references. Antifungal efficacies were also higher than commercial references, and the *in vivo* tolerance study confirmed the suitability for topical application, making CLT-NEs a great tool for clinical investigation of topical candidiasis treatments.

Keywords: Clotrimazole, nanoemulsion, candidiasis, skin, mucosa, permeation

1. Introduction

Ionizing radiation is nowadays one of the most important risks for human health because its exposition can be due to different sources (Ryan, 2012). Among these, ionizing radiation could be from a natural origin, industrial procedures, medical treatments, radiologic accidents and malicious acts such as terrorist attacks. Although different tissues can be affected, the skin is the first line defense organ after radiation exposition because of its barrier separating function between the internal organs of the body and the external environment. In this context, the skin is one of the most easily affected tissues by ionizing radiation due to the existence of continuously proliferating and maturing cells (Prise and Saran, 2011). For this reason, other important tissues such as oral and vaginal mucosa are also extremely sensitive to radiation exposure. Tissue damage might cause morphological and functional changes that can lead to dermatitis and eventually tissue necrosis and ulceration (Olascoaga et al., 2008). In these types of tissues exists local microbiota, which in such conditions of tissue damage, as in the case of radiation exposure, might lead to serious local infections, and even generalized systemic infections by the internalization through the damaged biological surface of this microbiota or other opportunistic pathogens (Barlow et al., 2016).

Antifungal therapy should be considered to prevent infections in patients who have received ionizing radiation to suppress yeast colonization (Dainiak et al., 2011). One of the most common fungal skin infections is candidiasis, and *Candida albicans* the primary etiologic agent (Fernández-Campos et al., 2013). Indeed, candidiasis is the most common fungal infection after radiation or high thermal exposure that could lead to serious complications, or even death (Schaal et al., 2015; Ship et al., 2007; Sroussi et al., 2017).

Clotrimazole (CLT), 1-[(2-chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-imidazole, is a broad-spectrum antimycotic agent with certain activity against Gram-positive bacteria belonging to the azoles group of drugs. It is a very effective drug against yeast and pathogenic dermatophytes and is widely used in the topical treatment of skin, vulvovaginal and oropharyngeal candidiasis (Crowley and Gallagher, 2014). But its use is limited by its poor aqueous solubility which hinders its permeation through skin and mucosae (Suñer et al., 2017). Furthermore, undesired second effects as dysuria and mental depression have been described at high systemic levels (Rudzit, 1978). These particular issues are accomplished by the development of specifically designed drug delivery systems, an area of intense research at present. Among these, polymeric nanoparticles (Esposito et al., 2013; Verma and Ahuja, 2015), solid lipid nanoparticles (Kalhapure et al., 2015; Souto et al., 2004), microcapsules (Yuen et al., 2012), liposomes (Pavelić et al., 2005), gels (Chang et al., 2002) and microemulsions (Zhang and Michniak-Kohn, 2018).

Nanoemulsions (NEs) are nanometric dispersions of two immiscible phases with high solubilizing potential for lipophilic and hydrophilic drugs (Solans et al., 2005), which are widely used in the topical delivery of drug providing a number of advantages such as reduced droplet size, thus large surface area and good tissue contact (Sandig et al., 2013), high drug permeation rate because NE system itself accelerates the drug penetration into the tissue (Fernández Campos et al., 2012), facile and low cost preparation (Yu et al., 2014).

Based on all the above mentioned, and taking into account that not CLT- NE specifically aimed as topical anticandidal agent has still been reported in the literature, the main purpose of this study was the development and characterization of a NE system to increase CLT permeation through the skin and mucosae to achieve high and maintained levels of CLT above the minimum inhibitory concentration (MIC) for an extended period of time without reaching the bloodstream, resulting in a reduction of systemic side effects.

2. Material and methods

2.1. Materials

CLT was obtained from Acofarma (Barcelona, Spain). Capry-locaproyl macrogol-8 glycerides EP (Labrasol[®]), medium-chain triglycerides EP (Labrafac[®] Lipophile), propylene glycol monocaprylate (Capryol[®] 90) and diethylene glycol monoethyl ether (transcutol[®] P) were kindly provided by Gattefossé (Saint-Priest Cedex, France). Propylene glycol was obtained from Fagron Iberica (Terrassa, Spain). Ultrapure water (Ω -1 < 0.07 mS/cm) used in all experiments was self-produced from a Milli-Q[®] system (Millipore Iberica S.A.U., Madrid, Spain). Hank's stock solution was obtained from ThermoFisher Scientific (Barcelona, Spain). Cellulose membranes were supplied by Iberlabo (Madrid, Spain). All other chemicals and reagents used in this study were all of analytical grade and obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Commercial formulations 1% CLT (CR1, Canesten[®] cream) and 2% CLT (CR2, Gine-canesten[®] cream) aimed for skin, and vaginal applications, currently available in the Spanish market were obtained from a local pharmacy.

2.2. Pseudo-ternary phase diagram

Pseudo-ternary phase diagram of labrasol[®]:capryol[®] 90 at fixed mass ratio (4:1) as surfactant and co-surfactant, labrafac[®] lipophile as oil phase, and propylenglycol as aqueous phase were plotted, each of them representing an apex of triangle. Forty six different ternary mixtures with different mass ratios from 2.5% to 95% of each component were assayed.

The required amount of oil and surfactants were weighed accurately, gently heated at 45 °C and sonicated in an ultrasonic bath p-selecta 514 (Vidrafoc, Barcelona, Spain) for 15 min and an intensity of 200 W. Subsequently, the accurately weighed amount of propylenglycol was added and mixed by sonication as described above.

NEs were observed for 24 h. Formulations which showed phase separation were rejected.

Once selected the appropriate NE system the elaboration method was similar to the above mentioned, but the required amount of CLT (1 and 2%, w:v) was included in the oil and surfactant heating step. Equally, 2% CLT solution was also elaborated as reference for buccal and sublingual studies. Briefly, accurate amount of CLT were added to transcutol[®] P:water (70:30, v:v) and then sonicated until complete dissolution.

2.3. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis

A reversed phase HPLC method was developed for analysis of CLT and validated according to the ICH guidelines, Q2(R1). The HPLC system consisted of a Waters 515 pump (Waters, Milford, MA, USA) equipped with UV-VIS 2487 detector (Waters, Milford, MA, USA) set at 254 nm. A reverse-phase WAT046980 - Symmetry C18 column (Waters, Milford, MA, USA) at a flow rate of 1.0 mL/min was used for the chromatographic separation. The mobile phase consisted of methanol:dibasic potassium phosphate buffer, pH 7.0 (75:25, v/v). The injection volume was 10 µL, and total run time was 10 min.

The method was linear ($r^2 = 0.9999$) in the concentration range of 0.625 – 20 µg/mL. The detection and quantification limits (LOD and LOQ) found for the validated method were 0.21±0.13 µg/mL and 0.62±0.39 µg/mL, respectively. The method was found to be accurate, precise and robust as percent relative standard deviation was consistently <2%.

2.4. Physicochemical characterization

2.4.1. Visual characterization

In order to detect macroscopic instabilities such as creaming or phase separation, as well as physical parameters such as appearance in terms of color, odor and visual consistency the NEs were monitored macroscopically immediately after their preparation and over the whole observation period.

2.4.2. Transmission electronic microscopy (TEM)

The morphometrical characterization of NEs was addressed by TEM using a JEOL 1010 microscope (JEOL Inc., Peabody, MA, USA). One drop of sample was deposited on copper grids covered with a layer of Formvar standing for 4min. Subsequently, the grids were washed twice with distilled water. The excess of water was removed by touching the grid to a filter paper. The grids were later stained with one drop of 2% uranyl acetate solution and allowed to dry for 5 min before examination under the electron microscope.

2.4.3. Dynamic light scattering (DLS) measurements

The average droplet size ($Z\text{-ave}$) and its distribution expressed as polydispersity index (PI) of developed CLT-NEs were directly recorded at 25.0 ± 0.5 °C by DLS using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD) of three replicates.

2.4.4. Surface electrical properties

The zeta potential (ZP) of CLT-NEs was measured at 25.0 ± 0.5 °C from the electrophoretic mobility by electrophoretic light scattering (ELS) using a Zetasizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Furthermore, the surface electrical properties of CLT-NEs as a function of pH variation (from 4 to 8, and under a constant 10^{-3} M KNO_3 concentration). Values are reported as the mean \pm SD of six replicates.

2.4.5. pH and conductivity measurements

The pH values of CLT-NEs were determined using a calibrated digital pH meter GLP 22 (Crison Instruments, Alella, Spain) at 25.0 ± 0.5 °C. The measurements were conducted by direct immersion of the device electrode in the sample contained in a glass vials. Electrical conductivity of NEs was measured with a conductivity meter Crison GLP 30 (Crison Instruments, Alella, Spain). An electrode of the device was dipped into a glass vial of the sample. Data were expressed as mean \pm SD of nine replicates.

2.5. Rheological study

Rheological study of CLT-NE was performed using a Haake Rheostress rheometer (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) connected to a thermostatic circulator Thermo Haake Phoneix II + Haake C25P to assure constant temperature during the experiments. The tests were executed with a Haake Reowin[®] Job Manager v. 3.3 software (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Germany) and data was analyzed with a Haake Reowin[®] Data Manager v. 3.3 software (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Germany). Steady-state test was performed with cone-plate geometry (0.105 mm gap) with a fixed lower plate and a mobile Ti upper cone Haake (60 mm diameter, 2° angle) at 25 ± 0.2 °C. Rotational measurement was conducted at different schedules of shear rates, from 0 to 100 s^{-1} for 3 min, at 100 s^{-1} for 1 min, and finally from 100 to 0 s^{-1} for 3 min. Steady-state viscosity was recorded from the constant shear phase at 100 s^{-1} .

2.6. Extensibility (spreadability) test

Samples (0.7 g) were placed within a circle premarked on a glass plate over which a second glass plate was placed, as centered as possible, without sliding of the plates. Force was generated onto the upper plate by adding known weights (10-500 g), so the sample was compressed to uniform thickness. After 60 s, the weights were removed and the area of the sample was recorded. Each sample was tested in triplicate for each weight at room temperature. The results were expressed in terms of the spreading area as a function of the applied mass according to the following equation:

$$S = d^2 \times \pi/4 \quad (1)$$

in which S is the spreading area (cm²) resulting from the applied mass (g), and d is the mean diameter (cm) reached by the sample. Finally, the spreadability results were fitted to mathematical equations (Boltzmann, hyperbola one site and hyperbola two sites). The goodness of the fitting was confirmed by the coefficient of determination (r^2).

2.7. Stability studies

Multiple light scattering technique was used to predict the physical stability of the formulations by means of the Turbiscan[®] Lab Expert (Formulation, L'Union, France) Each sample (20 mL) was placed in a cylindrical glass tube. The detection head was composed of a pulsed near-infrared light source ($\gamma = 880$ nm) for 24 h at 25 ± 0.5 and two synchronous detectors: transmission (T) for transparent/translucent samples and backscattering (BS) for opaque samples. The T detector receives the light which crosses the sample (at 180° from the incident beam), while the BS detector receives the light scattered backwards by the sample (at 45° from the incident beam).

Furthermore, physicochemical parameters, as well as macroscopic aspect were analyzed after 6 months storage at room temperature.

2.8. Drug release and kinetic evaluation

Vertical Franz diffusion cells of 12 mL of receptor compartment capacity were utilized for the release studies (FDC 400; Crown Glass, Somerville, NJ, USA) with a diffusion area of 0.64 cm². Dialysis cellulose membranes (12-14 kDa MWCO) were selected and placed between the donor and the receptor chambers. Methanol:potassium hydrogen phosphate solution (75:25, v/v) was used as receptor medium under continuous stirring (600 rpm) at 32 ± 0.2 °C by circulating water. These conditions allowed the maintenance of sink conditions. Testing samples were added to the donor compartment. Aliquots of 300 μ L were withdrawn from the receptor chamber at pre-established times for 54 h and replaced immediately with the same volume of tempered receptor medium. The CLT content was analyzed by HPLC (see Section 2.3). Results are reported as the mean \pm SD of six replicates.

Data obtained from the release study was plotted as a function of time. A nonlinear least-squares regression was performed using the Prism[®], v. 3.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Four different kinetic models were fitted to discern the model that best described the release pattern of the formulation (zero order, first order, hyperbola, and Higuchi model).

$$\text{Zero order: } \%R_t/\%R_\infty = k \times t \quad (2)$$

$$\text{First order: } \%R_t/\%R_\infty = 1 - e^{-k \times t} \quad (3)$$

$$\text{Hyperbola: } \%R_t/\%R_\infty = R_\infty \times \frac{t}{(k + t)} \quad (4)$$

$$\text{Higuchi: } \%R_t/\%R_\infty = k \times t^{1/2} \quad (5)$$

Where $\%R_t$ is the drug released (%) at time t , $\%R_\infty$ is the total drug released (%), $\%R_t/\%R_\infty$ is the fraction of drug released at time t , k is the release rate constant. The best fit was estimated according to the Akaike's information criterion (AIC) which was used as discriminatory indicator. The smaller the value of AIC, the better the model adjusts the data.

2.9. Permeation studies

2.9.1. Biological tissues

Human skin samples of the abdominal region of healthy women patients (~40 years old, $n=3$) were obtained after plastic surgery from the Barcelona SCIAS Hospital (Spain). The experimental protocol was approved by the Bioethics Committee of the Barcelona SCIAS Hospital and written informed consent forms were provided by volunteers.

Buccal, sublingual and vaginal samples were extracted from 3-4-month-old female pigs (weight 30–40 kg, $n=3$) following the protocol approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Barcelona (Spain) and the Committee of Animal Experimentation of the regional autonomous government of Catalonia (Spain). The surgical procedure was performed by a veterinarian at the Animal Facility at Bellvitge Campus (University of Barcelona, Spain) after the animals had been sacrificed using an overdose of sodium thiopental anesthesia.

Tissues were placed in Hank's balanced salt solution (HBSS) and refrigerated until its use no later than 24 h after extraction. Tissues that were not utilized were cryopreserved for further studies (Amores et al., 2014). The skin was cut to 400 ± 50 μm thick sheets, porcine buccal mucosa to 500 ± 50 μm , porcine sublingual and vaginal mucosae were cut to 300 ± 50 μm using an electrical dermatome (GA 630, Aesculap, Tuttlingen, Germany) and trimmed with surgical scissors in adequate pieces. The majority of the underlying connective tissue was removed with a scalpel.

2.9.2. Franz diffusion cells

Permeation study of CLT was performed in vertical Franz diffusion cells with diffusion area of 2.54 cm^2 and 0.64 cm^2 for skin and mucosae, respectively. Prior to conducting the experiments, the diffusion cells were incubated for 1 h in a water bath to equalize the temperature in all cells. Biological tissues were mounted with the epithelium faced the donor chamber and the connective tissue region facing the receiver compartment avoiding bubbles formation. The receptor medium was ethanol:water:transcutol[®] P (50:40:10, v:v:v) kept under stirring at 600 rpm by a small Teflon[®] coated magnetic stir bar which was used to ensure that the fluid in the receptor compartment remained homogenous during the experiments. Cells temperature was controlled at 32 ± 0.2 °C and 37 ± 0.2 °C for skin and mucosae, respectively by a circulating water bath guarantying sink conditions. Testing samples were placed in the donor compartment (and covered with parafilm to avoid evaporation). 300 μL aliquots were withdrawn from the receptor compartment at fixed times (for 48 h and 6 h, skin and mucosae respectively) and replaced by an equivalent volume of receptor medium at the same temperature. The CLT permeated through biological tissues was then quantified by HPLC (see Section 2.3). Results are reported as the mean \pm SD ($n=6$).

2.9.3. Drug remaining recovery

When permeation test was finished, tissue membranes were dismantled and cleaned with gauze soaked in 0.05% solution of sodium dodecyl sulfate and washed in distilled water. The

permeation areas were then excised and weighed. CLT retained in skin and mucosae was extracted using ethanol:water:transcutol[®] P (50:40:10) extraction medium during 20 min under sonication in an ultrasound bath. The resulting solutions were measured by HPLC yielding the amount of CTL retained in tissues (Q_r , $\mu\text{g}\cdot\text{g}\cdot\text{cm}^2$).

2.9.4. Permeation parameters

The cumulative amount of CLT permeated (Q_t) through biological membranes was plotted as function of time. The slope and intercept of the linear portion of the plot was derived by regression using the Prism[®], V. 3.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

CLT fluxes (J , $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) through the biological tissues were calculated from the slope of linear portion of the cumulative amounts permeated through the biological membrane per unit surface area versus time plot, and the extrapolation of this line will intercept with the X-axis at a time equal to lag time (T_L , h).

The permeability coefficients (Kp , cm/h) were obtained by dividing the J by the initial drug concentration (C_0) in the donor compartment, and it assumed that under sink conditions the drug concentration in the receiver compartment is negligible compared to that in the donor compartment.

Once parameters J_s , T_l and Kp are calculated, partition parameter P_l (cm) and the diffusion parameter P_2 (h^{-1}) were also obtained as reported in previous studies (Sanz et al., 2017). The predicted steady-state plasma concentration (C_{ss}) of CLT, that would penetrate skin and mucosae barriers after topical application, was obtained using the following equation:

$$C_{ss} = \frac{J \times A}{Clp} \quad (6)$$

where C_{ss} is the plasma steady-state concentration, J the flux determined in this study, A the hypothetical area of application and Clp the plasmatic clearance.

2.10. Antifungal efficacy

The minimal inhibitory concentration (MIC) of blank NE, CLT-NE and references was calculated by the broth microdilution method against *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 66032 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 strains (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) following the European Committee for antimicrobial susceptibility testing guidelines (EUCAST, 2008). The yeast strains were first cultured on Sabouraud Dextrose agar (Invitrogen, Madrid, Spain) at 30 °C for 48 h before testing. Yeast suspensions were prepared by suspending colonies in sterile Ringer's solution to 2 McFarland standards counted in a Neubauer (1 to 5×10^6 colony-forming units, CFU/mL). Yeast inoculums were prepared by diluting yeast suspensions 1/10 in Ringer's solution. The MIC was calculated using microdilution plates with RPMI-1640 2% G medium (Invitrogen, Madrid, Spain). The pH was adjusted to 7.0 with 1 M sodium hydroxide and final solution was filtered using a 0.22 μm filter. As samples were not sterile, chloramphenicol was added to the RPMI medium (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Test samples were prepared in RPMI-1640 double strength and diluted three times with the same solvent up to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration was achieved. CLT serial dilutions from 250 to 0.0019 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of formulations were distributed in microdilution plates. Finally, 100 μL of yeast suspension was added to each well including a growth control of yeast (containing inoculum and RPMI medium), drug-free medium (containing only RPMI medium double strength) and RPMI medium. Microdilution plates were

incubated at 37 °C, and then read at 48 h in a spectrophotometer Synergy-HT (Biotek, Winooski, VT, USA) at 620 nm.

2.11. *In vivo tolerance study*

Ten female volunteers with healthy skin between 25-38 years old participated in the study. The study was previously approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona according to the recommendations of the Declaration of Helsinki (WMA, 2013). All participants signed written informed consent forms. Volunteers did not use skin-care cosmetics on the test areas during two days before the study. The volunteers stayed in the test room for at least 20 min prior to the measurements. Baseline readings were recorded before applying the CLT-NE. Subsequently after sample application (0.5 mL/cm², CLT-NE2), the readings were made at 0, 2, 4 and 6 h, from the flexor side of the left forearm.

Skin temperature, trans epidermal water loss (TEWL) and *stratum corneum* hydration (SCH) values were measured using a Skin Thermometer[®] ST500, a Tewameter[®] TM 300 and a Corneometer[®] CM 825 (Courage-Khazaka electronic GmbH, Cologne, Germany), respectively, according to published guidelines (du Plessis et al., 2013).

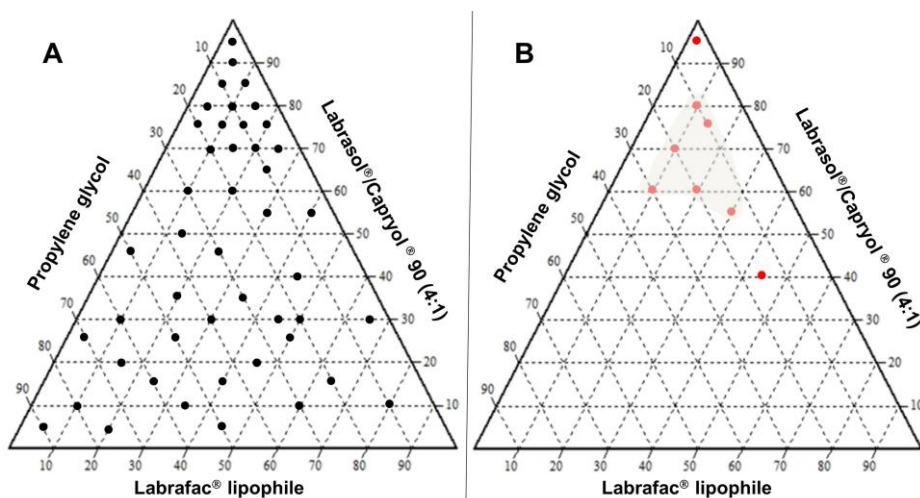
2.12. *Statistical analysis*

The comparison and analysis of results from different groups were carried out by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey multiple comparison test. Permeation parameters were compared by non-parametric analysis using the Mann Whitney test. The Prism[®], v. 3.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) was used for these analyses. Differences were considered significant if $p < 0.05$.

3. Results

3.1. *Pseudo-ternary phase diagram and characterization*

Fig. 1A shows the pseudoternary phase diagram of the 46 assayed drug-excipient blends to reach the maximum coverage ratio for the study and delineate the boundaries of phases formed. From these, 8 mixtures exhibited the best values of appearance (isotropic transparent phase) and lack of signs of instability such as phase separation, after 24 h elaboration, which are depicted in Fig. 1B. It can be observed the area of best emulsification properties.



Resultados

Fig. 1. Phase diagram of labrafac[®] lipophile (oil phase), labrasol[®]/capryol[®] 90 (4:1) (surfactant/co-surfactant) and propylene glycol (hydrophilic phase) of 46 mixtures (A). Phase diagram of 8 mixtures showing the best emulsification properties (B), grey area stands for the main nanoemulsion region.

Table 1 summarizes the compositions, Z-ave and PI of NE that showed best emulsification properties. From these formulations, the NE composed of 10% Labrafac[®] lipophile, 60% labrasol[®]:capryol[®] 90 mixture (ratio 4:1) and 30% propylene glycol was selected for further studies based on its Z-ave and PI. CLT was then incorporated to this selected vehicle at 1% and 2% (w/v) and characterized.

Table 1

Composition, droplet size and polydispersity index (PI) of the developed nanoemulsion formulations that showed best emulsification properties (mean \pm SD, n = 3).

Labrafac [®] lipophile (%)	Labrasol [®] :Capryol [®] 90 (4:1) (%)	Propylene glycol (%)	Size (nm)	PDI
2.5	95	2.5	191.73 \pm 44.50	0.71 \pm 0.12
10	80	10	159.87 \pm 34.61	0.63 \pm 0.17
15	75	10	163.93 \pm 50.12	0.74 \pm 0.13
10	70	20	148.43 \pm 20.47	0.37 \pm 0.12
10	60	30	134.87 \pm 23.60	0.42 \pm 0.16
20	60	20	163.27 \pm 21.38	0.41 \pm 0.08
30	55	15	272.45 \pm 58.84	0.85 \pm 0.15
45	40	15	393.20 \pm 62.27	0.66 \pm 0.20

3.2. Characterization of CLT-NEs

The selected CLT-NEs were homogenous, transparent and did not present signs of precipitation of drug. As can be observed in Fig. 2, the TEM images ascertained the suitability of the elaboration method showing spherical shaped droplets of 170 nm approximately. DLS measurements of CLT-NE1 and CLT-NE2 showed Z-ave values of 153 \pm 17.25 and 186 \pm 15.38 nm, with PI values of 0.37 \pm 0.15 and 0.41 \pm 0.23, respectively. While ZP values were -7.11 \pm 1.00 and -5.61 \pm 1.13 mV and pH 5.71 \pm 0.05 and 5.72 \pm 0.04, respectively.

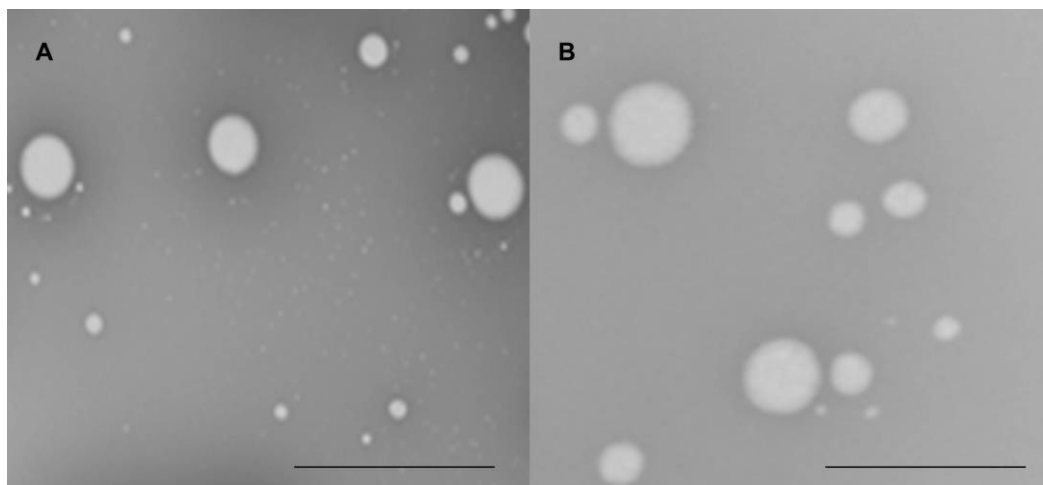


Fig. 2. Transmission microscopy image of developed NEs. CLT-NE1 24 h after preparation (A). CLT-NE2 24 h after preparation (B). Bar length 500 nm.

The electrophoretic characterization of the CLT-NEs is depicted in Fig. 3. No differences were observed between blank and CLT loaded NEs. The investigation into the electrokinetic properties of the droplets evidenced a slight increase of negative ZP when pH increased in blank-NE and CLT-NEs.

The conductivity values of samples were $57.63 \pm 0.02 \mu\text{S}/\text{cm}$, $58.81 \pm 0.16 \mu\text{S}/\text{cm}$, $60.35 \pm 0.12 \mu\text{S}/\text{cm}$ for blank-NE, CLT-NE1 and CLT-NE2, respectively, confirming the sign of the system as an O/W system.

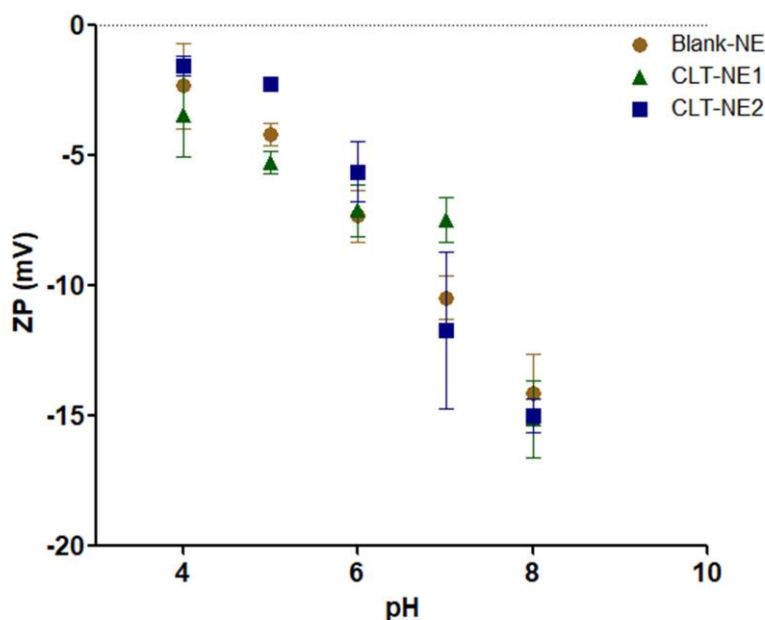


Fig.3. Zeta potential (ZP, mV) of NEs as a function of pH in the presence of 10^{-3} M KNO_3 concentration at 25.0 ± 0.5 °C. Values are given as mean \pm SD (n=6).

3.3. Rheological and extensibility studies

The CLT-NEs exhibited typical Newtonian profiles, in which the shear stress-shear rate relationship (flow curve) was linear whereas the viscosity remained constant (Figure S1). Viscosities values at 100 s^{-1} were $42.14 \pm 0.037 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ and $41.35 \pm 0.041 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ for CLT-NE1 and CLT-NE2, respectively.

Besides, in Figure S1 is also shown the extensibility results of formulations. No differences were recorded among developed NEs, which exhibited much higher extensibility properties than commercial counterparts. The hyperbola two site binding model was the model with the best adjustment quality ($r^2 > 0.99$).

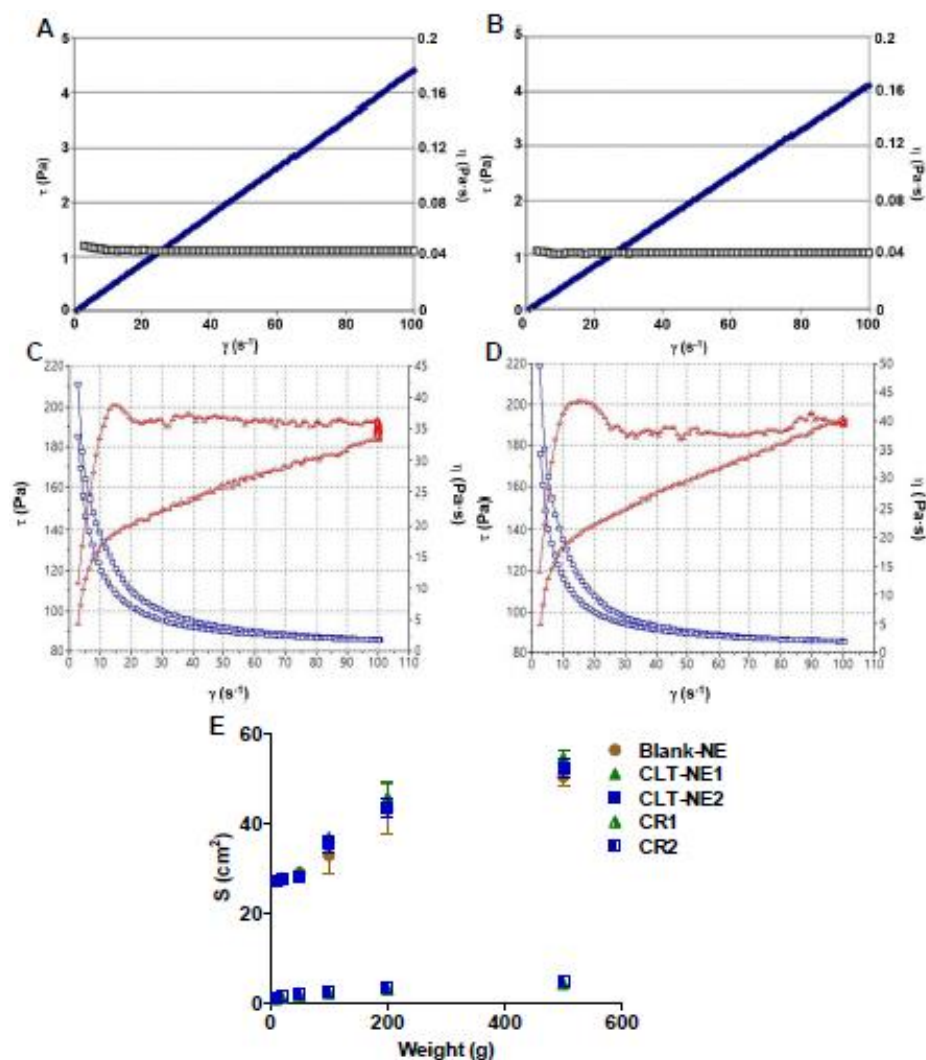


Fig. S1. Viscosity curves and flow curves of samples 24 h after preparation at 25 ± 0.2 °C of CLT-NE1 (A); CLT-NE2 (B); CR1 (C); and CR2 (D). Spreading area (S , cm²) as a function of the applied mass (g) at room temperature. Values are given as mean \pm SD ($n=3$) (E).

3.4. Stability

Fig. 4 shows the T profiles at room temperature of developed CLT-NEs for 24 h. The left side of the plot corresponds to the bottom of the vial, while the right side to the top. Peaks at the bottom and the top of the vial are due to the meniscus made by the sample in contact with the glass. A constant T signal near to 100% is clearly observed. On the other hand, the macroscopic observations to the naked eye assured monophasic systems without phase separation, no drug precipitation, creaming or change of appearance in any sample after 180 days. No significant variations of Z-ave, ZP or pH values were recorded over time (180 days). In this line, conductivity and viscosity values also remained constant during the 180 days of study.

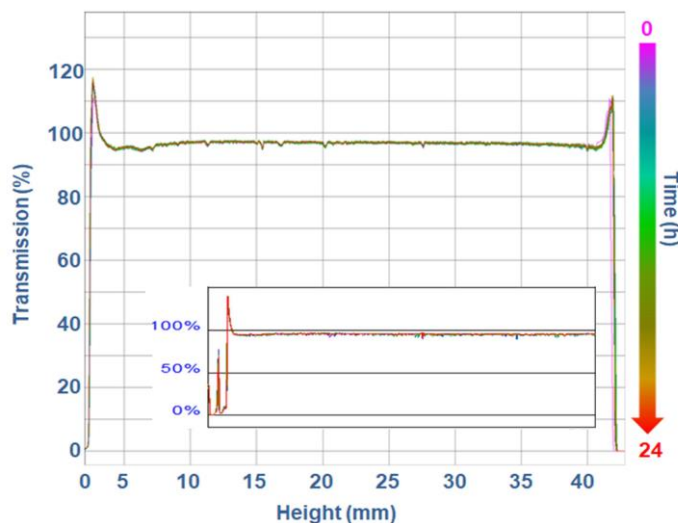


Fig. 4. Transmission profile of CLT-NE1 obtained by the turbiscanLab[®]. The left side of the curve corresponds to the bottom of the vial, whereas the right side corresponds to the sample behavior on the top. The insert corresponds to the transmission profile of CLT-NE2.

3.5. Drug release

A slight but higher CLT release profile was obtained from CLT-NE2 than CLT-NE1 as shown in Fig. 5, with maximal CLT release amounts of $691.1 \pm 20.78 \mu\text{g}$ and $608.4 \pm 39.06 \mu\text{g}$, respectively offering sustained release. The model that statistically best described the drug release mechanism was the first order model according to equation (3) with k values of 0.048 ± 0.008 and $0.054 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$ for CLT-NE1 and CLT-NE2, respectively.

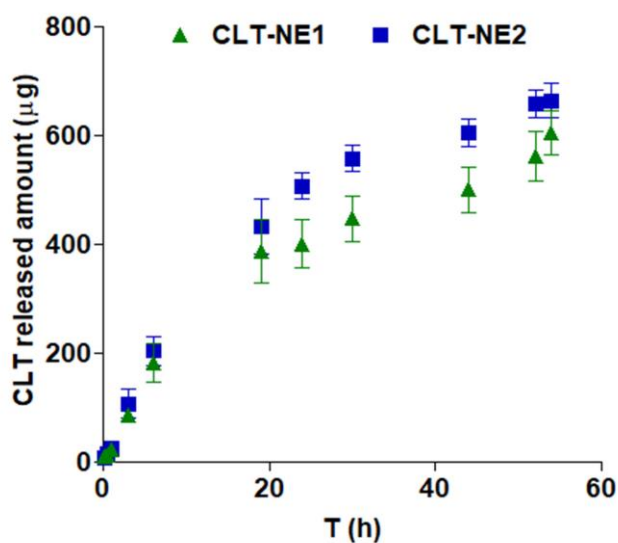


Fig. 5. Cumulative amounts of CLT released from NEs at $32 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$. Data represent mean \pm SD ($n = 3$).

3.6. *Ex vivo* permeation experiments

As shown in Fig. 6A the permeation profiles of CLT-NE1 and CR1 through human skin are similar. Additionally, in Table 2 are reported the median permeation parameters. No statistically differences were observed among permeation values nor retained amounts between CLT-NE1 and commercial reference ($p > 0.05$).

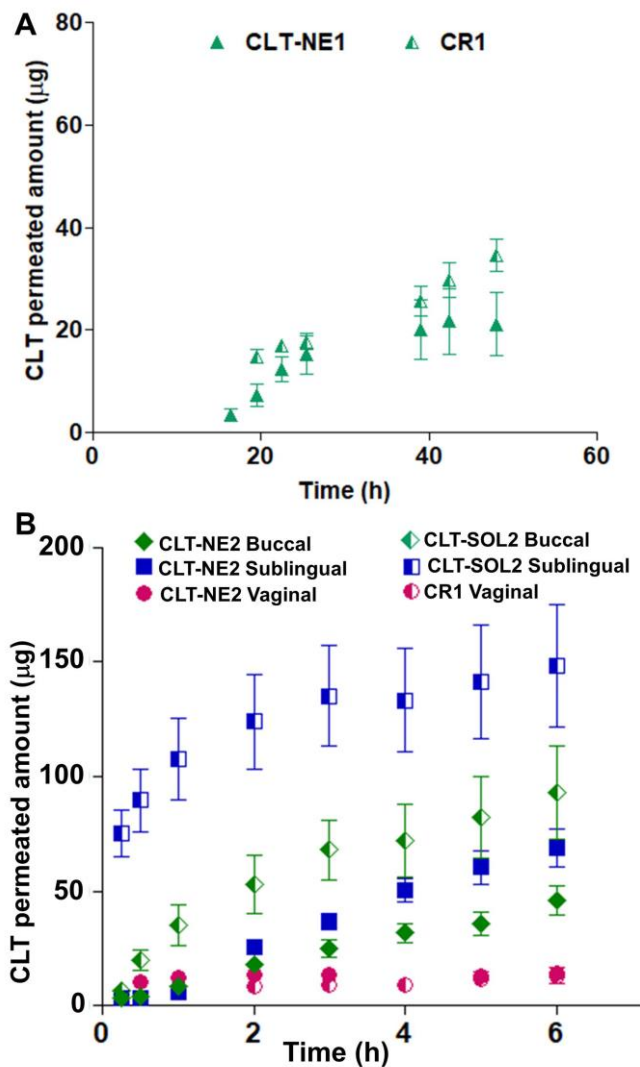


Fig. 6. Cumulative amounts of CLT permeated through biological tissues from samples. CLT-NE1 and CLT-CR1 through human skin membranes at 32 ± 0.2 °C (A). CLT-NE2, CLT-CR2 and CLT-SOL2 through porcine sublingual, buccal and vaginal membranes at 37 ± 0.2 °C (B). Data represent mean \pm SD (n= 6).

On the other hand, regarding mucosae permeation profiles, Fig. 6B shows the higher permeation profiles of CLT-SOL2 through the sublingual and buccal mucosae, respectively, followed by the CLT-NE2 through sublingual and buccal mucosa. Permeation parameters are also reported in Table 2. The J values of CLT were higher for reference formulation (CLT-SOL2) when compared with CLT-NE2. Contrary, in the case of the vaginal route, the J of CLT was higher for CLT-NE2 regarding CR2. In all cases amounts remaining in the biological membranes were higher for CLT-NE2 than references. Values of T_L could not be calculated from the experimental data, nor therefore P_2 and P_1 for reference in sublingual mucosa and in any case in the vaginal mucosa. Besides that, the theoretical C_{ss} that CLT would reach, taking into account an application area of 80 cm² for skin, 20 cm² for buccal mucosa, 15 cm² for sublingual mucosa and 100 cm² for vaginal mucosa, as well as a plasmatic clearance of 78.48 L/h (Rifai et al., 1995) are provided in Table 2.

Table 2

Median (maximum and minimum) values of retained amount (Q_r), flux (J), lag time (T_L), partition parameter P_1 , diffusion parameter P_2 , permeability coefficient (Kp), as well as theoretical steady-state plasma concentration (C_{ss}) of CLT from samples trough human skin, porcine buccal, sublingual and vaginal mucosa.

Parameters	CLT-NE1 skin	CR1 skin	CLT-NE2 Buccal	CLT-SOL2 Buccal	CLT-NE2 Sublingual	CLT-SOL2 Sublingual	CLT-NE2 Vaginal	CR2 Vaginal
Q_r ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{g}$)	16.92 (4.26-22.54)	22.72 (12.13-33.02)	333.53 (291.24-378.12)	172.73 ^a (156.02-198.47)	228.15 (221.23-281.26)	143.67 ^b (119.73-184.15)	176.70 (153.41-194.23)	35.83 ^c (16.35-52.61)
J/Sup ($\mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{cm}^2$)	0.53 (0.09-1.01)	0.55 (0.49-0.65)	13.34 (11.27-14.80)	53.26 ^a (44.56-64.11)	18.50 (5.37-19.81)	61.70 ^b (49.67-83.58)	8.38 (6.61-9.44)	2.83 ^c (2.51-3.92)
T_L (h)	13.85 (11.27-15.78)	12.69 (11.25-13.12)	0.01 (0.01-0.02)	0.02 (0.01-0.05)	0.14 (0.12-0.23)	—	—	—
$P_2 \times 10^{-1}$ (h^{-1})	0.12 (0.10-0.15)	0.13 (0.12-0.15)	138.90 (66.67-151.51)	83.33 (33.33-166.67)	11.90 (7.25-14.12)	—	—	—
$P_1 \times 10^{-3}$ (cm)	4.37 (0.64-9.58)	4.22 (3.32-5.08)	0.05 (0.04-0.11)	0.32 ^a (0.19-0.66)	0.78 (0.70-1.47)	—	—	—
$Kp \times 10^{-5}$ (cm/h)	5.26 (0.94-10.12)	5.54 (4.92-6.45)	66.72 (56.3-74.00)	266.33 ^a (222.81-320.55)	99.06 (92.50-106.64)	308.51 ^b (248.36-417.89)	41.92 (33.05-47.19)	14.15 ^c (12.58-19.61)
$C_{ss} \times 10^{-3}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.53 (0.09-1.02)	0.56 (0.49-0.65)	3.36 (2.28-3.72)	13.40 ^a (11.21-16.13)	3.74 (3.49-4.02)	11.64 ^b (15.77-9.37)	10.55 (8.32-11.87)	3.56 ^c (3.15-4.93)

Statistically significant differences ($p < 0.05$) regarding: ^a CLT-NE2 buccal mucosa; ^b CLT-NE2 sublingual mucosa; ^c CLT-NE2 vaginal mucosa

3.7. Evaluation of the anti-Candida activity

The MICs values from the *in vitro* susceptibility test after 48 h are reported in Table 3. NE systems without CLT exhibited no toxicity against yeasts. In all cases MIC values of CLT in NE were lower than their commercial references counterparts and free CLT in solution.

Table 3

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values of CLT ($\mu\text{g}/\text{mL}$) from samples against different *Candida* strains after incubation at 37 °C for 48 h (n=3).

	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	<i>Candida parapsilopsis</i> ATCC 22019
Blank-NE	—	—	—
CLT-NE1	0.1220	0.2441	0.1220
CR1	0.2441	7.8125	3.9062
CLT-NE2	0.0038	0.2441	0.4882
CR2	0.1220	7.8125	0.9765
CLT-SOL02	0.4882	7.8125	1.9531

3.8. Skin tolerance study

The results of evaluated biomechanical parameters before (baseline) and after application at different time intervals are depicted in Fig. 7. Changes on TEWL values were recorded after 6 h of application. Equally, skin temperature also evidenced variations after 2 h and 6 h of application. Finally, SCH variations were exhibited just after application and after 2h.

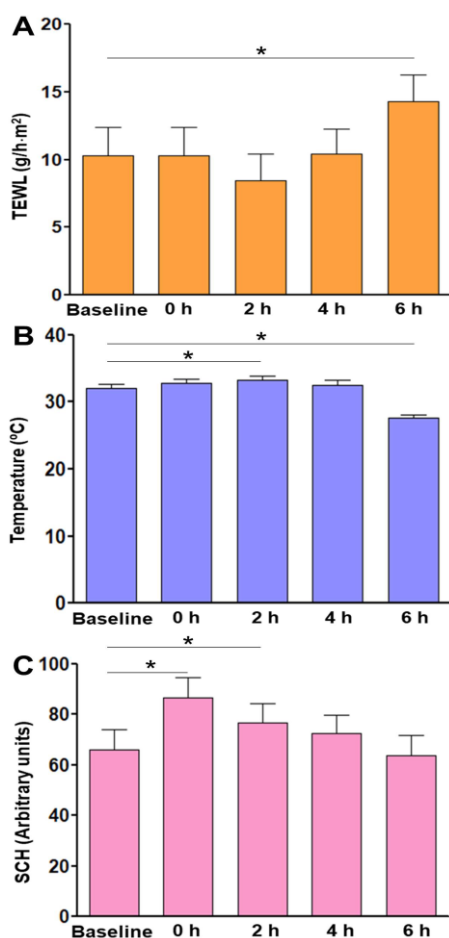


Fig. 7. Change in TEWL value before and after application of CLT-NE1 to the left forearm of volunteers (A). Change in temperature value (B). Change in SCH value (C). Bars represent mean±SD (n= 10). Statistically significant differences (*), p<0.05.

4. Discussion

The major drawback of topical drug delivery is the permeation through the skin or mucosa barrier to reach an effective concentration to achieve the required therapeutic effect at the site of action (Parra et al., 2016). Moreover, the CLT low aqueous solubility constrains its permeation through biological membranes. NEs improve solubility, absorption and diffusion of drugs. Successful therapy using topical application is dependent on the physicochemical characteristics of drug, skin permeability, and the chemical composition, as well as the physical properties of the carrier (Marwah et al., 2016). Therefore NEs can constitute a promising strategy for drug delivery, especially in dermatology.

All the components of the NE are non-toxic and were selected based on the ability to solubilize CLT and skin or mucosae compatibility. Labrafac[®] lipophile was chosen as oil phase, propylenglycol as hydrophylic phase and labrasol[®]:capryol[®] 90 at fixed mass ratio (4:1) as surfactant and co-surfactant. Concretely, labrafac[®] lipophile and labrasol[®] possess low irritability when are used in topical systems loading other antifungal drugs (Fernández Campos et al., 2012). Phase diagrams were constructed in the absence of CLT to identify the formulation with the best properties which was then chosen from the diagram (Fig. 1B) in an attempt to optimize the formulation. After elaboration, the droplet size measurement and morphometrical observation were required to confirm the production of the NE. So, nano-sized droplets were obtained which was confirmed by TEM which was in agreement with the results obtained by LD (Table 1 and Fig. 2). CLT was included in the NEs at two concentrations, 1% and 2% aimed for skin and mucosae, respectively, similarly to the current commercially available topical formulations of CLT in the Spanish market.

Fig. 2 shows the TEM images of the obtained nanosystems. The staining agent revealed the polar areas (dark) indicative of the external aqueous phase and denoting an O/W system which is preferably for the inclusion of lipophilic drugs, whereas W/O systems seem to be a better choice for hydrophilic drugs (Azeem and Rizwan, 2009). Conductivity of NEs also confirmed the phase system as O/W, since water in the external phase makes the system highly conducting. The images also showed spherical shaped droplets with sizes in accordance with DLS results. The inclusion of CLT in the NE involved the increase of the droplet size. This indicates that the incorporation of drug molecules interacts with the structure of the system. This is a general phenomenon observed with several drugs particularly when the molecule possesses amphiphilic and/or mesogenic properties (Alvarado et al., 2018; Souto et al., 2004).

The ZP potential measurements of NEs were negative and not revealed differences between blank NE and loaded NE evidencing an efficient entrapment of CLT within the oil phase. In this context, the pH has been reported to determine the electrokinetic properties of colloids (Pretel et al., 2017). As shown in Fig. 3 the electrokinetic properties of NEs showed dependence on the pH. As pH values varied from 4 to 8 the ZP became higher (absolute values) and thus it will not affect the stability of the formulation because higher values of ZP contribute to higher degree of repulsion between droplets with similar charge. The increasingly negative values may result from increasing OH⁻ ion concentration in the solution, which tends to favor a gain in H⁺. The pH is also an important factor to avoid skin irritation or bacterial infection (Brugués et al., 2015). The pH of NEs was ~5.7 which is a biocompatible value (Sierra et al., 2013).

Rheological characterization is another aspect to keep in mind in formulations aimed for topical administration. Rheology properties can modulate biopharmaceutical properties such as release rates, as well as the widespread application in the affected areas (Sosa et al., 2017).

The NEs exhibited Newtonian behavior with low values of viscosity. This Newtonian behavior facilitates its application as spray or roll-on. In the treatment of fungal infections this property is of crucial importance because in cases of infections affecting large areas of skin a spray can be applied on the entire surface without rubbing, avoiding the spreading to other areas (Martín-Villena et al., 2013). Contrary, commercial references exhibited a non-Newtonian pseudoplastic behavior with much higher viscosity values, as expected because are creams (Figure S1). These rheological properties are closely related to extensibility of formulations. As expected, extensibility values of NEs were higher than commercial references because of their smaller viscosities (Figure S1), which facilitates the application on the skin or mucosae, especially in anatomical zones that are difficult to apply such as the vaginal mucosa. Formulations with low viscosity and thus higher extensibility can be easily spread within the vaginal and buccal cavities facilitating the contact with the epithelium (Brugués et al., 2015).

As our results demonstrated NEs were stable. The physical stability studies did not detect signs of destabilization of the system (creaming, sedimentation, flocculation or coalescence). Variations exceeding 10% in the T signals would be indicative of instability. However, as shown in Fig. 4, the T signals in both cases remained constant throughout the study confirming the stability of the system. In this context and despite the low ZP value, the NEs exhibited good stability, remaining almost unchanged during the 6 months of storage. This phenomenon could be explained if the droplets are sterically stabilized by the presence of the higher content of the labrasol[®], a water dispersible nonionic surfactant composed mainly of polyethylene glycol PEG-8 mono- and diesters of caprylic (C8) and capric (C10) acids and a small fraction of mono-, di- and triglycerides. This involves chains of PEG on the O/W interface that prevent droplet from coming into close contact. This is enough to keep the droplets separated by steric repulsions and in those separations the Van der Waals forces are too weak to cause the droplets to adhere.

The performance of *in vitro* release data reveal important information about the drug delivery system that could be used as quality control data to predict *in vivo* behavior and to delve further into the analysis of the mechanisms involved (Alvarado et al., 2015). In this context, after topical application of a drug delivery system to the skin or mucosa surface, the first process to occur is the drug release from the delivery system before permeation through the biological tissue. The knowledge of how this process takes place is necessary for the evaluation of therapy for local dermatologic diseases, and concretely, the amount of drug which is available for diffusion per unit area of application. For this task, a mathematical model describing drug release from the delivery system is frequently utilized, although the complete description of the release process by mathematical models is difficult due to the variety of physical variable that should be taken into account (Sierra et al., 2013). However, the usage of empirical models provides valuable information by simple fitting of experimental data to equations. In our case the first order mathematical model was the model that statistically best described experimental data. This means that the CLT release from NE followed a concentration gradient pattern, based on the first Fick's law, where the released amounts are directly proportional to the amounts remaining into the dosage form offering sustained release.

A comprehensive study of the release and permeation rate represents a genuine quality control during development phase (Gimeno et al., 2014). Moreover, *ex vivo* percutaneous studies are necessary because they are the most relevant models for preclinical development and optimization of drug formulations (Parra et al., 2016). The permeation profiles through skin and mucosae were analyzed on the basis of a diffusion model for an infinite dose

condition. In general, no significant differences were observed between permeation profiles of CLT-NE1 and CR1 (Fig. 6A), consequently significant differences were not obtained in permeation parameters nor skin retained amounts as shown in Table 2.

Additionally, in any case significant systemic concentrations CLT were expected to reach according to C_{ss} calculations. As expected, CLT was poorly absorbed following skin application. In the case of permeation through mucosae, and concretely sublingual and buccal mucosae (Fig. 6B), our results showed higher permeation profiles for references. As mentioned previously, P_1 and P_2 could not be calculated (for reference in sublingual and in any case in the vaginal mucosa) because of the impossibility of extrapolating the intercept with the X-axis of the plot (Fig. 6B). Although this missing T_L times are unusual, similar plots have been reported in the literature (Hoppel et al., 2014; Singh et al., 2005). Since 2% CLT commercial formulations aimed for sublingual and buccal application were available in the Spanish market, 2% CLT solution (transcutol® P:water,70:30) was utilized as reference (CLT-SOL2). This was the main reason why permeation values (J and Kp) were higher than CLT-NE2. Transcutol® P besides possessing excellent solubilizing properties and biocompatibility with mucosae, it is a well-known transdermal permeation enhancer (Fernández Campos et al., 2012). On the contrary, in the case of vaginal mucosa permeation study, in which a commercial reference was utilized, J and Kp values of our developed formulation were significantly higher than commercial reference.

Conversely, retained CTL retained amounts in mucosae were significantly higher for CLT-NE2 than references in all cases, included vaginal mucosa (Table 2). It might be attributed to the NE system itself. NEs have a remarkable ability to enhance skin transdermal permeation of poorly soluble drugs (Fernández-Campos et al., 2013). This action could provide a stronger antimycotic action of CLT because a higher amount can be available at the site of action, preventing from the dissemination of infections in compromised patients. According to C_{ss} values CLT-NE2 can be considered as safe and no side effects could be expected to occur because these values are below the reported systemic levels of CLT after oral administration (0.835 µg/mL) (Brugnara et al., 1996; Rifai et al., 1995).

Regarding the antifungal efficacy our results demonstrated improved MIC values when the CLT was vehiculized in NEs (Table 3). CLT-NEs inhibited the growth of *Candida* strains at lower concentrations than references. It might be due to a lower charge of the NE droplets which could increase the interaction with negatively charged phospholipid components of fungi membrane (Ing et al., 2012). This might possibly be explained by the better interaction of CLT within the nanoemulsion droplets with the fungal cell membrane due to the excipient composition in the formulation. Equally, NEs offer larger surface area than creams in the interaction with yeast cells. For this reason, the NE system due to its intrinsic features and structure might improve the antifungal efficacy of CLT when compared with CLT of reference creams or solution. Thus considering this stronger antifungal efficacy, as well as higher CLT retained amounts in mucosae, it can be hypostatized a significant improvement over references, included commercial reference aimed for vaginal application.

None of the tolerance study volunteers showed signs of redness, itching or other skin reaction. As a general result it could be considered that CLT-NE1 did not alter the biophysical properties of skin and thus was suitable and safe for skin application.

The TEWL as a measure of the tissue integrity is utilized as indicator of the biological function. This value could be increased by the action of propylene glycol of the NE and it might be the reason why the TEWL increased after 6 h (Fig. 7A). It has been demonstrated that propylene glycol increased the desquamatory activity of protease kallikrein 7 and this action involved the increase of TEWL value (Hirata et al., 2014). However, this increment

represented such a low percentage that it went unnoticed for volunteers and the skin barrier function remained unaffected. Similarly, just after the formulation application and 2 h the value of SCH was higher than baseline value (Fig. 7C), because of the formation of a protective layer of formulation against the loss of water. This is the reason that TEWL values remained constant, and after 2 h began to increase. Apart from that, small variations on skin temperature were also recorded, but these changes could be explained by the circadian rhythm of core body temperature (Kruchi, 2002).

Taking into account previous research about CLT-NE in the literature, two works have been addressed. Kassem et al. (2010) reported a research, in which self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) loading CLT aimed to enhance its absorption profile was developed. On the other hand, Borhade et al. (2012a, 2012b) reported an interesting research in two parts about CLT-NE aimed for malaria treatment. However, comparison with our results seemed to be unreasonable because these formulations were not aimed for topical administration.

Among literature, our results demonstrated that CLT-NE could provide a continuous release of CLT for more than 48 h. Only solid lipid nanoparticles (Kalhapure et al., 2015) showed similar results.

Moreover, only the study reported by Zhang and Michniak-Kohn (2018) evaluated skin permeation of CLT (1%, w/w) microemulsion while no anticandidal efficacy was reported. Our results exhibited higher CLT retention into the skin with values of 16.92 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{g}$.

Regarding antifungal efficacy, those studies reporting this evaluation utilized methods different from MIC calculation and could not be compared. Only the research of Kalhapure et al. (2015) was performed by the MIC calculation, but using *Staphylococcus aureus*.

5. Conclusion

The present study reports for the first time the development and a full evaluation of NEs specifically aimed for topical candidiasis showing that developed NE system is an optimal vehicle for topical delivery of CLT against fungal infections of *Candida* ssp. for skin and mucosae (buccal, sublingual and vagina). According to our results these CLT-NEs could provide similar deposition on skin and higher on mucosae than commercially available CLT formulations for skin and vagina, respectively, and also providing higher antifungal efficacy than commercial counterparts. This empirical evidence suggests that further clinical investigation could be addressed and makes these CLT-NEs a promising tool for the topical treatment of candidiasis.

Conflict of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Acknowledgments

The authors would like to thank to Gattefossé for kindly supplying the nanoemulsion ingredients used in this study and Hospital Barcelona-SCIAS (Barcelona, Spain) for providing skin samples. Ivette Camarasa (BSc) from the University of Barcelona and Noelia Pérez (BSc) from the University of Granada are also acknowledged for their excellent technical support.

References

- Alvarado, H.L., Abrego, G., Garduño-Ramirez, M.L., Clares, B., Calpena, A.C., García, M.L., 2015. Design and optimization of oleanolic/ursolic acid loaded nanoplateforms for ocular anti-inflammatory applications. *Nanomedicine* 11, 521-530.
- Alvarado, H.L., Calpena, A.C., Garduno-Ramirez, M.L., Ortiz, R., Melguizo, C., Prados, J.C., Clares, B., 2018. Nanoemulsion strategy for ursolic and oleanic acids isolates from *Plumeria obtusa* improves antioxidant and cytotoxic activity in melanoma cells. *Anticancer Agents Med. Chem.* <https://doi.org/10.2174/1871520618666180111151846>.
- Amores, S., Domenech, J., Colom, H., Calpena, A.C., Clares, B., Gimeno, Á., Lauroba, J., 2014. An improved cryopreservation method for porcine buccal mucosa in ex vivo drug permeation studies using Franz diffusion cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 60, 49-54.
- Azeem, A., Rizwan, M., 2009. Nanoemulsion components screening and selection: a technical note. *AAPS Pharm Sci Tech* 10, 69-76.
- Barlow, M.L., Cummings, R.J., Pentland, A.P., Love, T.M., Haidaris, C.G., Ryan, J.L., Lord, E.M., Gerber, S.A., 2016. Total body irradiation exacerbates dissemination of cutaneous *Candida albicans* infection. *Radiat. Res.* Nov. 186, 436-446.
- Borhade, V., Pathak, S., Sharma, S., Patravale, V., 2012a. Clotrimazole nanoemulsion for malaria chemotherapy. Part I: preformulation studies, formulation design and physicochemical evaluation. *Int. J. Pharm.* 431, 138-148.
- Borhade, V., Pathak, S., Sharma, S., Patravale, V., 2012b. Clotrimazole nanoemulsion for malaria chemotherapy. Part II: stability assessment, in vivo pharmacodynamic evaluations and toxicological studies. *Int. J. Pharm.* 431, 149-160.
- Brugnara, C., Gee, B., Armsby, C.C., Kurth, S., Sakamoto, M., Rifai, N., Alper, S.L., Platt, O.S., 1996. Therapy with oral clotrimazole induces inhibition of the Gardos channel and reduction of erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. *J. Clin. Invest.* 97, 1227-1234.
- Brugués, A.P., Naveros, B.C., Calpena Campmany, A.C., Pastor, P.H., Saladrigas, R.F., Lizandra, C.R., 2015. Developing cutaneous applications of paromomycin entrapped in stimuli-sensitive block copolymer nanogel dispersions. *Nanomedicine (Lond)*, 10, 227-240.
- Chang, J.Y., Oh, Y.K., Kong, H.S., Kim, E.J., Jang, D.D., Nam, K.T., Kim, C.K. 2002. Prolonged antifungal effects of clotrimazole-containing mucoadhesive thermosensitive gels on vaginitis. *J. Control. Release.* 82, 39-50.
- Crowley, P.D., Gallagher, H.C., 2014. Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *J. Appl. Microbiol.* 117, 611-617.
- Dainiak, N., Gent, R.N., Carr, Z., Schneider, R., Bader, J., Buglova, E., Chao, N., Coleman, C.N., Ganser, A., Gorin, C., Hauer-Jensen, M., Huff, L.A., Lillis-Hearne, P., Maekawa, K., Nemhauser, J., Powles, R., Schünemann, H., Shapiro, A., Stenke, L., Valverde, N., Weinstock, D., White, D., Albanese, J., Meineke, V., 2011. Literature review and global consensus on management of acute radiation syndrome affecting nonhematopoietic organ systems. *Disaster Med. Public Health Prep.* 5, 183-201.
- du Plessis, J., Stefaniak, A., Eloff, F., John, S., Agner, T., Chou, T.C., Nixon, R., Steiner, M., Franken, A., Kudla, I., Holness, L., 2013. International guidelines for the in vivo assessment of skin properties in non-clinical settings: Part 2. transepidermal water loss and skin

- hydration. *Skin Res. Technol.* 19, 265-278.
- Esposito, E., Ravani, L., Contado, C., Costenaro, A., Drechsler, M., Rossi, D., Menegatti, E., Grandini, A., Cortesi, R., 2013. Clotrimazole nanoparticle gel for mucosal administration. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 33, 411-418.
- Fernández Campos, F., Calpena Campmany, A.C., Rodríguez Delgado, G., López Serrano, O., Clares Naveros, B., 2012. Development and characterization of a novel nystatin-loaded nanoemulsion for the buccal treatment of candidosis: ultrastructural effects and release studies. *J. Pharm. Sci.* 101, 3739-3752.
- Fernández-Campos, F., Clares Naveros, B., López Serrano, O., Alonso Merino, C., Calpena Campmany, A.C., 2013. Evaluation of novel nystatin nanoemulsion for skin candidosis infections. *Mycoses* 56, 70-81.
- Gimeno, A., Calpena, A.C., Sanz, R., Mallandrich, M., Péraire, C., Clares, B., 2014. Transbuccal delivery of doxepin: studies on permeation and histological investigation. *Int. J. Pharm.* 477, 650-654.
- Hirata, K., Mohammed, D., Hadgraft, J., Lane, M.E., 2014. Influence of lidocaine hydrochloride and penetration enhancers on the barrier function of human skin. *Int. J. Pharm.* 477, 416-420.
- Hoppel, M., Mahrhauser, D., Stallinger, C., Wagner, F., Wirth, M., Valenta, C., 2014. Natural polymer-stabilized multiple water-in-oil-in-water emulsions: a novel dermal drug delivery system for 5-fluorouracil. *J. Pharm. Pharmacol.* 66, 658-667.
- Ing, L.Y., Zin, N.M., Sarwar, A., Katas, H., 2012. Antifungal activity of chitosannanoparticles and correlation with their physical properties. *Int. J. Biomater.* 9 pp, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/632698>, Article ID 632698.
- Kalhapure, R.S., Sonawane, S.J., Sikwal, D.R., Jadhav, M., Rambharose, S., Mocktar, C., Govender, T., 2015. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 136, 651-658.
- Kassem, A.A., Marzouk, M.A., Ammar, A.A., Elosaily, G.H., 2010. Preparation and in vitro evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) containing clotrimazole. *Drug Discov. Ther.* 4, 373-379.
- Kruchi, K., 2002. How is the circadian rhythm of core body temperature regulated?. *Clin. Auton. Res.* 12, 147-149.
- Martín-Villena, M.J., Fernández-Campos, F., Calpena-Campmany, A.C., Bozal-de Febrer, N., Ruiz-Martínez, M.A., Clares-Naveros, B., 2013. Novel microparticulate systems for the vaginal delivery of nystatin: development and characterization. *Carbohydr. Polym.* 94, 1-11.
- Marwah, H., Garg, T., Goyal, A.K., Rath, G., 2016. Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. *Drug Deliv.* 23, 564-578.
- Olascoaga, A., Vilar-Compte, D., Poitevin-Chacón, A., Contreras-Ruiz, J., 2008. Wound healing in radiated skin: pathophysiology and treatment options. *Int. Wound J.* 5, 246-257.
- Parra, A., Clares, B., Rosselló, A., Garduño-Ramírez, M.L., Abrego, G., García, M.L., Calpena, A.C., 2016. Ex vivo permeation of carprofen from nanoparticles: A comprehensive study through human, porcine and bovine skin as anti-inflammatory agent. *Int. J. Pharm.* 501, 10-17.
- Pavelić, Z., Skalko-Basnet, N., Jalsenjak, I., 2005. Characterisation and in vitro evaluation of bioadhesive liposome gels for local therapy of vaginitis. *Int. J. Pharm.* 301, 140-148.
- Pretel, E., Arias, J.L., Cabeza, L., Melguizo, C., Prados, J., Mallandrich, M., Suñer, J., Clares, B., 2017. Development

- of biomedical 5-fluorouracil nanoplateforms for colon cancer chemotherapy: influence of process and formulation parametres. *Int. J. Pharm.* 530, 155-164.
- Prise, K.M., Saran, A., 2011. Concise review: stem cell effects in radiation risk. *Stem Cells* 29, 1315-1321.
- Rifai, N., Sakamoto, M., Law, T., Platt, O., Mikati, M., Armsby, C.C., Brugnara, C., 1995. HPLC measurement, blood distribution, and pharmacokinetics of oral clotrimazole, potentially useful antisickling agent. *Clin. Chem.* 41, 387-391.
- Rudzit, E.A., 1978. Modern fungicidal substances (a review). *Pharm. Chem. J.* 12, 856-868.
- Ryan, J.L., 2012. Ionizing radiation: the good, the bad, and the ugly. *J. Invest. Dermatol.* 132, 985-993.
- Sandig, A.G., Campmany, A.C., Campos, F.F., Villena, M.J., Naveros, B.C., 2013. Transdermal delivery of imipramine and doxepin from newly oil-in-water nanoemulsions for an analgesic and anti-allodynic activity: development, characterization and in vivo evaluation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 103, 558-565.
- Sanz, R., Calpena, A.C., Mallandrich, M., Gimeno, Á., Halbaut, L., Clares, B., 2017. Development of a buccal doxepin platform for pain in oral mucositis derived from head and neck cancer treatment. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 117, 203-211.
- Schaal, J.V., Leclerc, T., Soler, C., Donat, N., Cirrode, A., Jault, P., Barges, L., 2015. Epidemiology of filamentous fungal infections in burned patients: A French retrospective study. *Burns* 41, 853-863.
- Ship, J.A., Vissink, A., Challacombe, S.J., 2007. Use of prophylactic antifungals in the immunocompromised host. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 103, e1-14.
- Sierra, A.F., Ramirez, M.L., Campmany, A.C., Martinez, A.R., Naveros, B.C., 2013. In vivo and in vitro evaluation of the use of a newly developed melatonin loaded emulsion combined with UV filters as a protective agent against skin irradiation. *J. Dermatol. Sci.* 69, 202-214.
- Singh, B.N., Singh, R.B., Singh, J., 2005. Effects of ionization and penetration enhancers on the transdermal delivery of 5-fluorouracil through excised human stratum corneum. *Int. J. Pharm.* 298, 98-107.
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., Garcia-Celma, M.J., 2005. Nano-emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 10, 102-110.
- Sosa, L., Clares, B., Alvarado, H.L., Bozal, N., Domenech, O., Calpena, A.C., 2017. Amphotericin B releasing topical nanoemulsion for the treatment of candidiasis and aspergillosis. *Nanomedicine* 13, 2303-2312.
- Souto, E.B., Wissing, S.A., Barbosa, C.M., Müller, R.H., 2004. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int. J. Pharm.* 278, 71-77.
- Sroussi, H.Y., Epstein, J.B., Bensadoun, R.J., Saunders, D.P., Lalla, R.V., Migliorati, C.A., Heavilin, N., Zumsteg, Z.S., 2017. Common oral complications of head and neck cancer radiation therapy: mucositis, infections, saliva change, fibrosis, sensory dysfunctions, dental caries, periodontal disease, and osteoradionecrosis. *Cancer Med.* 6, 2918-2931.
- Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2008. EUCAST definitive document EDef 7.1: Method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 398-405.

- Suñer, J., Calpena, A.C., Clares, B., Cañadas, C., Halbaut, L., 2017. Development of clotrimazole multiple W/O/W emulsions as vehicles for drug delivery: effects of additives on emulsion stability. *AAPS PharmSciTech* 18, 539-550.
- Verma, P., Ahuja, M., 2015. Optimization, characterization and evaluation of chitosan-tailored cubic nanoparticles of clotrimazole. *Int. J. Biol. Macromol.* 73, 138-145.
- World Medical Association, 2013. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 310, 2191-2194.
- Yu, M., Ma, H., Lei, M., Li, N., Tan, F., 2014. In vitro/in vivo characterization of nanoemulsion formulation of metronidazole with improved skin targeting and anti-rosacea properties. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 88, 92-103.
- Yuen, C.W., Yip, J., Liu, L., Cheuk, K., Kan, C.W., Cheung, H.C., Cheng, S.Y., 2012. Chitosan microcapsules loaded with either miconazole nitrate or clotrimazole, prepared via emulsion technique. *Carbohydr. Polym.* 89, 795-801.
- Zhang, J., Michniak-Kohn, B.B., 2018. Investigation of microemulsion and microemulsion gel formulations for dermal delivery of clotrimazole. *Int. J. Pharm.* 536, 345-352.

Artículo 3

CLOTRIMAZOLE MULTIPLE W/O/W EMULSION AS ANTICANDIDAL AGENT: CHARACTERIZATION AND EVALUATION ON SKIN AND MUCOSAE

(Emulsión múltiple W/O/W de clotrimazol como agente anticandidiásico: caracterización y evaluación en piel y mucosas)

José L. Soriano-Ruiz, Joaquim Suñer-Carbó, Ana C. Calpena-Campmany, Nuria Bozal-de Febrer, Lyda Halbaut-Bellowa, Antonio Boix-Montañés, Eliana B. Souto, Beatriz Clares-Naveros

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

(2019, Vol. 175, Pág. 166–174)

(DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.070>)

ISSN:	0927-7765
eISSN:	1873-4367
Editorial:	Elsevier Science BV (Holanda)
Factor de Impacto:	3.997
Categoría:	Biophysic
Posición:	13/72
Cuartil:	1°

Resumen

El clotrimazol (CLT) fue formulado en una emulsión múltiple O/W/O con el objetivo de evaluar su potencial como agente anticandidiásico tópico y su comparación con productos comerciales. Una emulsión múltiple de clotrimazol que previamente había sido evaluada se seleccionó y se caracterizó fisicoquímicamente. La liberación in vitro y los perfiles de permeación ex vivo fueron estudiadas usando células de difusión de Franz con tres tipos de membranas biológicas, además de piel humana, mucosa bucal, sublingual y vaginal de cerdo. La actividad antifúngica contra cepas de *Candida* fue también examinada. Los resultados mostraron que las emulsiones múltiples de clotrimazol tenían tamaños de 29.206 y 47.678 μm , con valores de pH compatibles con la piel de 6.47 y 6.42, exhibiendo altos valores de potencial zeta de -55.13 y -55.59 mV, dependientes de variaciones de pH. La estabilidad fisicoquímica se mantuvo durante 180 días de almacenaje a temperatura ambiente. Las emulsiones múltiples exhibieron un comportamiento pseudo-plástico con áreas de histéresis y viscosidades de 286 y 331 mPa·s, mostrando mayores propiedades de sprayabilidad que las referencias comerciales. El sistema de emulsión múltiple aportaba un perfil de liberación de clotrimazol mejorado siguiendo un modelo hiperbólico. Así mismo, el sistema de multiemulsión alcanzó mayor flujo de permeación de clotrimazol que la referencia comercial. Las cantidades retenidas de clotrimazol en la piel y en mucosas fueron también mayores que las referencias comerciales, lo cual, junto a su mayor eficacia antifúngica hacen a las emulsiones múltiples de clotrimazol una gran herramienta para la investigación clínica de los tratamientos tópicos de la candidiasis.

Clotrimazole multiple W/O/W emulsion as anticandidal agent: Characterization and evaluation on skin and mucosae

José L. Soriano-Ruiz ^a, Joaquim Suñer-Carbó ^b, Ana C. Calpena-Campmany ^{b,c}, Nuria Bozal-de Febrer ^d, Lyda Halbaut-Bellowa ^{b,c}, Antonio Boix-Montañés ^b, Eliana B. Souto ^e, Beatriz Clares-Naveros ^{a,c,*}

^a *Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, University Campus of Cartuja, 18071 Granada, Spain*

^b *Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 27-31 Joan XXIII Ave., 08028 Barcelona, Spain*

^c *Nanoscience and Nanotechnology Institute (IN2UB), University of Barcelona, 645 Diagonal Ave., 08028 Barcelona, Spain*

^d *Department of Biology, Healthcare and the Environment, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 27-31 Joan XXIII Ave., 08028 Barcelona, Spain*

^e *Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Polo das Ciências da Saúde, Azinhaga de Santa Comba, 3000-548 Coimbra, Portugal*

* **Corresponding author at:** Dr. Beatriz Clares, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus de la Cartuja s/n, 18071 Granada, España. Tel: +34 958246664; Fax: +34 958248958; E-mail: beatrizclares@ugr.es

Abstract

Clotrimazole (CLT) was formulated in a multiple W/O/W emulsion (ME) with the aim of evaluating its potential as topical anticandidal agent and comparing with marketed products. A previously evaluated CLT-ME was selected and physicochemically characterized. The *in vitro* release behavior and the *ex vivo* permeation profiles were assessed using Franz diffusion cells using three different types of biological membranes: human skin and porcine buccal, sublingual and vaginal mucosae. The antifungal activity against *Candida* strains was also tested. Results showed CLT-MEs sizes of 29.206 and 47.678 μm with skin compatible pH values of 6.47 and 6.42 exhibiting high zeta potential values of -55.13 and -55.59 mV with dependence on the pH variation. The physicochemical stability was kept for a period of 180 days of storage at room temperature. CLT-MEs exhibited pseudoplastic behavior with hysteresis areas and viscosities of 286 and 331 mPa·s showing higher spreadability properties than commercial counterparts. An improved CLT release pattern was supplied by the ME system following a hyperbolic model. Likewise, ME system gave higher skin permeation flux of CLT than commercial reference. CLT amounts retained in the skin and mucosae were also higher than commercial references, which coupled with the higher antimycotic efficacy make CLT-MEs a great tool for clinical investigation of topical candidiasis treatments.

Keywords: Clotrimazole, múltiple emulsion, permeation, skin, mucosa

1. Introduction

Radiologic accidents or malicious acts such as terrorist attacks involving radioactive material, as well as radiation exposure in medical or industrial procedures are actual hazards for human health [1]. Besides other important organs and tissues, skin and mucous membranes, such as oral and vaginal mucosa, are also extremely sensitive to radiation because of the existence of continuously proliferating and maturing cells [2,3]. Moreover, exposition to a high-dose thermal energy or combined radiation-thermal energy also involves a potent hazard to these tissues resulting in different grades of severity [4,5].

Most of treatments are focused on the management of short term adverse effects. However, it must be taken into account that in such conditions of skin damage the defense functions of the epithelial surfaces of the body are particularly vulnerable or depleted (keratin of the *stratum corneum*, acid mantle and lysozymes of sweat in the skin, enzymes of vaginal secretions or lysozymes of saliva in buccal cavity). Thus the occurrence of opportunistic infections by organisms belonging to the resident flora is quite possible [6]. Indeed, candidiasis is the most common fungal infection after radiation or high thermal exposure that could lead to serious complications, or even death.

Clotrimazole (CLT), 1-[(2-chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-imidazole, is an antifungal drug possessing a wide spectrum belonging to the class of drugs known as azoles used against species of pathogenic dermatophytes and yeasts in skin and vaginal infections [7]. However its low aqueous solubility gives rise to difficulty in the skin or mucosa permeation, which makes it a challenging task for the research and development of specifically designed drug delivery systems. Hence, solid lipid nanoparticles [8,9], microcapsules [10], nanoemulsions [11] or microemulsions [12] have also been investigated.

Among drug delivery systems aimed for topical delivery, multiple emulsions (MEs) are of special interest due to their particular structure and properties [13]. MEs are formed from a dispersion of droplets which themselves contain smaller droplets providing a protection of the entrapped drug and sustained release.

For this task, *ex vivo* percutaneous studies are of vital importance because they are the most relevant models for preclinical development and optimization of drug formulations. Furthermore, a comprehensive study of the *ex vivo* release and permeation rate represents a genuine quality control during development phase assuring batch-to-batch bioavailability equivalence [14,15]. On the basis of these premises, the main purpose of this research has been the evaluation of W/O/W MEs loading CLT as suitable topical delivery system. In particular, after production and physicochemical characterization, the rheological and spreadability properties as topical formulation were assessed. The *in vitro* release, as well as the *ex vivo* permeation through skin and sublingual, buccal and vaginal mucosae, and finally their antimycotic efficacy were evaluated and compared with commercial references aimed for topical (skin and mucosae) candidiasis.

2. Material and methods

2.1. Materials

CLT, sodium chloride and cetyl palmitate was obtained from Acofarma (Barcelona, Spain), Span[®] 60 was obtained from Fagron (Terrassa, Spain), Abil[®] EM90, Tego[®] Betain F and Tego[®] Carbomer 341 was supplied from Evonik (Essen, Germany). Labraphac[®] lipophile 1349 was gifted by Gattefossé (Saint- Priest, France). Deionized water was self-produced from a Milli-Q[®] system (Millipore Iberica S.A.U., Madrid, Spain). All other chemicals and reagents used in this study were all of analytical grade and obtained from Panreac

Resultados

(Barcelona, Spain). Commercial formulations of CLT (1% and 2%) for skin and vaginal application was obtained from a local pharmacy.

2.2. Preparation of multiple emulsions

MEs were prepared by the two step emulsification process. Firstly, the aqueous solution containing the electrolyte (NaCl) was heated at 80 ± 2 °C and then added to the oily phase containing CLT, the lipophilic emulsifying agents (Abil[®] EM90 and Span[®] 60) and Labraphac[®] lipophile 1349 at the same temperature under stirring at 500 rpm until cooling to approximately 25 °C, thus obtaining the primary W/O emulsion.

Subsequently, 50% of the freshly W/O emulsion was slowly added to the outer aqueous phase, which contained the emulsifying agent (Tego[®] Betain F) and the thickening agent (Tego[®] Carbomer 341) under stirring at 250 rpm at room temperature. Once dispersed the stirring was continued for 10 min and cooled down to room temperature until homogeneous emulsion was formed. The system was then kept under storage at room temperature for 24 h to allow the full dissolution of the thickening agent. The neutralization of this system was done with 10% sodium hydroxide solution up to pH ~6.

Blank-MEs (without CLT) were also prepared accordingly. The prepared ME was coded as CLT-ME01 (ME containing 1% CLT) and CLT-ME02 (ME containing 2% CLT) (Table 1). The commercial reference formulations used for different comparative studies were coded as CLT-CR01 (commercial reference containing 1% CLT), CLT-CR02 (commercial reference containing 2% CLT). Likewise, a reference solution was coded as CLT-SOL02 (transcutol[®] P:water, 70:30, v:v, solution containing 2% CLT).

Table 1
Composition of CLT-ME01 and CLT-ME02 formulations.

Ingredients	Composition (% w/w)	
	CLT-ME01	CLT-ME02
Aqueous phase (W₁)		
Sodium chloride	0.25	0.25
Ultrapure water	32.25	31.25
Oily phase		
Clotrimazole	1.00	2.00
Abil [®] EM90	1.50	1.50
Span [®] 60	2.00	2.00
Labraphac [®] lipophile 1349	11.00	11.00
Cetyl palmitate	2.00	2.00
Outer phase (W₂)		
Tego [®] Carbomer 341	0.20	0.20
Tego [®] Betain F	0.70	0.70
Purified water	49.10	49.10

2.3. Physicochemical characterization

The examination of W/O/W MEs was conducted in a Leica DM 1000 LED light microscope supplied with a camera (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) at $\times 400$ magnifying power.

Likewise, droplet size measurements were performed by laser diffractometry (LD) using a Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) yielding the volume distribution of droplets.

The pH was measured at room temperature in triplicate by a digital pH meter Crison micropH 2000 (Crison Instruments SA, Alella, Spain).

The specific conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$) of formulations was recorded with a dilution 1:20 in ultrapure water at room temperature in a Crison GLP 30 device (Crison Instruments, Alella, Spain).

The CLT content in W/O/W MEs was determined by high-performance liquid-chromatography (HPLC) method previously validated according to the EMEA International Guidelines. The system consisted of a Waters[®] LC Module Plus (Waters, Milford, MA, USA) with UV-VIS 2487 detector (Waters, Milford, MA, USA). The reverse-phase column was a WAT046980 Summetry[®] C18, 100 Å, 5 μm , 3.9 mm \times 150 mm (Waters, Milford, MA, USA).

These results are reported as mean \pm standard deviation (SD) of at least three replicates.

2.4. Surface electrical properties

Surface electrical charge of emulsions droplets was recorded at pH 6 and 25.0 \pm 0.5 °C after suitable dilution (0.1% w/v) in a Zetasizer[®] 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). To evaluate the influence of pH on the ZP values, diluted MEs dispersions were prepared at different pH values (4-8 under constant 10⁻³ M KNO₃ concentration), followed by measurement of zeta potential ZP.

2.5. Spreadability test

Samples (0.7 g) were placed within a circle premarked on a glass plate over which a second glass plate was placed, as centered as possible, without sliding of the plates. Force was generated onto the upper plate by adding known weights (10-500 g), so the sample was compressed to uniform thickness. After 60 s, the weights were removed and the area of the sample was recorded. Each sample was tested in triplicate for each weight at room temperature. The results were expressed in terms of the spreading area as a function of the applied mass according to the following equation:

$$S = d^2 \times \pi/4 \quad (1)$$

in which S is the spreading area (cm²) resulting from the applied mass (g), and d is the mean diameter (cm) reached by the sample.

Finally, the spreadability results were fitted to mathematical equations (Boltzmann, hyperbola one site and hyperbola two sites). The goodness of the fitting was confirmed by the coefficient of determination (r^2).

2.6. Rheological measurements

The rheological measurement was performed using a Haake Rheostress rheometer (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) with cone-plate geometry (0.105 mm gap) with a fixed lower plate and a mobile Ti upper cone (60 mm diameter, 2° angle) at 25 \pm 0.2 °C.

Rotational measurement was run according to the following shear rate schedule: 3 min from 0 to 100 s⁻¹, 1 min at 100 s⁻¹, and finally 3 min from 100 to 0 s⁻¹. Viscosity values were recorded from the constant shear phase. Different mathematical equations were fitted to experimental data (Bingham, Ostwald de Waele, Herschel-Bulkley, Casson and Cross models, when resulted non-Newtonian). The selection of the model that provided the most properly fitting was based on its best r^2 value.

Dynamic oscillatory study were carried out with parallel plate-plate geometry (Haake PP60 Ti, 60 mm diameter, 0.5 mm gap separation between plates) at a constant frequency of 1 s^{-1} in a stress range of 0.1 and 200 Pa to determine the linear viscoelastic region (LVR) of the samples. The end of the linear viscoelastic region was determined as the critical stress when the storage modulus (G') value dropped 10 % from the linear phase. Oscillation frequency test was done from 0.01 and 10 s^{-1} at a constant shear stress within the LVR to determine the related variation of storage modulus (G') and loss modulus (G''), phase angle (δ), and the complex viscosity (η^*).

2.7. Stability studies

Multiple light scattering technique was used to predict the physical stability of the formulations by means of the Turbiscan[®] Lab Expert (Formulation, L'Union, France) based on the variation of backscattering (BS) signals of a pulsed near-infrared light source ($\gamma = 880 \text{ nm}$) for 24 h at $25 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Physicochemical properties such as droplet size, pH, conductivity as well as rotational measurements of rheology were repeated after 180 days of storage at room temperature. Macroscopic analysis was made each week during storage (180 days) to detect any sign of instability.

2.8. Drug release and kinetic evaluation

The *in vitro* CLT release from the W/O/W MEs and commercial references was conducted in Franz diffusion cells (FDC 400; Crown Glass, Somerville, NJ, USA). Three different types of membranes (nylon, cellulose and polysulfone) were assayed previously to select the most appropriate. The experiment was performed under sink conditions for CLT using methanol:potassium hydrogen phosphate solution (75:25, v/v) as receptor medium under continuous stirring at $37 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ (CLT-ME01 and CLT-CR01) and $32 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ (CLT-ME02 and CLT-CR02). Samples amounts equivalent to 4 mg of CLT were added to the donor compartment. Aliquots (300 μL) were withdrawn from the receptor chamber at pre-established times for 75 h and replaced immediately with the same volume of tempered receptor medium. The CLT content was analyzed by HPLC. Results are reported as the mean \pm SD of three replicates.

Data obtained from the release study was plotted as a function of time and fitted to different kinetic equations (zero order, first order, hyperbola and Higuchi models). The best fit was estimated by the Prism[®] software, v. 3.3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The Akaike's information criterion (AIC) was used as discriminatory indicator.

2.9. Permeation studies

2.9.1. Biological tissues

Human skin samples from the abdominal region of healthy women patients (~40 years old, $n=3$) were obtained after plastic surgery at the Barcelona SCIAS Hospital (Spain). The experimental protocol was approved by the Bioethics Committee of the Barcelona SCIAS Hospital and written informed consent forms were provided by volunteers.

Buccal, sublingual and vaginal samples were extracted from 3-4-month-old female pigs (weight 30-40 kg, $n=3$) following the protocol approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Barcelona (Spain) and the Committee of Animal Experimentation of the regional autonomous government of Catalonia (Spain). The surgical procedure was performed by a veterinarian at the Animal Facility (Bellvitge Campus,

University of Barcelona, Spain) after the animals had been sacrificed using an overdose of sodium thiopental anesthesia.

The skin was cut to 400 ± 50 μm thick sheets, porcine buccal mucosa to 500 ± 50 μm , and porcine sublingual were cut to 300 ± 50 μm using an electrical dermatome (GA 630, Aesculap, Tuttlingen, Germany), vaginal mucosa were used without cutting. Tissues that were not utilized were cryopreserved for further studies [16].

2.9.2. Franz diffusion cells

Permeation study of CLT was performed in vertical Franz diffusion cells with diffusion area of 2.54 cm^2 and 0.64 cm^2 for skin and mucosae, respectively. Biological tissues were mounted in the membrane holders between the donor and the receptor compartment, which was filled with ethanol:water:transcutol[®] P (50:40:10, v:v:v) and kept under stirring at 600 rpm. The temperature was controlled at 32 ± 1 °C and 37 ± 1 °C for skin and mucosae, respectively, by a circulating water bath guarantying sink conditions. Testing samples were placed in the donor compartment (and covered with parafilm to avoid evaporation). 300 μL aliquots were withdrawn from the receptor compartment at fixed times for 48 and 6 h (skin and mucosae, respectively) and replaced by an equivalent volume of receptor medium at the same temperature. The CLT permeated through biological tissues was then quantified by HPLC.

2.9.3. Drug recovery

When permeation test was finished, tissue membranes were dismantled and cleaned with gauze soaked in 0.05% solution of sodium dodecyl sulfate and washed in distilled water. The permeation areas were then excised and weighed. CLT retained in skin and mucosae was extracted using ethanol:water:transcutol[®] P (50:40:10) extraction medium during 20 min under sonication in an ultrasound bath. The resulting solutions were measured by HPLC yielding the amount of CTL retained in tissues (Q_r , $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{cm}^2$). Results are shown as the median and range (min-max) of six replicates.

2.9.4. Permeation parameters

The cumulative amount of CLT permeated (Q_t) through biological membrane was plotted as a function of time. The slope and intercept of the linear portion of the plot was derived by regression using the Prism[®] software, v. 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). CLT fluxes (J , $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) through the biological tissues were calculated from the slope of linear portion of the cumulative amounts permeated through the biological membrane per unit surface area versus time plot. The extrapolation of this line which intercepted with the X-axis revealed the lag time (T_L , h). The permeability coefficients (K_p , cm/h) were obtained by dividing the J by the initial drug concentration (C_0) in the donor compartment. It was assumed that under sink conditions the drug concentration in the receiver compartment was negligible compared to that in the donor compartment.

Once parameters J , T_L and K_p were calculated, partition parameter P_1 (cm) and the diffusion parameter P_2 (h^{-1}) could be obtained from the following equations:

$$K_p = P_1 \times P_2 \quad (2)$$

$$T_L = 1/6 \times P_2 \quad (3)$$

The predicted steady-state plasma concentration (C_{ss}) of CLT that could be reached after topical application was obtained using the following equation:

$$C_{ss} = \frac{J \times A}{Cl_p} \quad (4)$$

where C_{ss} is the plasma steady-state concentration, J the flux determined in this study, A the hypothetical area of application and Cl_p the plasmatic clearance.

Values of permeation parameters are shown as the median and range (min-max) of six replicates.

2.10. Antifungal efficacy

The minimal inhibitory concentration (MIC) of blank-ME, CLT-ME01, CLT-ME02, CLT-CR1 and CLT-CR2, as well as CLT-SOL02 was calculated by the broth microdilution method against *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 66032 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 strains (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) following the European Committee for antimicrobial susceptibility testing guidelines [17]. The strains were first cultured on Sabouraud dextrose agar (Invitrogen, Madrid, Spain) at 30 °C for 48 h. Yeast suspensions in sterile Ringer's solution to 2 McFarland standards were elaborated and inoculums were prepared by diluting yeast suspensions 1/10 in Ringer's solution. The MIC was calculated using microdilution plates with RPMI-1640 2% G medium (Invitrogen, Madrid, Spain) at pH= 7.0 with 1 M sodium hydroxide. Chloramphenicol (500 µg/mL) was also added to the RPMI medium. The test samples were prepared in RPMI-1640 double strength and diluted three times with the same solvent up to 500 µg/mL concentration was achieved. CLT serial dilutions from 250 to 0.0019 µg/mL of formulations were distributed in microdilution plates. Finally, 100 µL of yeast suspension was added to each well including a growth control of yeast (containing inoculum and RPMI medium), drug-free medium (containing only RPMI medium double strength) and RPMI medium. Microdilution plates were incubated at 37 °C, and then read at 48 h in a spectrophotometer Synergy-HT (Biotek, Winooski, VT, USA) at 620 nm.

2.11. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SD of at least three replicates unless stated otherwise. One-way analysis of variance (ANOVA) was carried out testing the differences between the mean values. The permeation parameters were compared by the application of a non-parametric statistical analysis using the Mann Whitney test. The Prism[®] software, v. 3.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) was utilized. Results were considered to be significant if $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Production and characterization of formulations

In previous studies, we developed a new formulation containing CLT loaded into W/O/W ME [7]. According to the obtained results we selected the best formulation components and compositions which are shown in Table 1 for both CLT-ME01 and CLT-ME02. Formulations appeared as white, odorless, and macroscopically homogeneous without any signs of phase separation. As shown in Fig. 1A and B the multiple emulsion structure is clearly observed with small droplets in the internal phase confirming the suitability of the method.

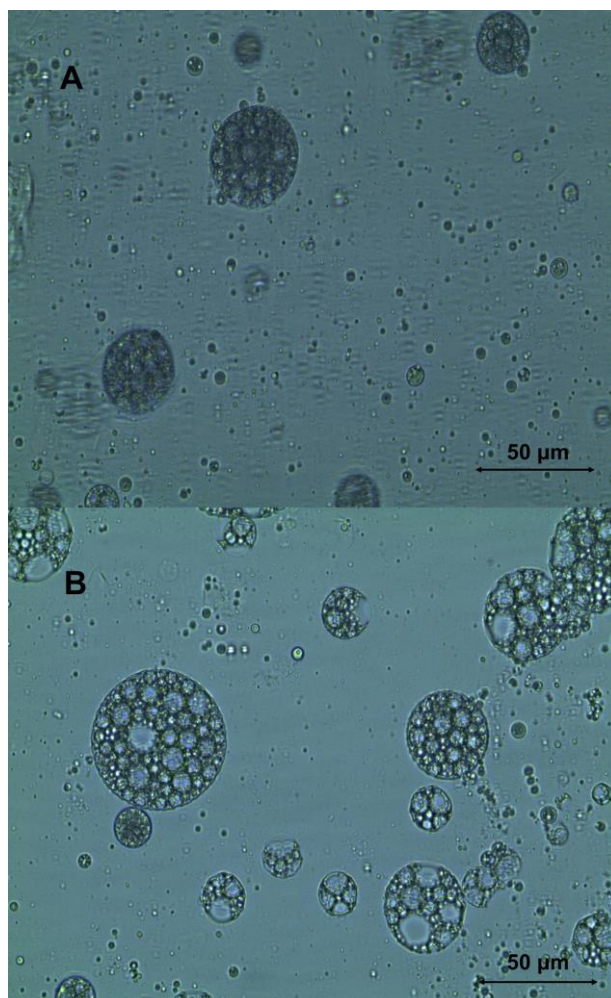


Fig. 1. Photomicrographs of CLT-MEs 24 h after preparation. CLT-ME01 (A). CLT-ME02 (B).

Measurements of droplet size by LD are provided in supplementary material as Table S1. The mean droplet size in terms of $D(4,3)$ for blank-ME was $19.902\ \mu\text{m}$, while CLT-ME01 and CLT-ME02 was $29.206\ \mu\text{m}$ and $47.678\ \mu\text{m}$, respectively. Furthermore, commercial references CLT-CR01 and CLT-CR02 showed diameters of $5.933\ \mu\text{m}$ and $8.062\ \mu\text{m}$, respectively. The span factor, as a measure of distribution width was also calculated. As shown in Table S1, CLT-ME01 possessed the lowest span factor indicative of homogenous distribution. CLT-ME02 also exhibited good results similar to CLT-CR02.

Resultados

Table S1

Droplet size distribution (μm) measurements of blank-ME, CLT-ME01, CLT-ME02, CLT-CR01 and CLT-CR02 after 24 h and 180 days of preparation at room temperature. $D(4,3)$ is the volume weighted mean, $D(3,2)$ is the surface weighted mean. Results are presented as mean \pm SD (n=3).

Formulation	Time	Parameter		
		D(3.2)	D(4.3)	Span
Blank-ME	24 h	4.481 \pm 0.25	19.902 \pm 1.53	5.448
	180 days	4.552 \pm 0.71	19.353 \pm 1.39	5.293
CLT-ME01	24 h	5.871 \pm 0.86	29.206 \pm 2.64	2.616
	180 days	6.241 \pm 0.31	31.185 \pm 2.19	2.367
CLT-ME02	24 h	6.805 \pm 0.27	47.678 \pm 3.75	3.762
	180 days	6.818 \pm 0.84	46.148 \pm 5.19	3.740
CLT-CR01	24 h	2.182 \pm 0.18	5.933 \pm 0.17	4.604
	180 days	2.115 \pm 0.13	5.738 \pm 0.36	4.740
CLT-CR02	24 h	2.328 \pm 0.10	8.062 \pm 0.41	3.430
	180 days	2.364 \pm 0.15	8.077 \pm 0.30	3.305

Moreover, pH values of blank-ME was 5.83 \pm 0.04, the addition of CLT resulted in slight increment up to 6.47 \pm 0.01 and 6.42 \pm 0.02 for CLT-CR01 and CLT-CR02, respectively. Conductivity values of CLT-ME01 and CLT-ME02 were 192 \pm 4.23 and 196 \pm 5.81 $\mu\text{S}/\text{cm}$, respectively. Likewise, the ZP of MEs at pH=6 was negative in all cases, concretely -53.01 \pm 1.47 mV for blank-ME and -55.13 \pm 1.94 and -55.59 \pm 1.73 mV for CLT-ME01 and CLT-ME02, respectively. ZP values did not undergo significant differences after drug loading. The electrophoretic characterization of formulations as a function of pH is depicted in Fig. 2. As can be observed, the ZP showed a dependence on the pH. The ZP (in absolute value) followed a marked increase as pH increased.

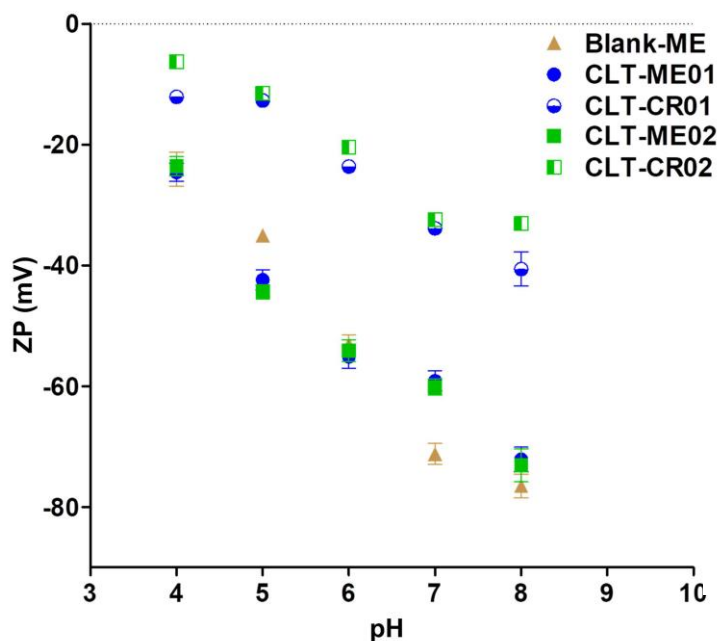


Fig. 2. Zeta potential (ZP, mV) of MEs and commercial references as a function of pH in the presence of 10⁻³ M KNO₃ concentration at 25.0 \pm 0.5 °C. Values are given as mean \pm SD (n=3).

3.2. Spreadability study

Fig. S1 (supplemental material) shows the spreadability results of formulations. No differences were recorded among blank-ME, CLT-ME01 and CLT-ME02, which exhibited much higher values than commercial references. The hyperbola two site binding model was the model with the best adjustment quality ($r^2 > 0.99$).

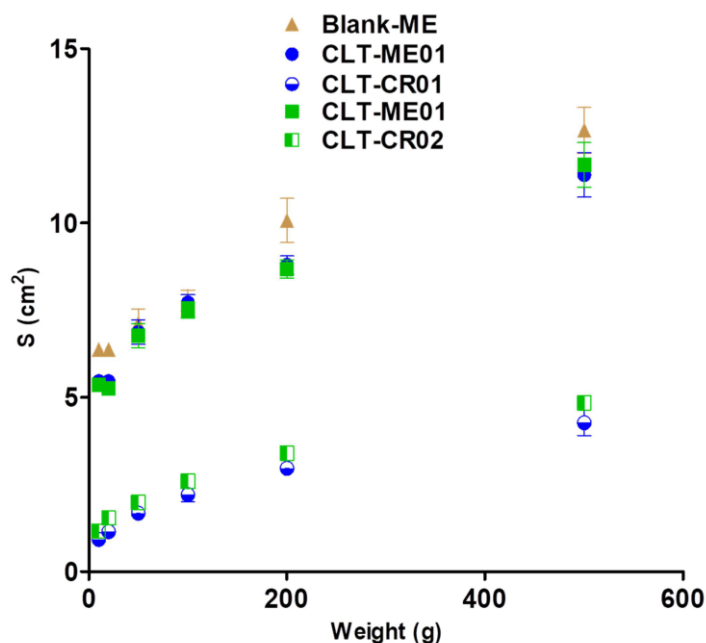


Fig. S1. Spreading area (S, cm²) as a function of the applied mass (g) at room temperature. Values are given as mean±SD (n=3).

3.3. Rheological studies

Fig. S2 shows the flow and viscosity curves of formulations obtained from the rotational studies of rheology at 24 h. It can be observed that all formulations exhibited non-Newtonian pseudoplastic flow and shear thinning behavior (viscosity of the systems decreased with increasing shear stress). MEs are dependent on shear rate, showing a consistent decrease in viscosity with increasing shear rate from 0 to 100 s⁻¹. The downward curve of stress-shear is below the upward curve, indicating some thixotropy in the system. The hysteresis areas, a pseudoplastic natural characteristic, were observed in the graphs.

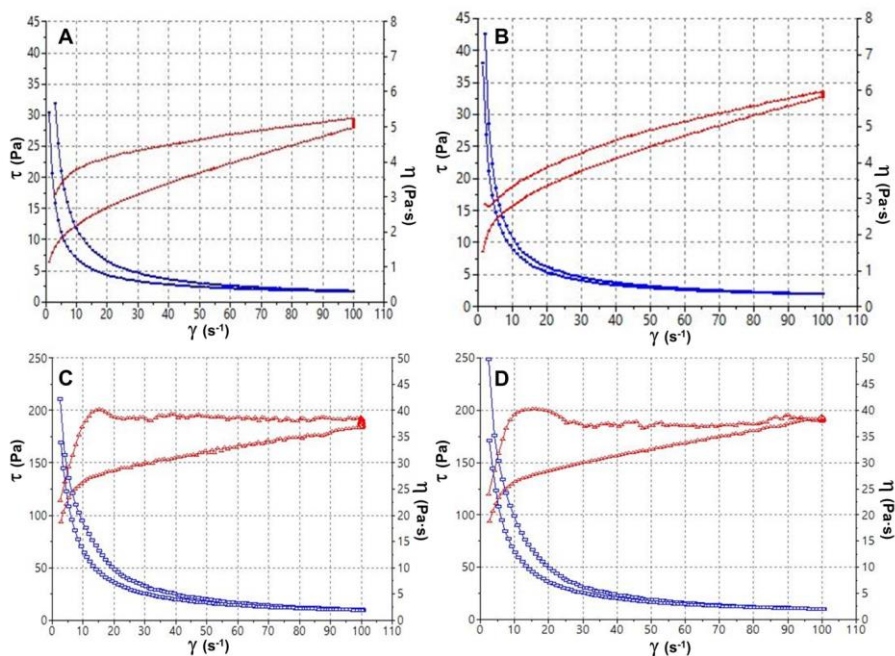


Fig. S2. Viscosity curves (blue line) and flow curves (red line) of samples 24 h after preparation at 25 ± 0.2 °C. CLT-ME01 (A). CLT-ME02 (B). CLT-CR01 (C). CLT-CR02 (D).

The values of viscosity and thixotropy of formulations are reported in the supplementary material as Table S2. The Cross mathematical equation was the model that best fitted experimental data in all cases.

Table S2

Mean viscosity values ($mPa \cdot s$) at $10 s^{-1}$ and $100 s^{-1}$ and thixotropy values of CLT-ME's and commercial references 24 h and 180 days after preparation at 25 ± 0.2 °C. Viscosity results are presented as $mean \pm SD$ ($n=3$).

Formulation	Frequency (s^{-1})	Viscosity values ($mPa \cdot s$)	Thixotropy (Pa/s)
CLT-ME01	$10 s^{-1}$	2182 ± 133.3	1986
	$100 s^{-1}$	286 ± 4.1	
CLT-ME02	$10 s^{-1}$	1933 ± 119.8	2398
	$100 s^{-1}$	331 ± 2.2	
CLT-CR01	$10 s^{-1}$	18830.0 ± 1205.0	15430
	$100 s^{-1}$	1876 ± 25.0	
CLT-CR02	$10 s^{-1}$	20652 ± 1373.0	15770
	$100 s^{-1}$	1918 ± 11.0	

On the other hand, the critical stress was found at stresses below approximately 1 Pa for CLT-ME01 and CLT-ME02, and 15 Pa for commercial references. According to those results, a constant shear stress of 1 Pa (50 % of the critical value) was selected to perform the frequency sweep tests (Fig. S3). Results for both ME formulations revealed, in this frequency range, a prevalence of the elastic over the viscous behavior ($G' > G''$). Additionally, the results showed a higher viscosity for marketed references, confirming rotational results.

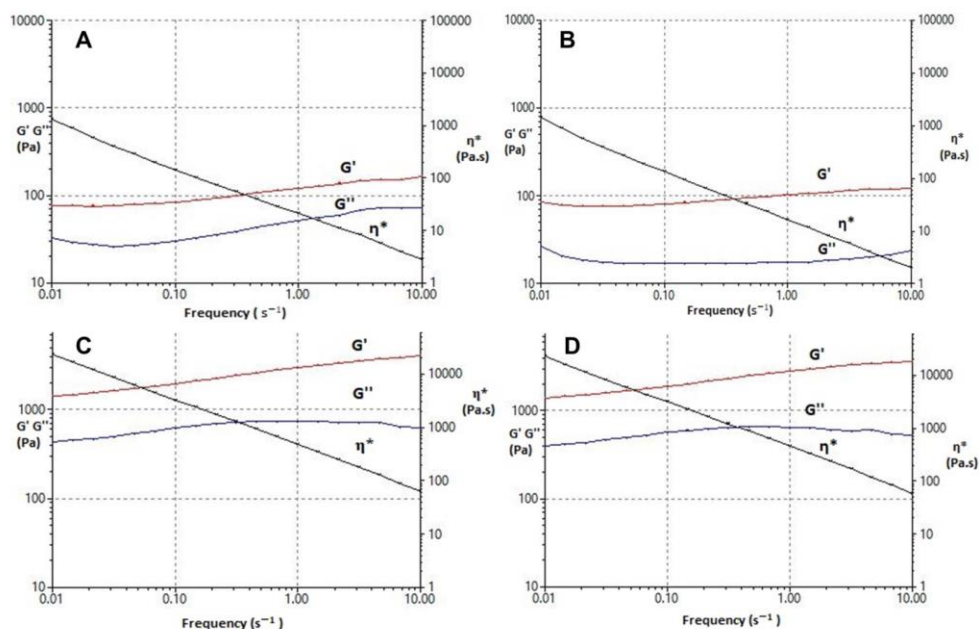


Fig. S3. Storage modulus (G'), loss modulus (G'') and complex viscosity (η^*) versus frequency (s^{-1}) during frequency sweep test 24 h after preparation at 25 ± 0.2 °C. CLT-ME01 (A). CLT-ME02 (B). CLT-CR01 (C). CLT-CR02 (D).

3.4. Stability studies

The BS profiles (%) at 25 °C of blank-ME, CLT-CR01 and CLT-CR02 are depicted in Fig. S4. The left side of the graphics corresponds to the bottom of the vial and the right side corresponds to the top of the vial. Peaks on the left and right side of the graphic correspond to the meniscus formed by the contact between sample and the glass. The BS signals show variations minor than $\pm 10\%$ in all samples.

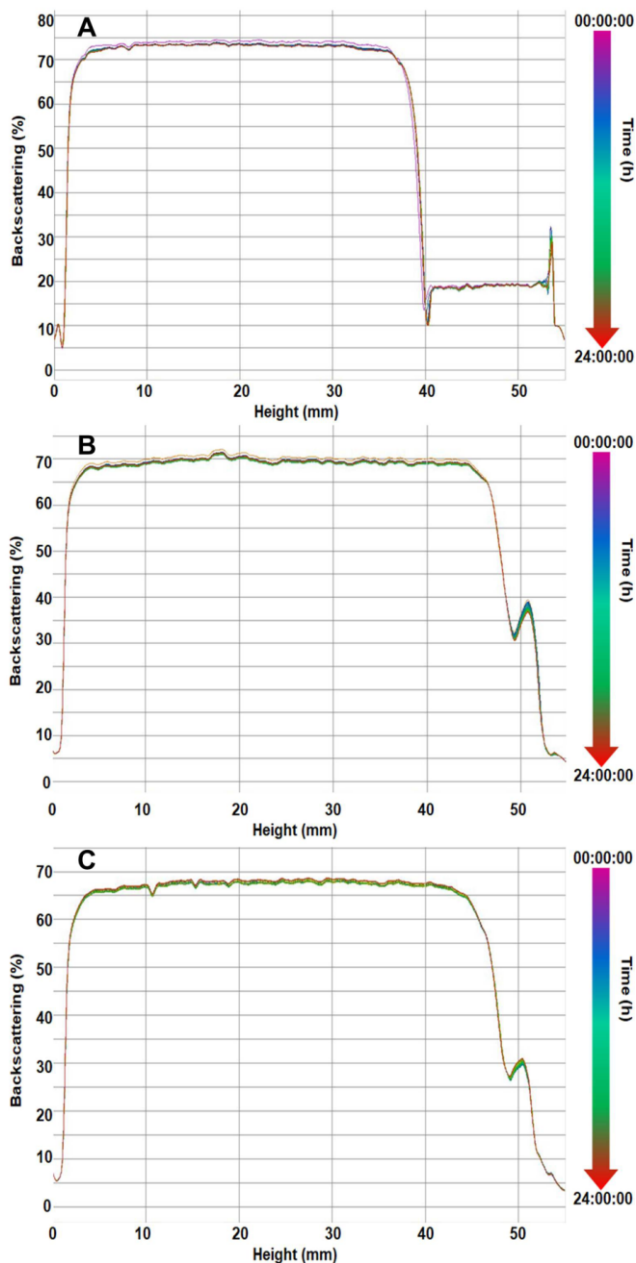


Fig. S4. Backscattering (%) profiles of samples as a function of sample height (mm) at 25 ± 0.2 °C. Blank-ME (A), CLT-ME01 (B), CLT-ME02 (C). The left side of the curves correspond to the bottom of the vial, whereas the right side correspond to the sample behavior on the top.

The droplet volume fraction (migration) and mean size (coalescence) remained unaltered among samples. No statistically significant differences were observed in pH values over time (180 days). In this line, conductivity results also remained constant during the 180 days of

study. Rotational studies of rheology after 1, 2 and 3 months confirmed similar profiles of rheological behavior but with reduction of viscosity values (Fig. S5). Moreover, the CLT content in CLT-CR01 and CLT-CR02 remained above $98 \pm 1.65\%$ of the theoretical content during the 180 days of the study. Equally, stability results showed monophasic system without phase separation, no drug precipitation, creaming or change of appearance in any of samples evaluated.

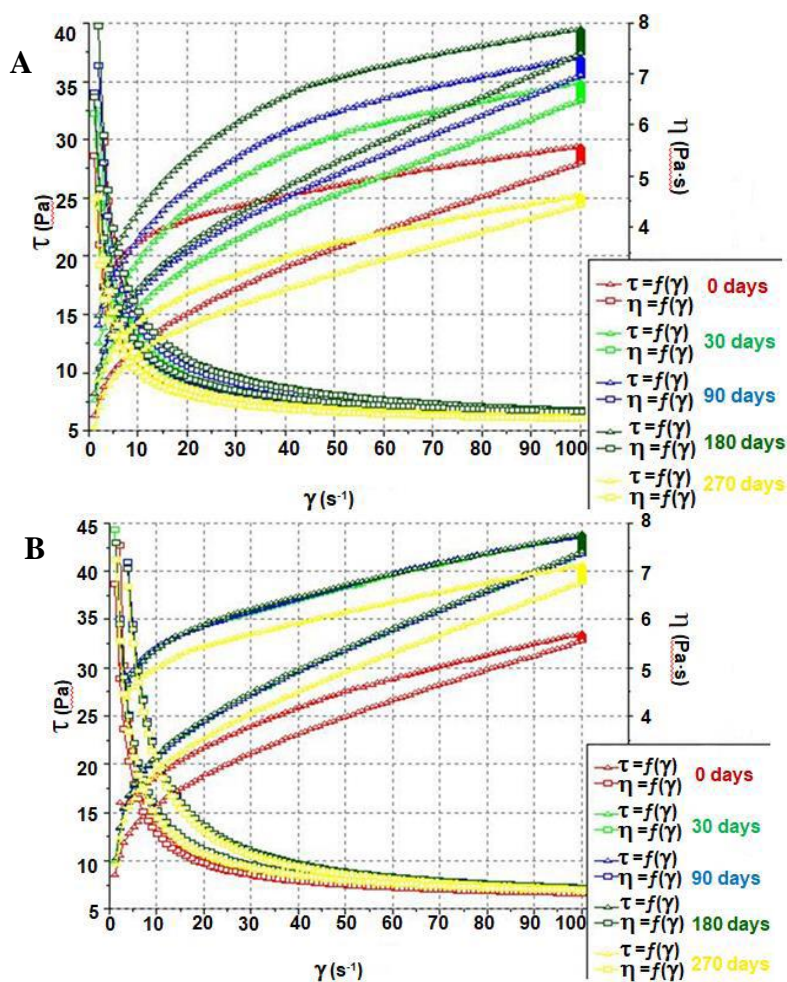


Fig. S5. Viscosity curves (η as a function of γ) and flow curves (τ as a function of γ) after storage at room temperature at different times. CLT-ME01 (A). CLT-ME02 (B).

3.5. CLT release study

The CLT release profile from ME can be observed in Fig. 3. Similar release profiles were obtained from ME and commercial references. Model fitting results showed that the model that statistically best described the release mechanism was the hyperbola equation for all formulations.

$$\text{Hyperbola: } \%R_t/\%R_\infty = R_\infty \times \frac{t}{(k+t)} \quad (5)$$

where $\%R_t/\%R_\infty$ is the fraction of drug released at time t , $\%R_\infty$ is the total drug released (%) and k is the release rate constant. The mathematical equations describing the release data are also shown in Fig. 3. A statistically higher release ($\%R_\infty$) from CLT-ME01 can be seen when compared CLT-CR01, 4107 μg and 3715 μg , respectively ($p=0.02$). Accordingly, total amounts released from CLT-ME02 and CLT-CR02 were also significantly different in favor of the first, being 3941 μg and 3620 μg , respectively ($p=0.03$). No statistically significant differences were observed between CLT-ME02 and CLT-CR02 or between commercial references.

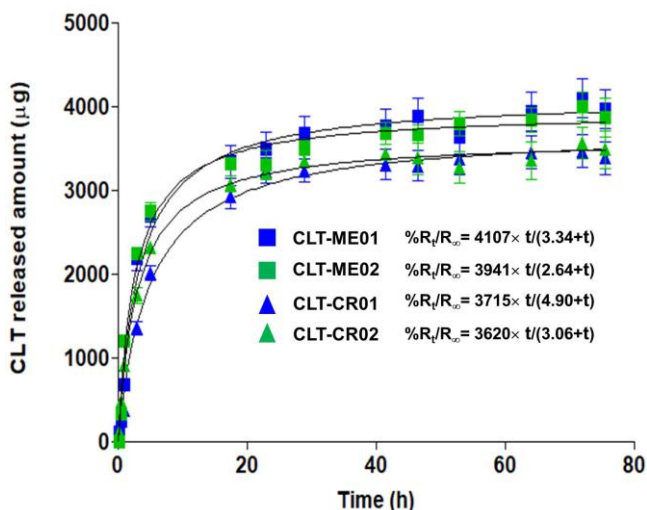


Fig.3. Cumulative amounts of CLT released from samples and kinetic equations. Data represent mean \pm SD (n= 6).

The total CLT release was reached in 30 h approximately in all cases. No significant differences were observed in release rate constants between CLT-ME01 and CLT-CR01, CLT-ME02 and CLT-CR02 or CLT-ME01 and CLT-ME02. However, release rate constants were statistically different between CLT-CR01 and CLT-CR02.

3.6. Permeation studies

Fig. 4A shows the permeation profiles of CLT-ME01 and CLT-CR01 through human skin. Additionally, in Table 2 are reported the median permeation parameters. Statistically higher permeation values were reached with the CLT-ME01 when compared with the commercial reference.

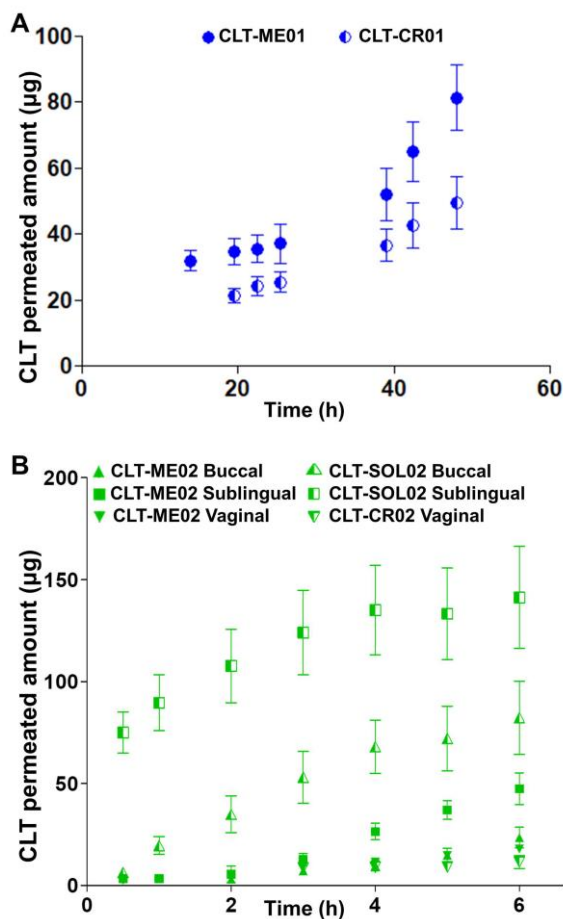


Fig. 4. Cumulative amounts of CLT permeated through biological tissues from samples. CLT-ME01 and CLT-CR01 through human skin membranes for 48 h at 32 °C (A). CLT-ME02, CLT-CR02 and CLT-SOL02 through porcine sublingual, buccal and vaginal membranes for 6 h at 32 °C (B). Data represent mean \pm SD (n= 6).

Table 2 also shows the amounts of CLT remaining in the skin, being 33.26 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{g}$ and 28.60 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{g}$ for CLT-ME01 and commercial reference, respectively ($p < 0.05$).

Regarding mucosae permeation profiles (Fig. 4B) the highest permeation profiles were found through the sublingual and buccal mucosae, respectively by the CLT-SOL02 (reference) in both cases, followed by the CLT-ME02 through buccal mucosa. The permeation profiles of CLT-ME02 and CLT-CR02 were similar through vaginal mucosa. In this line, the calculated permeation parameters and CLT retained amounts are also reported in Table 2. In all cases, the CLT amounts remaining in the biological membranes were higher for CLT-ME02 than references. Values of T_L could not be calculated from the experimental data, nor therefore P_2 and P_1 for references in sublingual and vaginal mucosae. Besides that, the theoretical C_{ss} that CLT would reach, taking into account an application area of 25 cm^2

Resultados

for skin and 20 cm² for mucosae, as well as a plasmatic clearance of 78.48 L/h [18] are provided in Table 2.

Table 2

Median (maximum and minimum) values of retained amount (Q_r), flux (J), lag time (T_L), partition parameter P_1 , diffusion parameter P_2 , permeability coefficient (K_p), as well as theoretical steady-state plasma concentration (C_{ss}) of CLT from samples trough human skin, porcine buccal, sublingual and vaginal mucosa.

Parameters	CLT-ME01	CLT-CR01	CLT-ME02	CLT-SOL02	CLT-ME02	CLT-SOL02	CLT-ME02	CLT-CR02
	skin	skin	Buccal	Buccal	Sublingual	Sublingual	Vaginal	Vaginal
Q_r ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{g}$)	33.26 (31.43-34.49)	28.60 ^a (28.03-29.53)	245.82 (217.65-273.36)	161.05 ^b (140.89-183.64)	295.33 (260.64-336.45)	131.05 ^c (120.89-153.63)	46.60 (35.47-60.03)	27.55 ^d (21.07-30.44)
J/Sup ($\mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{cm}^2$)	1.40 (1.18-1.71)	0.53 ^a (0.44-1.07)	3.53 (2.01-5.94)	57.95 ^b (49.25-67.23)	17.92 (15.78-19.97)	66.39 ^c (55.92-77.33)	4.67 (4.14-4.91)	3.02 (2.39-4.25)
T_L (h)	25.14 (23.95-31.56)	11.47 ^a (10.61-14.89)	1.23 (0.96-2.40)	0.03 ^b (0.02-0.06)	1.8 (1.1-2.5)	—	0.06 (0.04-0.09)	—
P_2 (h^{-1})	6.63×10^{-3} (5.29×10^{-3} - 6.97×10^{-3})	1.45×10^{-3} ^a (1.12×10^{-3} - 1.57×10^{-3})	0.14 (0.07-0.17)	4.90 ^b (2.82-6.41)	0.09 (0.07-0.15)	—	2.65 (1.87-3.97)	—
$P_1 \times 10^{-3}$ (cm)	21.02 (17.05-32.44)	0.38 ^a (0.30-0.95)	2.19 (1.02-5.74)	0.59 ^b (0.38-1.20)	9.67 (6.59-11.83)	—	0.09 (0.05-0.13)	—
$K_p \times 10^{-5}$ (cm/h)	14.06 (11.90-17.16)	5.31 ^a (4.37-10.74)	29.71 (17.66-39.84)	289.83 ^b (246.31-336.23)	89.61 (78.91-99.84)	331.95 ^c (70.45-386.64)	23.36 (19.70-24.53)	14.07 (3.01-19.92)
$C_{ss} \times 10^{-3}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.44 (0.54-0.37)	0.17 (0.13-0.34)	1.12 (0.66-1.50)	10.93 ^b (9.30-12.69)	4.51 (3.97-5.02)	16.71 ^c (14.07-19.46)	1.17 (1.04-1.23)	0.75 (0.60-1.78)

Statistically significant differences ($p < 0.05$) regarding: ^a CLT-ME01; ^b CLT-ME02 buccal mucosa; ^c CLT-ME02 sublingual mucosa; ^d CLT-ME02 vaginal mucosa

3.7. Evaluation of the anti-Candida activity

The MICs values from the *in vitro* susceptibility test after 48 h are reported in Table 3. Blank-ME exhibited no toxicity against yeasts. In all cases MIC values of CLT in ME systems were lower than free CLT in solution and commercial references except for CLT-ME01 and CLT-CR01 that showed similar values (0.2441 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for *C. albicans* strains.

Table 3

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values of CLT ($\mu\text{g}/\text{mL}$) from samples against different *Candida* strains after incubation at 37 °C for 48 h (n = 3).

	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida parapsilopsis</i>
	ATCC 10231	ATCC 66032	ATCC 22019
Blank-ME	—	—	—
CLT-ME01	0.2441	0.2441	0.2441
CLT-CR01	0.2441	7.8125	3.9062
CLT-ME02	0.0610	1.9531	0.4882
CLT-CR02	0.1220	7.8125	0.9765
CLT-SOL02	0.4882	7.8125	1.9531

4. Discussion

CLT low aqueous solubility constrains its permeation through biological membranes. This opens up all kind of technological strategies including formulation design and development. In this context, a W/O/W ME containing CLT at different concentration was formulated by means of a two-step process, which had previously been optimized [7]. This system entrapped droplets of one liquid in droplets of another liquid with important applications in pharmaceutical field [19]. For this reason, this work was aimed at the research of its physicochemical and biopharmaceutical properties as anticandidal agent for skin and mucosae. After production, the droplet size measurement and morphometrical observation were required to confirm the suitability of the method. So, spherical droplets were obtained which was confirmed by optical microscopy, these results were agreement with the results obtained by LD (Table S1 and Fig. 1). The inclusion of CLT in the ME involved the increase of the droplet size. This indicates that the incorporation of drug molecules interacts with the structure of the system. This is a general phenomenon observed with several drugs particularly when the molecule possesses amphiphilic and/or mesogenic properties [20,8]. Equally, pH values of MEs were optimal for cutaneous application with slightly acidic values. This is an important factor to take into consideration to avoid skin or mucosal irritation particularly under mycosis infections.

The ZP is a stability indicative parameter in colloidal systems like emulsions [21]. No differences were revealed between blank and CLT loaded ME, which can be indicative of an optimal CLT entrapment within the oil phase. The negative values of ZP of developed formulations also contributed to the stability of the systems. ZP values $> 30\text{mV}$ (in module) may provide stability to the colloid, avoiding aggregation between the droplets [22]. In this context and taking into account that pH has been reported to determine the electrokinetic properties of colloids [23], the electrophoretic characterization of developed ME was evaluated and depicted in Fig. 2. As can be observed the electrokinetic properties of ME showed dependence on the pH. As pH values varied from 4.5 to 8 the ZP became higher (absolute values) and thus it will not affect the stability of the formulation. The interface O/W₂ was stabilized by an amphoteric surfactant (cocamidopropyl betaine). In this way, the increase of the negative values of ZP can be attributed to its amphoteric character, which has a considerable negative charge at basic pH. However, it is interesting to note that at neutral pH the electric surface of the drops remained negative. It is also possible that some of the negative electrical charge come from free fatty acids present in oil phase used to prepare the MEs [24].

Spreadability is defined as the area occupied by a given amount of sample to be subjected to a standard pressure between two glass plates [25]. As expected, spreadability values of ME were higher than commercial references (Fig. S1). The efficacy of a topical therapy is dependent on the suitable dose that is applied or delivered at the target site. This fact is directly related to an optimal spreadability, which is also responsible for ease of application on the skin or mucosae [26]. This fact is even more important for anatomical zones that are difficult to apply such as the vaginal mucosa. As our results demonstrated the CLT-MEs possess better spreadability properties than commercial references.

Rheological characterization is another aspect to keep in mind in formulations aimed for topical administration. Rheology properties can modulate biopharmaceutical properties such as release rate, as well as the widespread application on the affected areas [27, 28]. For these reasons rotational viscosity test, oscillation stress sweep test and frequency sweep test were addressed. As can be observed in Fig. S2 all formulations showed a decrease of viscosity when shear rate increased from 0 to 100 s^{-1} , which was indicative of a marked non-

Newtonian pseudoplastic behavior of shear-thinning fluids. However, the viscosity values of commercial references exhibited higher values (Table S2) as expected because are creams. Both ME formulations also exhibited hysteresis loops formed by the upward flow curve and the downward one suggesting a thixotropic response. Values of thixotropy are also reported in Table S2. It is a desirable characteristic for topical formulation because they should thin during application and contributes to increase the retention time of the formulation in the local of application [29]. In case of MEs, the shear might produce irreversible structural changes with the rupture of droplets and thus the decrease in the volume fraction and viscosity [30]. The Cross mathematical equation was the model that best fitted experimental data showing that flow behavior was not influenced by time or temperature. It is assumed that the pseudoplastic flow is related to the formation and rupture of structural linkages of the materials. Apart from that, the oscillatory sweep stress and frequency sweep tests were accomplished to evaluate the linear viscoelastic region η^* , G' and loss modulus G'' to evaluate the preponderance between the viscous and elastic behavior of MEs. As shown in Fig. S3, our results revealed the preponderance of the elastic behavior over the viscous ($G' > G''$) in all formulations. This elastic preponderance enhances the physical stability and the resistance to external forces which favors the spreadability on the skin or mucosal surface [31]. CLT-ME01 and CLT-ME02 exhibited lower values of η^* when compared with their references counterparts. A vaginal product with low viscosity (loss tangent (ratio G''/G'): $\tan(\delta) > 1$) would be easily spread within the vagina promoting the vaginal epithelium contact [26].

Stability was assessed by a technology based on the analysis of multiple dispersion of the light. BS variations more than $\pm 10\%$ indicate unstable formulations. The optical profile of formulations (Fig. S4) showed constant signals near the line of 70% throughout the study confirming the stability of the systems. The fall of BS signal in Fig. S4 at 40 mm of the cell height was probably due to an inappropriate sample filling of the cell. This stability was also confirmed by the results of the rest of stability tests, which showed the stability of CLT-ME01 and CLT-ME02 for at least 180 days.

In vitro release studies provide important data about the drug delivery system which might be utilized as quality control information to predict *in vivo* behavior and to delve further into the analysis of the mechanisms involved [32]. Nylon membrane with an effective diffusional area of 2.54 cm^2 was selected as the artificial membrane to be used for the release experiences based on its best results (data not shown). Although asymptotic levels are reached approximately at the same time, drug is released more rapidly from the MEs than from the commercial formulations. Moreover, both MEs released higher amounts of CLT than their commercial counterparts (Fig. 3). The lower viscosity of MEs could provide higher mobility for the CLT molecules, and consequently a faster release in a controlled manner. It can be observed biphasic release patterns. Firstly, at early time points (initial “burst effect”) with fast release rate, followed by an approximately constant CLT release pattern. The complete description of the release process by mathematical models is difficult due to the variety of physical variable that should be taken into account [33]. However, the usage of empirical models provides valuable information by simple fitting of experimental data to equations. In our case the experimental data were fitted to non-linear regression models, and the lower AIC value confirmed that the release kinetics for the drug release fitted best to hyperbola equation, Eq. (5), which involved providing sustained release [34]. Hence, the final purpose of mathematical modelling was to simplify the complex release process and to gain insight into the release mechanisms.

Among tissues used as biological membranes porcine buccal and vaginal mucosae have been suggested as suitable model membranes because their morphology and permeability properties are similar to those of humans [5,35]. The permeation profiles were analysed on the basis of a diffusion model for infinite dose conditions. It was assumed that under sink conditions the drug concentration in the receiver compartment is negligible compared to that in the donor compartment. As shown in Fig. 4A the permeation of the drug through the skin from the CLT-ME01 was higher than the commercial reference. Results showed in Table 2 demonstrated significant higher values in favor of CLT-ME01, as well as higher retained amounts of CLT in the skin, which could involve higher pharmacological effect, since the formulations are aimed for local antimycotic activity. It is commonly established that the permeation of topically applied drugs is clearly related with the type of vehicle. Finally, CTZ has been reported to exhibit large differences in bioavailability when administered orally, as well as hepatic toxicity [36]. However, in any case significant systemic concentrations CLT were expected to reach according to C_{ss} calculations (Table 2). As expected, CLT was poorly absorbed following skin application. Thus, our developed formulations can be considered as safe and no side effects could be expected to occur.

In the case of permeation through mucosae, and concretely sublingual and buccal mucosae (Fig. 4B), our results showed higher permeation profiles for references. As mentioned previously, P_1 and P_2 could not be calculated (for CLT-SOL002 in sublingual and buccal mucosa) because of the impossibility of extrapolating the intercept with the X-axis of the plot (Fig. 4B). Although this missing T_L times are unusual, similar plots have been reported in the literature [37,38]. For this experiment, as no commercial references of CLT were available in the Spanish market (for sublingual and buccal application), 2% CLT solutions in transcuto[®] P:water (70:30) were utilized (CLT-SOL02). This was the main reason why permeation values (J and Kp) were higher than CLT-ME02. Transcuto[®] P besides possessing excellent solubilizing properties and biocompatibility with mucosae, it is a well-known transdermal permeation enhancer [39]. It was noticeable a permeation increasing trend of CLT-SOL02 but a reduced retention.

On the contrary, in the case of vaginal mucosa permeation study, in which a commercial reference was utilized, no significant differences were observed in permeation parameters between CLT-ME02 and CLT-CR02 (Table 2). Conversely, retained CTL retained amounts in mucosae were significantly higher for CLT-ME02 than references in all cases, included vaginal mucosa (Table 2). It might be attributed to the ME system itself. Multiple W/O/W emulsions have a remarkable ability to enhance skin permeability [40] and should influence the skin distribution of drugs after topical application [41,42]. These higher retained amounts might also help to provide a stronger antimycotic action of CLT at the site of action, which might be very helpful to prevent invasive and disseminated infections in compromised patients. As in the case of skin, according to C_{ss} values shown in Table 2, they can be considered as safe and no side effects could be expected to occur because these values were well below the reported thresholds of CLT oral administration 0.835 $\mu\text{g/mL}$ [18,43].

Lower MIC values indicate higher antifungal activity. The results showed in Table 3 demonstrated that CLT-MEs inhibit *Candida* spp. at lower concentrations than the drug solution and even lower than commercial CLT creams for strains of *C. glabrata* and *C. parapsilopsis*. This antifungal activity was also observed for *C. albicans*, and commercial reference CLT-CR01 was the only formulation able to match CLT-ME counterpart. Bearing in mind that CLT-MEs achieved higher retained amounts of CLT in skin and mucosae, as well as this higher antimycotic action, it can be expected an improvement clinically

advantageous. It has been reported that skin concentrations of imidazolic drugs when applied topically have long-lasting effect by remaining for up to some days after application [44].

5. Conclusions

This study indicates that developed ME system is optimal vehicle for topical delivery of CLT against fungal infections of *Candida* ssp. The main reported disadvantage of MEs is their intrinsic thermodynamically instability. This point was addressed by the selection of an optimized formulation evaluated in previous studies with optimal physicochemical properties. The *in vitro* release studies confirmed enhanced CLT release provided by the ME system when compared with commercial references. In this line, the CLT permeation through skin and mucosae was also enhanced, providing higher skin/mucosa retained amounts of drug to exert its antimycotic action, which was also stronger showing lower MIC values than commercial references.

For these reasons our developed CLT-ME can be proposed as a reasonable future treatment option for skin and mucosae infections of *Candida*. These results encourage further clinical investigation for exploiting the use of this therapeutic tool for topical candidiasis treatments in skin and mucosae.

Acknowledgements

Ivette Camarasa (BSc) from the University of Barcelona and Noelia Pérez (BSc) from the University of Granada are acknowledged for their excellent technical support.

Conflicts of interest

The authors report no conflicts of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article.

References

- [1] J.L. Ryan, Ionizing radiation: the good, the bad, and the ugly, *J. Invest. Dermatol.* 132 (2012) 985-993, <https://doi.org/10.1038/jid.2011.411>.
- [2] K.M. Prise, A. Saran, Concise review: stem cell effects in radiation risk, *Stem Cells* 29 (2011) 1315-1321, <https://doi.org/10.1002/stem.690>.
- [3] R. Sanz, A.C. Calpena, M. Mallandrich, A. Gimeno, L. Halbaut, B. Clares, Development of a buccal doxepin platform for pain in oral mucositis derived from head and neck cancer treatment, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 117 (2017) 203-211, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.04.019>.
- [4] A. Olascoaga, D. Vilar-Compte, A. Poitevin-Chacón, J. Contreras-Ruiz, Wound healing in radiated skin: pathophysiology and treatment options, *Int. Wound. J.* 5 (2008) 246-257, <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2008.00436.x>.
- [5] United States Department of Health and Human Services. National Institutes of Health. National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events Version 5.0, Washington D.C., 2017, https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/CTCAE_v5_Quick_Reference_5x7.pdf
- [6] M.L. Barlow, R.J. Cummings, A.P. Pentland, T.M. Love, C.G. Haidaris, J.L. Ryan, E.M. Lord, S.A. Gerber, Total-body irradiation exacerbates dissemination of cutaneous *Candida*

- albicans Infection, *Radiat. Res.* 186 (2016) 436-446, <https://doi.org/10.1667/RR14295.1>.
- [7] J. Suñer, A.C. Calpena, B. Clares, C. Cañadas, L. Halbaut, Development of clotrimazole multiple W/O/W emulsions as vehicles for drug delivery: effects of additives on emulsion stability, *AAPS PharmSciTech.* 18 (2017) 539-550, <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0529-8>.
- [8] E.B. Souto, S.A. Wissing, C.M. Barbosa, R.H. Müller, Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery, *Int. J. Pharm.* 278 (2004) 71-77, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.02.032>.
- [9] E.B. Souto, R.H. Müller, Investigation of the factors influencing the incorporation of clotrimazole-loaded lipid nanoparticles prepared by hot high-pressure homogenization, *J. Microencapsul.* 23 (2006) 377-388, <https://doi.org/10.1080/02652040500435295>.
- [10] C.W. Yuen, J. Yip, L. Liu, K. Cheuk, C.W. Kan, H.C. Cheung, S.Y. Cheng, Chitosan microcapsules loaded with either miconazole nitrate or clotrimazole, prepared via emulsion technique, *Carbohydr. Polym.* 89 (2012) 795-801, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.013>.
- [11] J.L. Soriano-Ruiz, A.C. Calpena-Capmany, C. Cañadas-Enrich, N. Bozal-de Febrer, J. Suñer-Carbó, E.B. Souto, B. Clares-Naveros, Biopharmaceutical profile of a clotrimazole nanoemulsion: Evaluation on skin and mucosae as anticandidal agent, *Int. J. Pharm.* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.002>.
- [12] P. Boonme, J. Kaewbanjong, T. Andreani, A.M. Silva, E.B. Souto, Microemulsions and microemulsions-based gels of skin delivery of phytochemicals for antifungal therapy, *Curr. Pharm. Des* 22 (2016) 4257-4263, <https://doi.org/10.2174/1381612822666160603015436>.
- [13] T. Schmidts, D. Dobler, P. Schlupp, C. Nissing, H. Garn, F. Runkel, Development of multiple W/O/W emulsions as dermal carrier system for oligonucleotides: effect of additives on emulsion stability, *Int. J. Pharm.* 398 (2010) 107-113, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.07.037>.
- [14] Parra, B. Clares, A. Rosselló, M.L. Garduño-Ramírez, G. Abrego, M.L. García, A.C. Calpena, Ex vivo permeation of carprofen from nanoparticles: A comprehensive study through human, porcine and bovine skin as anti-inflammatory agent, *Int. J. Pharm.* 501 (2016) 10-17, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.056>.
- [15] A. Gimeno, A.C. Calpena, R. Sanz, M. Mallandrich, C. Peraire, B. Clares, Transbuccal delivery of doxepin: studies on permeation and histological investigation, *Int. J. Pharm.* 477 (2014) 650-654, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.10.060>.
- [16] S. Amores, J. Domenech, H. Colom, A.C. Calpena, B. Clares, Á. Gimeno, J. Lauroba, An improved cryopreservation method for porcine buccal mucosa in ex vivo drug permeation studies using Franz diffusion cells, *Eur. J. Pharm. Sci.* 60 (2014) 49-54, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.04.017>.
- [17] Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), EUCAST Definitive Document EDef 7.1: Method for the Determination of Broth Dilution MICs of Antifungal Agents for Fermentative Yeasts, *Clin. Microbiol. Infect.* 14 (2008)

- 398-405, <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01935.x>.
- [18] N. Rifai, M. Sakamoto, T. Law, O. Platt, M. Mikati, C.C. Armsby, C. Brugnara, HPLC measurement, blood distribution, and pharmacokinetics of oral clotrimazole, potentially useful antisickling agent, *Clin. Chem.* 41 (1995) 387-391.
- [19] A.T. Florence, D. Whitehill, The formulation and stability of multiple emulsions, *Int. J. Pharm.* 11 (1982) 277-308, [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(82\)90080-1](https://doi.org/10.1016/0378-5173(82)90080-1).
- [20] H.L. Alvarado, A.C. Calpena, M.L. Garduno-Ramirez, R. Ortiz, C. Melguizo, J.C. Prados, B. Clares, Nanoemulsion strategy for ursolic and oleanic acids isolates from *Plumeria obtusa* improves antioxidant and cytotoxic activity in melanoma cells, *Anticancer Agents Med. Chem.* (2018), <https://doi.org/10.2174/1871520618666180111151846>.
- [21] M. Delfanian, S.M.A. Razavi, M.H. Haddad Khodaparast, R. Esmailzadeh Kenari, S. Golmohammadzadeh, Influence of main emulsion components on the physicochemical and functional properties of W/O/W nano-emulsion: Effect of polyphenols, Hi-Cap, basil seed gum, soy and whey protein isolates, *Food Res. Int.* 108 (2018) 136-143, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.043>.
- [22] B. Clares, A.C. Calpena, A. Parra, G. Abrego, H. Alvarado, J.F. Fanguero, E.B. Souto, Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: effect on skin permeation, *Int. J. Pharm.* 473 (2014) 591-598, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.08.001>.
- [23] Y. Ishikawa, Y. Katoh, H. Ohshima, Colloidal stability of aqueous polymeric dispersions: effect of pH and salt concentration, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 42 (2005) 53-58, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.01.006>.
- [24] R. Crețu, L.C. Șolea, Zeta potential and color investigations of vegetable oil based emulsions as eco-friendly lubricants, *Sci. Stud. Res.* 18 (2017) 167-180.
- [25] R. Sanz, B. Clares, M. Mallandrich, J. Suñer-Carbó, M.J. Montes, A.C. Calpena, Development of a mucoadhesive delivery system for control release of doxepin with application in vaginal pain relief associated with gynecological surgery, *Int. J. Pharm.* 535 (2018) 393-401, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.027>.
- [26] A.P. Brugués, B.C. Naveros, A.C. Calpena Campmany, P.H. Pastor, R.F. Saladrigas, C.R. Lizandra, Developing cutaneous applications of paromomycin entrapped in stimuli-sensitive block copolymer nanogel dispersions, *Nanomedicine (Lond)* 10 (2012) 227-240, <https://doi.org/10.2217/nnm.14.102>.
- [27] L. Sosa, B. Clares, H.L. Alvarado, N. Bozal, O. Domenech, A.C. Calpena, Amphotericin B releasing topical nanoemulsion for the treatment of candidiasis and aspergillosis, *Nanomedicine* 13 (2017) 2303-2312, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.06.021>.
- [28] E.B. Souto, R.H. Müller, Rheological and in vitro release behaviour of clotrimazole-containing aqueous SLN dispersions and commercial creams, *Pharmazie* 62 (2007) 505-509, <https://doi.org/10.1691/ph.2007.7.5205>
- [29] M.J. Martín, A.C. Calpena, F. Fernández, M. Mallandrich, P. Gálvez, B. Clares, Development of alginate microspheres as nystatin carriers for oral mucosa drug delivery, *Carbohydr. Polym.* 117 (2015) 140-149, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.032>.

- [30] J. Suñer-Carbó, A. Boix-Montañés, L. Halbaut-Bellowa, N. Velázquez-Carralero, J. Zamarbide-Ledesma, N. Bozal-de-Febrer, A.C. Calpena-Campmany, Skin permeation of econazole nitrate formulated in an enhanced hydrophilic multiple emulsion, *Mycoses* 60 (2017) 166-177, <https://doi.org/10.1111/myc.12575>.
- [31] M. Korhonen, H. Niskanen, J. Kiesvaara, J. Yliruusi, Determination of optimal combination of surfactants in creams using rheology measurements, *Int. J. Pharm.* 197 (2000) 143-151, [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00464-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00464-0).
- [32] H.L. Alvarado, G. Abrego, M.L. Garduño-Ramirez, B. Clares, A.C. Calpena, M.L. García, Design and optimization of oleanolic/ursolic acid loaded nanoplateforms for ocular anti-inflammatory applications, *Nanomedicine* 11 (2015) 521-530, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.01.004>.
- [33] A.F. Sierra, M.L. Ramírez, A.C. Campmany, A.R. Martínez, B.C. Naveros, In vivo and in vitro evaluation of the use of a newly developed melatonin loaded emulsion combined with UV filters as a protective agent against skin irradiation, *J. Dermatol. Sci.* 69 (2013) 202-214, <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.10.013>.
- [34] L.C. Espinoza, M. Vacacela, B. Clares, M.L. García, M.J. Fabrega, A.C. Calpena, Development of a nasal donepezil-loaded microemulsion for the treatment of Alzheimer's disease: in vitro and ex vivo characterization, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 17 (2018) 43-53, <https://doi.org/10.2174/1871527317666180104122347>.
- [35] M.J. Martín-Villena, F. Fernández-Campos, A.C. Calpena-Campmany, N. Bozal-de Febrer, M.A. Ruiz-Martínez, B. Clares-Naveros, Novel microparticulate systems for the vaginal delivery of nystatin: development and characterization, *Carbohydr. Polym.* 94 (2013) 1-11, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.005>.
- [36] C.S. Yong, D.X. Li, B. Prabagar, B.C. Park, S.J. Yi, B.K. Yoo, W.S. Lyoo, J.S. Woo, J.D. Rhee, J.A. Kim, H.G. Choi, The effect of β -cyclodextrin complexation on the bioavailability and hepatotoxicity of clotrimazole, *Pharmazie* 62 (2007) 756-759, <https://doi.org/10.1691/ph.2007.10.7018>.
- [37] B.N. Singh, R.B. Singh, J. Singh, Effects of ionization and penetration enhancers on the transdermal delivery of 5-fluorouracil through excised human stratum corneum, *Int. J. Pharm.* 298 (2005) 98-107, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.04.004>.
- [38] M. Hoppel, D. Mahrhauser, C. Stallinger, F. Wagner, M. Wirth, C. Valenta, Natural polymer-stabilized multiple water-in-oil-in-water emulsions: a novel dermal drug delivery system for 5-fluorouracil, *J. Pharm. Pharmacol.* 66 (2014) 658-667, <https://doi.org/10.1111/jphp.12194>.
- [39] F. Fernández Campos, A.C. Calpena Campmany, G. Rodríguez Delgado, O. López Serrano, B. Clares Naveros, Development and characterization of a novel nystatin-loaded nanoemulsion for the buccal treatment of candidosis: ultrastructural effects and release studies, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 3739-3752, <https://doi.org/10.1002/jps.23249>.
- [40] L. Han, R. Yang, S. Yuan, S. Ding, Z. Wu, Z. Wu, X. Qi, Soft multiple emulsions demonstrating reversible freeze-thawing capacity and enhanced skin permeability of diclofenac sodium, *Colloid Polym. Sci.* 296 (2018) 471-481, <https://doi.org/10.1007/s00396-018-4265-3>.

- [41] T. Schmidts, K. Marquardt, P. Schlupp, D. Dobler, F. Heinz, U. Mäder, H. Garn, H. Renz, J. Zeitvogel, T. Werfel, F. Runkel, Development of drug delivery systems for the dermal application of therapeutic DNazymes, *Int. J. Pharm.* 431 (2012) 61-69, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.04.034>.
- [42] G.M. Tedajo, M. Seiller, P. Prognon, J.L. Grossiord, Modulated release of triterpenic compounds from O/W/O multiple emulsion formulated with dimethicones: infrared spectrophotometric and differential calorimetric approaches, *J. Control. Release* 63 (2000) 7-17, [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00169-8](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00169-8).
- [43] C. Brugnara, B. Gee, C.C. Armsby, S. Kurth, M. Sakamoto, N. Rifai, S.L. Alper, O.S. Platt, Therapy with oral clotrimazole induces inhibition of the Gardos channel and reduction of erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease, *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 1227-1234, <https://doi.org/10.1172/JCI118537>.
- [44] S. Veraldi, Isoconazole nitrate: a unique broad-spectrum antimicrobial azole effective in the treatment of dermatomycoses, both as monotherapy and in combination with corticosteroids, *Mycoses* 56 (2013) 3-15, <https://doi.org/10.1111/myc.12054>.

Artículo 4

DESIGN AND EVALUATION OF A MULTIFUNCTIONAL THERMOSENSITIVE POLOXAMER-CHITOSAN-HYALURONIC ACID GEL FOR THE TREATMENT OF SKIN BURNS

(Diseño y evaluación de un gel multifuncional termosensible de polaxámero-chitosan-ácido hialurónico para el tratamiento de las quemaduras de la piel)

José L. Soriano-Ruiz, Ana C. Calpena-Campmany, Marcelle Silva-Abreu, Lyda Halbout-Bellowa, Nuria Bozal-de Febrer, María J. Rodríguez-Lagunas, Beatriz Clares-Naveros

Biomaterials

(SOMETIDO; Ref. BIOMAT-S-19-00118)

ISSN:	0142-9612
eISSN:	1878-5905
Editorial:	Elsevier Science BV (Holanda)
Factor de Impacto:	8.806
Categoría:	Material Science, Biomaterials
Posición:	1/33
Cuartil:	1°

Resumen

El objetivo principal de este estudio fue el diseño, desarrollo y caracterización de un vehículo formado de poloxámero/chitosan/ácido hialurónico que incluye tres antioxidantes biológicos como son las vitaminas A, D y E destinados a mejorar el tratamiento de las quemaduras de la piel.

Se realizó la caracterización física del hidrogel, de sus propiedades mecánicas y reológicas, así como la de estructura interna. Además, características biológicas tales como las propiedades antimicrobianas *ex vivo* y la curación de heridas *in vivo* también se evaluaron y se compararon con una referencia comercial. Los resultados mostraron unas propiedades fisicoquímicas óptimas con valores de pH biocompatibles de $4.6 \pm 0,1$ y un potencial zeta dependiente del pH. La tasa de hinchamiento fue alrededor del 350% con óptimas propiedades de humectabilidad, adherencia, derrame y gelificación termosensible.

El ensayo microbiológico demostró una actividad antimicrobiana similar a la de la referencia comercial. El estudio de tolerancia *in vivo* no reveló reacciones cutáneas.

Finalmente, la eficacia de la cicatrización en quemaduras del hidrogel un modelo de quemadura de piel mostró apéndices dérmicos, epidermis, dermis y estrato córneo similares a la referencia comercial. Estos hallazgos indicaron que nuestro hidrogel con vitaminas podría considerarse un excelente candidato para posteriores estudios clínicos.

Design and evaluation of a multifunctional thermosensitive poloxamer-chitosan-hyaluronic acid gel for the treatment of skin burns

José L. Soriano-Ruiz^a, Ana C. Calpena-Campmany^{b,c}, Marcelle Silva-Abreu^{b,c}, Lyda Halbout-Bellowa^{b,c}, Nuria Bozal-de Febrer^d, María J. Rodríguez-Lagunas^{e,f}, Beatriz Clares-Naveros^{a,c,g,*}

^a Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, University Campus of Cartuja, 18071 Granada, Spain

^b Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 27-31 Joan XXIII Ave., 08028 Barcelona, Spain

^c Nanoscience and Nanotechnology Institute (IN2UB), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

^d Department of Biology, Healthcare and the Environment, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 27-31 Joan XXIII Ave., 08028 Barcelona, Spain

^e Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 27-31 Joan XXIII Ave., 08028 Barcelona, Spain

^f Institute of Biomedicine, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

^g Biosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), Andalusian Health Service (SAS)—University of Granada, Granada, Spain

* **Corresponding author at:** Dr. Beatriz Clares. Faculty of Pharmacy, University of Granada, University Campus of Cartuja, 18071 Granada, Spain. Tel: +34 958246664; Fax: +34 958248958; E-mail: beatrizclares@ugr.es

Abstract

The main goal of this study was the design, development and characterization of a poloxamer/chitosan/hyaluronic based substrate including three biological antioxidants such as vitamins A, D and E aimed at improving the treatment of skin burns.

The physical characterization of hydrogel, its mechanical and rheological properties as well as internal structure were investigated. Furthermore, biological characteristics such as *ex vivo* antimicrobial properties and *in vivo* wound healing were also accomplished and compared with a commercial reference. Results showed optimal physicochemical properties with biocompatible pH value of 4.6 ± 0.1 and zeta potential dependent on pH. The swelling rate was around 350% with optimal wettability, adhesion a leakage properties, and thermosensitive gelation processes. The microbiological assay demonstrated similar antimicrobial activity than commercial reference. *In vivo* tolerance study revealed no skin reactions. Finally, the wound healing efficacy of hydrogel in skin burn model showed dermal appendages and similar epidermis, dermis and *stratum corneum* to the commercial reference. These findings indicated that our hydrogel loading vitamins could be considered an outstanding candidate for further clinical studies.

Keywords: Poloxamer 407, chitosan, hyaluronic acid, antioxidant, skin burn.

1. Introduction

Skin burns are severe injuries causing high rates of morbidity and mortality. According to the World Health Organization (WHO), around 180000 deaths are caused by burns and 11 million people worldwide were burned severely enough to require medical attention [1].

The skin is the largest organ and the first line defense barrier against aggressive external agents [2], it is particularly sensitive to the high energy action of ionizing radiation due to the existence of continuously dividing cells [3]. However, thermal burns are the most frequent burns and are caused by flames or contact with hot or boiling liquids [4].

Important efforts have been focused on the research of effective therapies for cutaneous wound healing. In this context, the antioxidant therapy has been well documented [5].

Among antioxidant agents for wound healing several types of vitamins have been proposed. In this context, the most commonly evaluated form of vitamin E, alpha tocopherol has been widely reported as antioxidant agent. Alpha tocopherol prevents the oxidation damage of collagen and glycosaminoglycans during wound healing and accelerates the wound closure [6].

Vitamin D also possesses antioxidant capacity. It has been reported to reduce inflammation in a variety of tissues by its regulatory role in antigen presenting cell differentiation, lymphocyte proliferation, innate immune receptor signaling, and cytokine and chemokine expression [7]. Furthermore, vitamin D induces the formation of antimicrobial peptides which might provide additional protection in wound healing [8]. In the present context, although not being an antioxidant substance, vitamin A has also been related to epithelial repair by increasing collagen synthesis and promoting early inflammatory processes specifically on macrophage cells in wound healing, as well as angiogenesis [9].

Another significant field in the research of effective therapeutic tools for skin burns is devoted to the development of appropriate drug delivery systems specifically designed for the particular circumstances in wound healing, which should meet requirements such as elasticity, moisture, pH maintenance, antimicrobial properties and promote wound healing [10]. Hydrogels are crosslinked three-dimensional (3D) network structures that can be swollen with a large amount of water [11]. Among them thermosensitive *in situ* hydrogels have important biomedical applications as drug carriers. Polymers such as poloxamer 407 (P407) are able to exhibit sol-to-gel transitions when they are applied at the body temperature, due to an amphiphilic nature consisting of a central hydrophobic block of polypropylene oxide (PPO) flanked by hydrophilic polyethylene blocks (PEG-PPO-PEG). P407 also possesses healing properties [12].

Another polymer used in dermal biomedical applications is chitosan (CTS). CTS [(1 fi 4)-2-amino-2-deoxy-b-D-glucan] is a polycationic copolymer consisting of glucosamine and N-acetylglucosamine units obtained by alkaline deacetylation of the natural polysaccharide chitin [13], with inherent biological properties regarding wound healing [14], as well as analgesic, hemostatic and antimicrobial effects [15]. CTS is commonly used with hyaluronic acid (HA), an endogenous glycosaminoglycan of the extracellular matrix (ECM) with important modulation roles in wound healing [16].

Thus, the main purpose of this study was the design, evaluation and selection of the optimal hydrogel formulation combinations based on P407, CTS and HA mixtures for the inclusion of vitamins A, D and E aimed for the treatment of skin burns. Furthermore, the *in vitro* physicochemical characterization, *ex vivo* antimicrobial efficacy, and *in vivo*

therapeutic effects by using partial thickness burn wound model were addressed for its use in wound healing to treat skin burn lesions in a pre-clinical model.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All reagents and solvents used were obtained from commercial sources and utilized without prior purification. P407 was purchased from BASF (Barcelona, Spain). Medium-molecular-weight CTS prepared by the alkaline deacetylation of chitin obtained from the shells of shrimp (*Pandalus borealis*), 75-85% deacetylated was obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Sodium hyaluronate, vitamin A (retinol palmitate) 200,000 IU/mL, vitamin D3 (cholecalciferol) 100,000 IU/g, and vitamin E (alpha tocopherol acetate), were obtained from Fagron Iberica (Barcelona, Spain). The commercial silver sulfadiazine formulation silvederma® 10 mg/g topical cream was purchased from a local pharmacy. Double distilled water was used after filtration in a Milli-Q® Gradinet A10 system apparatus (Millipore Iberica, Madrid, Spain). All other chemicals were of analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) unless otherwise noted.

2.2. Preparation of P407/CTS/HA hydrogels

Required amounts of P407, CTS and HA were pre-weighed according to Table 1. HA 0.2% (w/v) solutions were prepared by adding the HA to doubled distilled water under continuous stirring for 1 h at room temperature and then filtered. These solutions were subsequently utilized for inclusion of P407 and CTS using the cold method. Briefly, required amounts of P407 and CTS were dispersed in 0.5% acetic acid in 0.2% HA solutions previously prepared at 4 °C under continuous stirring for 24 h. These solutions were then filtered to get completely clear solutions obtaining hydrogels labeled from PCH1 to PCH6.

Table 1
Compositions of hydrogel formulations (w/v).

Formulation code	P407	CTS	HA	Gelation temperature (°C)	Gelation Time (min)
PCH1	16	0.5	0.2	37	0.95
PCH2	16	1	0.2	32	1.43
PCH3	18	0.5	0.2	32	1.01
PCH4	18	1	0.2	30	1.66
PCH5	20	0.5	0.2	27	1.16
PCH6	20	1	0.2	22	0.40
PCH7	22	0.5	0.2	23	0.86
PCH8	22	1	0.2	20	0.16

Once selected the best formulation (PCH3), vitamins A, D and E were incorporated in the formulation. Pre-weighed amounts of vitamin D were dispersed in the pre-selected volumes of Vitamin A and E. Subsequently, this solution was added to 100 mL of a 1.8% (w/v) P407 water solution corresponding to 10% of the final P407 amount to solubilize the actives substances and maintained under stirring for 24 h at 4 °C, the resulting loaded hydrogel was labeled as V-PCH3.

2.3. Physicochemical characterization

2.3.1. Time and temperature of gelation

10 mL sample was put into a transparent vial with a magnetic bar and placed in low temperature water bath. The solution was then heated from 4 to 37 ± 0.1 °C while being stirred (400 rpm). The gelation time and gelation temperature were measured in triplicate, once the magnetic bar stopped moving due to gelation.

2.3.2. pH and surface electrical properties

The pH value of PCH3 and V-PCH3 hydrogels was measured using a calibrated digital pH meter GLP 22 (Crison Instruments, Alella, Spain) at room temperature. The measurements were conducted by direct immersion of the device electrode in the sample contained in a glass vials. Data were expressed as mean \pm SD of three replicates.

The zeta potential (ZP) of PCH3 and V-PCH3 hydrogels was measured at room temperature from the electrophoretic mobility by electrophoretic light scattering (ELS) using a Zetasizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Furthermore, the surface electrical properties of hydrogel as a function of pH variation (from 4 to 8, at constant 10^{-3} M KNO₃ concentration) and ionic strength (from 10^{-1} to 10^{-5} M KNO₃, at pH= 6). Values are reported as the mean \pm SD of three replicates.

2.3.3. Swelling test

The swelling behavior of PCH3 and V-PCH3 hydrogels was determined by weighing known amount of samples (0.1 g) in an Eppendorf tube with phosphate buffered saline (PBS) at two different pH values, 5.5 and 7.4. Samples were shook at 150 rpm in a water bath at 32 ± 0.5 °C for pH 5.5 and 37 ± 0.5 °C for pH 7.4. At pre-established time intervals PBS was removed from samples after the incubation period by a filter paper and the swollen hydrogel samples were weighed. The swelling (Sw) was calculated in triplicate as a measure of weigh lost according to the following equation:

$$\text{Sw (\%)} = (\text{Wi} - \text{Wd}) / \text{Wi} \times 100 \quad (1)$$

Were W_i is the initial weigh of hydrogel and W_d the weight of hydrogel at different times.

2.3.4. Degradation test

The degradation test was performed by immersing known amounts of dried PCH3 and V-PCH3 hydrogels (0.5 g) in PBS at two different pH values, 5.5 and 7.4 and two different temperatures at 32 ± 0.5 °C in the former and 37 ± 0.5 °C in the latter. After incubation times, samples were centrifuged at 11,000 rpm for 1 min, and after removing the excess of PBS, weighed. After each measurement a 1 mL of PBS was added to maintain original conditions. The degradation (%) as a measure of weigh lost was calculated in triplicate according to the equation described above (Eq.1).

2.3.5. Wettability

The surface wettability of the V-PCH3 hydrogel was determined by measuring the water contact angle at room temperature using a Ramé-Hart 100-00 (230) image goniometer (Ramé-Hart Instrument Co. Succasunna, NJ, USA) provided with a Pixelink PL-A662 CCD camera (Pixelink, Ottawa, ON, Canada) using Sessile drop method. For this task, a 30 μ L drop of doubled distilled water was added to the hydrogel surface. The device was tuned to

make the drop visible. Then the contact angle was recorded in triplicate from until the drop had disappeared.

2.3.6. Porosity

The porosity of the V-PCH3 hydrogel was calculated in triplicate by the Archimede's method. Known amounts of hydrogel (0.1 ± 0.001 g) was suspended in PBS (pH 5.5) and PBS (pH 7.4) and then weighed suspended in the PBS. The hydrogel was then removed and the wet mass was recorded. The porosity (%) of hydrogel was calculated using the following equation:

$$\text{Porosity} = (M_w - M_d) / (M_w - M_s) \times 100 \quad (2)$$

where, M_w is the wet mass, M_d is the dry mass and M_s is the suspended mass of the hydrogel.

2.3.7. Spreadability test

Known amounts of samples (0.35 g) were placed within a circle pre-marked on a glass plate over which a second glass plate was placed, as centered as possible, without sliding friction between plates. Increasing weights were added onto the upper plate (10-500 g), so samples were compressed to uniform thickness. After 60 s, the spreading area was measured. Each sample was tested in triplicate for each weight at room temperature. The results were expressed in terms of the spreading area as a function of the applied mass according to the following equation:

$$S = d^2 \times \pi/4 \quad (3)$$

in which S is the spreading area (cm^2) resulting from the applied mass (g), and d is the mean diameter (cm) reached by the sample.

2.3.8. Adhesion and leakage tests

The adhesion and leakage tests of V-PCH3 hydrogel were conducted in agar gel surfaces as previously reported [17]. Briefly, agar (1.5%, w/w) was added to PBS (at pH=7.4 and pH=5.5) under stirring at 95 °C until complete dissolution, and poured into Petri dishes and glass slides, and kept at room temperature. Furthermore, assayed samples were colored with methylene blue for improve observation.

For the adhesion test, 220 mg samples ($n=3$) were placed on the center of the Petri dish and subsequently filled with PBS (pH=7.4) and then rested at 37 °C. The residence time (adhesion time) was visually recorded.

For leakage test, 60 mg samples ($n=3$) were placed onto the end of agar slides, which were put vertically and maintained at 37 °C (pH=7.4 agar slides) and 32 °C (pH=5.5 agar slides). The distance covered by samples was measured after 1min. Results are reported as the mean \pm SD ($n=3$).

2.4. Rheological studies

Rheological analyses were conducted after 24 h preparation. Formulations were submitted to either a steady-state (rotational) or a dynamic (oscillatory) shear with a Haake Rheostress 1 rheometer (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) connected to a thermostatic circulator Thermo Haake Phoenix II + Haake C25P. Data were analyzed with Haake Rheowin Data Manager v. 3.3 software (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Germany).

Thermosensitive gelation processes of formulation were investigated upon temperature sweeping from 10 to 40 °C with a Haake PP60Ti mobile plate (60 mm diameter) under

oscillation mode with a fixed frequency of 1/s and a constant stress of 0.5 Pa. Each sample was equilibrated by placing it between the plate-plate sensor system (1 mm gap) for 5 min to attain the start temperature of 10 °C. The temperature was increased from 10 to 40 °C at a controlled ramp speed for 2000 s and the elastic modulus (G'), viscous modulus (G'') and complex viscosity (η^*) were measured. The temperature at which a sharp rise in viscosity was detected (coinciding with the crossover point where $G' = G''$) was noted as gelation temperature.

2.5. Scanning electronic microscopy (SEM)

V-PCH3 and PCH3 hydrogels were imaged with a FEI Quanta® FEG 650 microscope (Thermo Fisher Scientific-FEI, Fremont, CA, USA) with everhart-thornley detector (E-TD) for dry and conductive samples in high vacuum mode. Samples were processed using the critical point drying technique. Samples were fixed with osmium tetroxide 1% w/v, during 1 h at room temperature, and washed in bidistilled water (three times every 5 min), dehydrated in a series of ethanol solutions of increasing concentration (50, 70, 90 and 100%), at 4 °C, for each 15 min and critical point dried in a Leica® EM CPD300 dryer (Leica microsystems, Wetzlar, Germany). Finally, samples were deposited on a double-coated carbon conductive tape and covered by evaporating them in a high vacuum thermal evaporator Emitech® K975X and observed in high vacuum mode.

2.6. Microbiological studies

The antimicrobial activity of each formula was evaluated through a Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test [18] against Gram-negative bacteria (*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Acinetobacter baumannii* ABAU clinically isolated, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27823 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1 clinically isolated), Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Staphylococcus aureus* MARSA ATCC 43300), and fungi (*Candida albicans* ATCC10231). Suspensions of each microorganism were prepared with 0.5 MacFarland standards (1.5×10^8 colony-forming units/mL), and Mueller-Hinton agar plates were inoculated by streaking a sterile swab in a back-and-forth motion very close together as on move across and down the plate. This action was repeated two times more rotating the plate 60 ° each time. This ensured an even distribution of inoculums that will result in a confluent lawn of growth. Sterile filter-paper discs (6 mm in diameter) were placed into the inoculated agar plates and then 25 μ L of each formula at 4 °C, were deposited over de disk. The inoculated agar plates were incubated for 48 h at 37 °C.

2.7. In vivo studies

2.7.1. Biomechanical skin properties

This study was approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona (IRB00003099) according to the recommendations of the Declaration of Helsinki [19]. Ten healthy female volunteers between 25-38 years old were recruited for the study. All participants signed written informed consent forms. Volunteers were asked not to use skin-care products on the test areas during two days before the study. The volunteers stayed in the test room for at least 20 min prior to the measurements. Baseline readings were recorded just before hydrogel administration. Then, after V-PCH3 hydrogel as well as a reference

formulation silvederma[®] topical administration of 0.5 mL/cm², readings were made at 0 min, 10 min, 1 h and 2 h, from the flexor side of the left forearm.

Trans epidermal water loss (TEWL) and *stratum corneum* hydration (SCH) values were measured using a Tewameter[®] TM 300 and a Corneometer[®] CM 825 (Courage-Khazaka electronic GmbH, Cologne, Germany), respectively, according to published guidelines [20]. Results are reported as the mean±SD (n=10).

2.7.2. Induced mice burned skin model

The wound healing efficacy of hydrogel was evaluated in 4-months old male *Mus musculus* mice (18–20 g). This study was approved by the animal research ethical committee of the University of Barcelona according to the regulations of the Spanish Government (Law 32/2007 of 7 November 2007, and Royal Decree 1201/2005 of 10 October). Animals were maintained under standard animal housing conditions in a 12-h dark-light cycle with access to food and water *ad libitum*. Animals were anaesthetized with an intraperitoneal injection of xylazine HCL (10 mg/kg) and Ketamine (80 mg/kg). Afterwards, the backs of mice were shaved and cleaned with 70% ethanol. To induce partial thickness burn wounds the animals were exposed to hot circular cylindrical devices at 100 °C with a surface area of 1.0 cm² for 10 s. After 10 min the mice (n=5) were divided in different groups as follows: group 1 (control) received no treatment; group 2 (vehicle control) received topical treatment with PCH3 blank hydrogel (without vitamins); group 3 received topical treatment with V-PCH3 hydrogel; and group 4 received topical treatment with reference formulation silvederma[®]. The mice were treated with equal volume of topical formulation, once daily with regards to the assigned group during 10 days.

2.7.3. Histological analysis of burn wound

After the treatment period, mice were sacrificed by cervical dislocation and the skin of the backs was surgically excised to be analysed histomorphologically. The samples were set up for 24 h in 4% buffered formaldehyde at room temperature, then embedded in paraffin, cut into 5 µm sections, stained with hematoxylin and eosin, and finally viewed under a microscope (Olympus BX41 and Olympus XC50 camera) for the evaluation of skin structure.

2.8. Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SD of at least three replicates unless stated otherwise. One-way analysis of variance (ANOVA) was carried out testing the differences between the mean values. The biomechanical results were also analyzed by Tukey's multiple comparison test. The Prism[®] software, v. 3.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) was utilized. Results were considered to be significant if $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Preparation physicochemical characterization of hydrogel

In Table 1 are shown the composition of developed hydrogels, as well as gelation times and temperatures. Considering that the natural skin temperature is ~32 °C [21], formulations PCH2 and PCH3 were firstly selected. From these, PCH3 composed of 18% (w/v) P407, 0.5% (w/v) CTS and 0.2% (w/v) HA was finally chosen for its lower gelation time. Then vitamins were loaded in the selected hydrogel at the following rates: vitamin A 6,000 IU/g, vitamin D 400 IU/g and vitamin E 2% (w/v). This V-PCH3 hydrogel showed a gelation temperature of 32 °C and thermogelling time of 1.3 min.

The pH value of V-PCH3 hydrogel was 4.6 ± 0.1 . The electrophoretic characterization of loaded and blank hydrogel is depicted in Fig. 1. As can be observed, PCH3 hydrogel showed a marked ZP decrease as pH increased following a linear dependence (Fig. 1A). ZP of V-PCH3 showed more reduced dependence on pH variation. On the other hand, the ZP-ionic strength trend exhibited no dependence up to 10^{-4} M, at which ZP started to decrease considerably also for PCH3. However, in the case of V-PCH3 this decline was much less pronounced than unloaded PCH3 hydrogel (Fig. 1B).

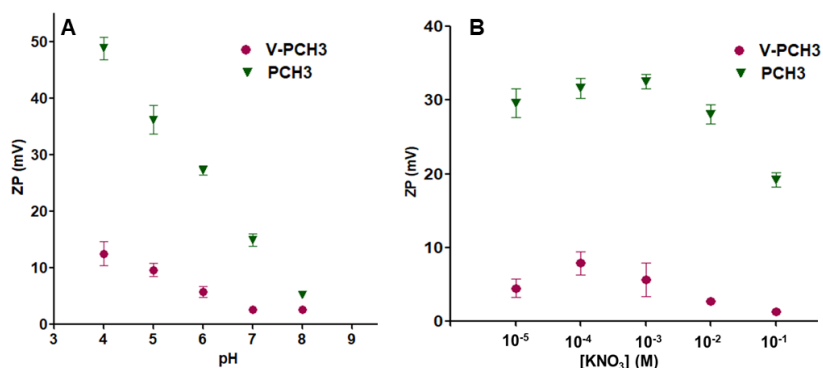


Fig. 1. Zeta potential (ZP, mV) of hydrogels as a function of pH in the presence of 10^{-3} M KNO_3 concentration at 25.0 ± 0.5 °C (A); and as a function of ionic strength at pH=6 (B). Values are given as mean \pm SD (n=3).

Fig. 2A shows the swelling behavior of PCH3 and V-PCH3 hydrogels at two different pH values. It can be observed higher swelling rates at pH=5.5 reaching values in the vicinity of 350%. V-PCH3 hydrogel at pH=5.5 was the formulation with the best swelling pattern for more than 100 min. In contrast, the degradation test showed similar results for both pH conditions in V-PCH3 hydrogel (Fig. 2B). This degradation profile was faster for PCH3 than V-PCH3. Degradation rates around 100% were reached for PCH3 in 10 min. Whereas V-PCH3 was able to remain up to 30 min.

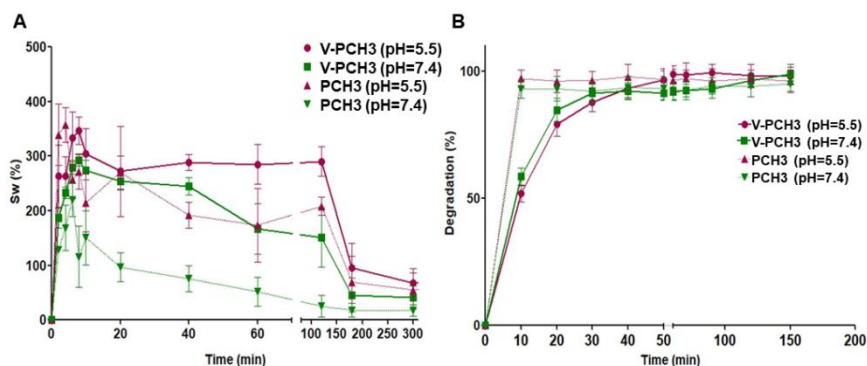


Fig. 2. Swelling behavior (%) of PCH3 and V-PCH3 hydrogels at pH 5.5 (32 ± 0.5 °C), and pH 7.4 (37 ± 0.5 °C) (A). Spreading area (S, cm²) as a function of the applied mass (g) at room temperature of PCH3 and V-PCH3 hydrogels at similar conditions (B). Each value represents the mean \pm SD (n = 3).

Resultados

The wettability of V-PCH3 hydrogel measured in terms of contact angle. Fig. 3A shows contact angle of V-PCH3, being the initial value 37.42 °. It can be seen that the water contact angle hydrogel is decreased with time. Contrary, PCH3 showed contact angle measurement only at 0 and 2 s. Besides, the calculation of porosity resulted in values of 39.89% and 37.84% at pH=5.5 for PCH3 and V-PCH3, and 52.32% and 44.51% at pH=7.4, respectively.

Furthermore, Fig. 3B shows the spreadability profile of V-PCH3 and PCH3 hydrogels. It can be observed high spreadability properties with an exponential pattern reaching maximum values of 12.5 cm² for both, loaded and unloaded hydrogel.

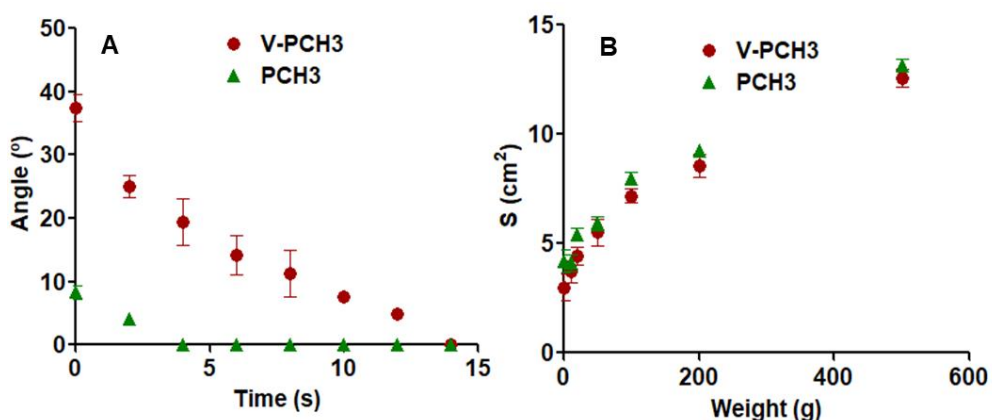


Fig. 3. Contact angle of PCH3 and V-PCH3 hydrogels at pH 5.5 (32±0.5 °C), and pH 7.4 (37±0.5 °C) (A). Degradation percentage (%) of PCH3 and V-PCH3 hydrogels at similar conditions (B). Each value represents the mean±SD (n = 3).

Regarding adhesion test results, after 3 h the presence of methylene blue was not detected in any case, V-PCH3 or PCH3 suggesting similar adhesion to the agar gel surface and thus similar residence time (Data not shown).

In Fig. 4 is depicted the running distances of V-PCH3 or PCH3 at different pH media after 1 min. No differences were observed between the same samples at different pH media. However, PCH3 exhibited substantially greater leakage values than those observed in V-PCH3.

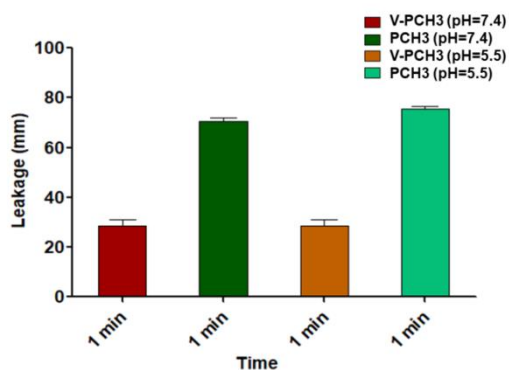


Fig. 4. Leakage (mm) of V-PCH3 and PCH3 hydrogels after 1 min in agar surfaces at different conditions, pH 7.4 and 37±0.5, and pH 5.5 and 32±0.5 °C. Bars represent mean±SD (n=3).

3.2. Thermosensitivity and rheological properties

It was observed that both formulations were liquids or fluid at 10 °C and for this reason these systems were predominantly viscous ($G'' > G'$). When the temperature was increased the values of both modulus sharply increased but with different intensities from 19 °C for PCH3 and 22 °C for V-PCH3. In all cases, a crossover ($G' = G''$) of 10.0 and 162.7 Pa appeared respectively at 21.52 °C and 27.01 °C for PCH3 and V-PCH3 (Fig. 5).

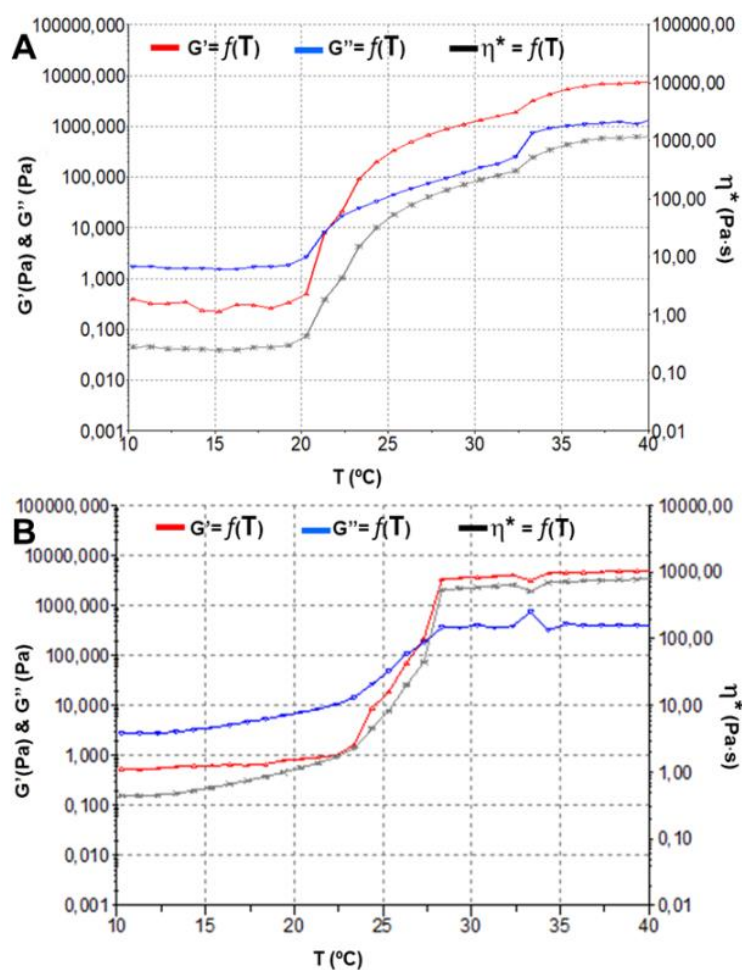


Fig. 5. Storage modulus (G'), loss modulus (G''), and complex viscosity (η^*) as function of temperature for PCH3 (A) and V-PCH3 (B).

3.3. Morphological evaluation: SEM analysis

Fig. 6 illustrates the arrangement of V-PCH3 hydrogel. A network with an interconnected porous structure was observed derived from the potential cubic self-assembly micellar disposition typical of poloxamer with rough surfaces probably due to chitosan content. It was also observed a relatively homogeneous pore size distribution around 500 nm and micellar sizes of ~60 nm.

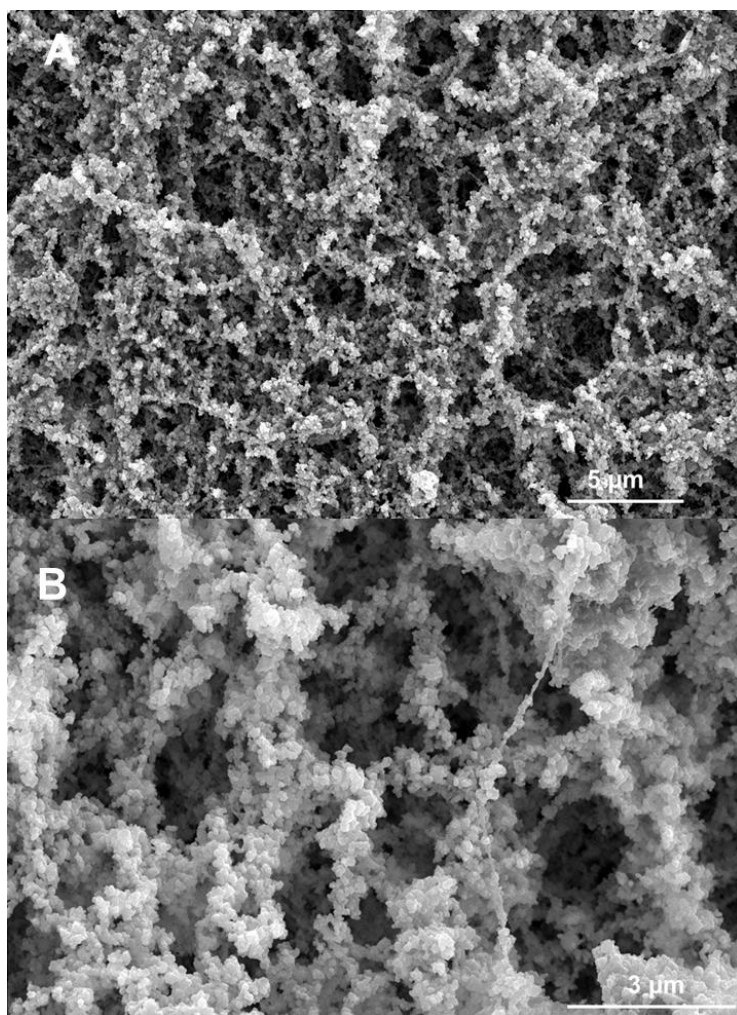


Fig. 6. Scanning Electron Microscopy obtained for V-PCH3, 13,000× magnification (A), 30,000× and magnification (B).

3.4. Microbiological studies

In Table 2 are depicted the obtained results of microbiological studies. PCH3 and V-PCH3 showed activity against all strains except for *E. coli*. However, this biological action

was not enough to properly consider them as antibiotics. But results show that unloaded and vitamin loaded hydrogels were able to produce microorganism inhibition with higher efficacy than the reference in some of the strains, as in the case of *P. aeruginosa* PAO-1, *P. aeruginosa* ATCC 27823, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* MARSA ATCC 43300 and *C. albicans* ATCC 10231, and similar growth reduction than reference except for *E. Coli*.

Table 2

Inhibitory halos and growth reduction produced by the reference formulation silvederma[®], PCH3 (blank hydrogel) and V-PCH3 (hydrogel loading vitamins A, D and E) against different pathogen microorganisms.

Microorganisms	Inhibition halos (mm)			Growth reduction		
	Reference	PCH3	V-PCH3	Reference	PCH3	V-PCH3
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	7*	8	8	+*	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i> ABAU	15	10	8	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	7	0	0	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27823	7	10	8	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO-1	7	8	8	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	7	9	9	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> MARSA ATCC 43300	7	11	8	+	+	+
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	7	9	10	+	+	+

(*) Observed resistant colonies; (-) no growth inhibition; (+) growth inhibition.

3.5. Biomechanical skin properties

Results of evaluated biomechanical parameters before (baseline) and after application at different time intervals are depicted in Fig. 7. Changes on TEWL values were recorded after 15 min of application in all formulations. Equally, SCH also evidenced variations after 15 min, 1 and 2 h of application except in the case of V-PCH3.

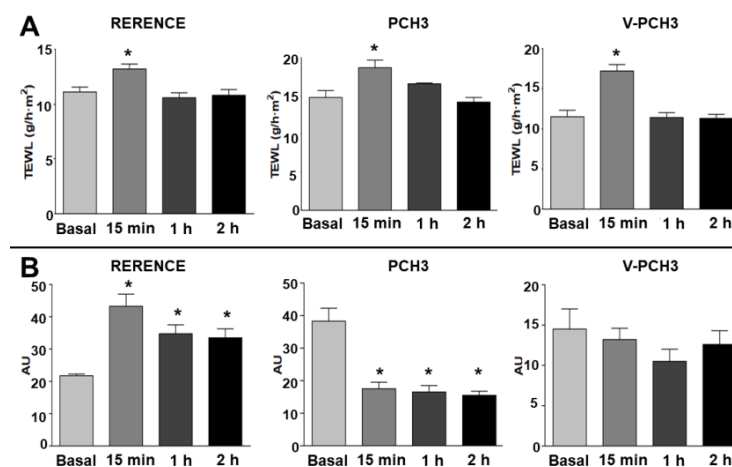


Fig. 7. Change in TEWL value before and after application of reference silvederma[®], PCH3, and V-PCH3 to the left forearm of volunteers (A). Change in SCH value (b). Bars represent mean±SD (n=10). Statistically significant differences regarding basal values (*), p<0.05.

3.6. Histological analysis

As shown in Fig. 8, mice skin in control conditions (A) consists of a contiguous *stratum corneum*, a normal epidermis followed by unaltered dermis with unaltered dermal appendages such as sebaceous glands and hair follicles. The positive control (without treatment) (B) and the blank hydrogel PCH3 (D) skin architecture show signs of a second-degree burn with exposure of the dermis layer due to loss of *stratum corneum* and epidermis and accompanied by loss of hair follicles. As can be shown in the micrograph, the administration of the vitamin loaded hydrogel V-PCH3 (E) induced a re-epithelialization of the skin showing tissue healing with initial recovery of dermal appendages and similar epidermis, dermis and *stratum corneum* to the commercial burn formulation silvederma[®] (Fig. 8C) almost having the same characteristics as the control conditions (Fig. 8A).

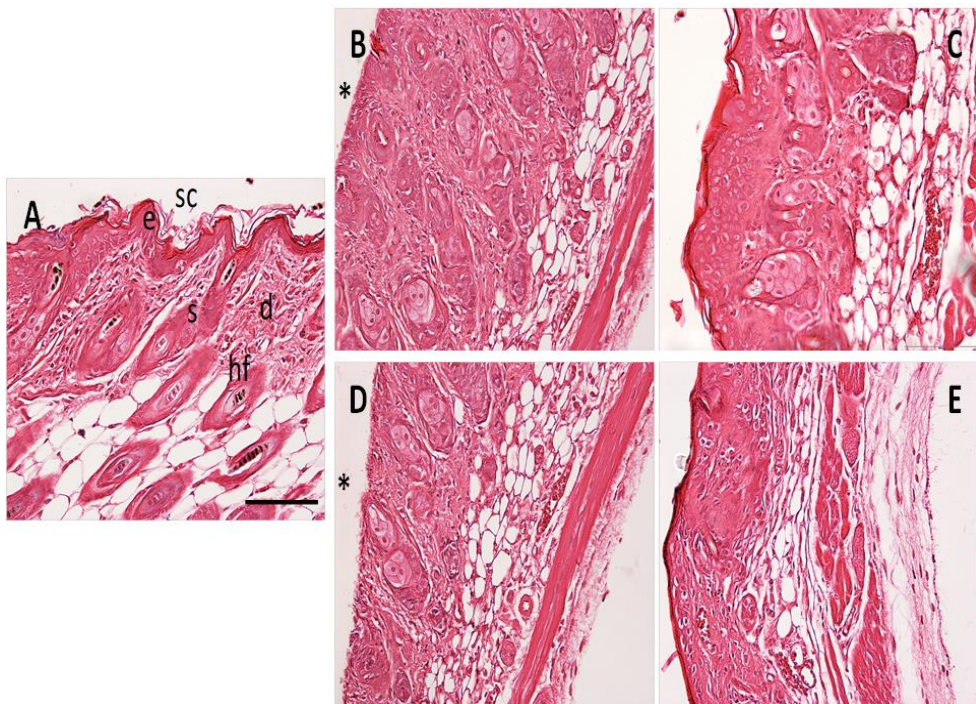


Fig. 8. Representative histological sections (original magnification, 200 \times) of mouse skin in control conditions (A), and of burned skin; without treatment (B), treated with commercial reference silvederma[®] (C), with blank hydrogel PCH3 (without vitamins) (D) and vitamin loaded hydrogel V-PCH3 (E). Skin structures: e, epidermis; d, dermis; s, sebaceous gland; hf, hair follicle; asterisk, loss of stratum corneum and epidermis. Scale bar = 100 μ m

4. Discussion

The selection of the components of the hydrogel aimed for the treatment of skin burns was based on their biocompatibility and intrinsic pharmacological properties to facilitate tissue promoting the wound healing as in the case of CTS and HA [22]. On the other hand, the hydrogel should be able to solubilize the active ingredient, in this case lipophilic molecules such as vitamins A, D and E. It is well-known the ability of P407 to solubilize this types of molecules by the formation of micelles.

Based on best gelation properties the hydrogel vehicle labeled as PCH3 was selected for the inclusion of active antioxidant agents (Table 1), composed of 18% P407, 0.5% CTS and 0.2% HA.

The pH value of topical formulations should be evaluated given its numerous significant implications. The pH of V-PCH3 hydrogel was 4.6 ± 0.1 , an optimal value taking into consideration that pH of healthy skin is ~ 4.7 [23]. This acidic environment represents presents a barrier to bacterial expansion and facilitates the fibroblast growth [24]. Furthermore, the pH has been reported to determine the electrokinetic properties of colloids [25]. As shown in Fig. 1 the electrokinetic properties of PCH3 hydrogel showed much more marked dependence than V- PCH3 on pH. This effect might be due to the action of vitamins on the ZP of loaded hydrogel. In the case of PCH3 at acidic pH the concentration of H^+ is high, and the amino groups of CTS are positively charged (NH_3^+). When the pH increases, the concentration of H^+ is low and the amino groups are neutral. In the case of V-PCH3 the amino groups of CTS might not be available because of some interaction with vitamins.

The swelling behavior in wound healing could help to adsorb exudates and provide mechanical resiliency to the delivery system at the biological site of action [26]. Our results showed high rates of swelling being the V-PCH3 hydrogel the best formulation in this sense at pH=5.5. This finding was in line with porosity results pH, according to which, the V-PCH3 possessed higher porosity values. In our study the swelling behavior was assayed at two pH values in an attempt to mimic the skin surface and the more internal skin tissue environment. The contact angle was recorded as a measure of wettability showing an initial value of 37.42° . This value was less than 90° which corresponds to high wettability and thus able to maintain moist environments.

In Fig. 3B is shown the spreadability patterns of hydrogels. It can be easily observed optimal properties of spreadability; hence, less amount of force was required to extrude the gel from the container and to reach a correct administration dose. This property also involves the spreading capacity of the hydrogel on the surface requiring certain application of shear.

Topical delivery system should also have adequate mechanical properties to avoid the detachment and breakage of *in vivo* conditions as well as adhere properly to the wound. According to our results V-PCH3 or PCH3 could remain for approximately 3 h exerting the topical therapeutic action. The incorporation of CTS to formulations has been previously proposed as strategy for improving adhesiveness and residence time of poloxamer systems [27].

The results of leakage also showed that V-PCH3 covered significantly shorter distance at two pH values 7.4 and 5.5. Not so much as to cause administration problems, but sufficient to reach all hardly available locations of the internal wound.

Rheology is a useful technique to characterize the structure strength of semisolid systems and predict their behavior for topical uses indicating how much a sample deforms or how fast it flows by stressing [28]. The elastic G' and viscous G'' moduli are both important

rheological parameters for poloxamer-based formulations [29]. As shows Fig. 5 formulations showed thermo-sensitivity. These changes in viscoelasticity behavior with the temperature might imply beneficial variations in the product texture and adhesiveness which may facilitate the topical application and effectiveness of the drug product. These temperatures could be considered as the gelation point of each sample. After that, the systems thickened considerably and became predominantly elastic ($G' > G''$) exhibiting an elastic plateau from approximately 35 and 28 °C respectively. This behavior is due to the hydrophilicity nature of blocks of P407 as a function of temperature and polymer concentration [12].

Regarding antimicrobial efficacy results it is an important improvement the antimicrobial properties of our formulation, while not being, in itself, and antimicrobial agent was able to demonstrate similar activity to a commercial formulation aimed as topical antibiotic action contain argentic sulfadiazine. As mentioned above CTS has been reported to exert antimicrobial properties by destabilization of microbial membranes [30]. Thus this action would provide synergistic effect acting like a disinfectant to the wound healing action of vitamins.

None of the tolerance study volunteers showed signs of redness, itching or other skin reactions. As a general result it could be considered that V-PCH3 did not alter the biophysical properties of skin and thus was suitable and safe for skin application. The TEWL as a measure of the tissue integrity was higher only for the first moments after application and remained unnoticed by volunteers. On the other hand, SCH value was significantly higher for the reference silvederma[®] probably due to the hydration action of its ingredients. Contrary, PCH3 application resulted in a significant smaller SCH value.

The vitamin loaded hydrogel V-PCH3 was applied in a mouse model of induced burn skin to investigate its possible healing effect. Histological results showed a regenerative action on burns. The biological actions of antioxidant in wound healing and concretely by vitamins A, D and E have been previously reported although the mechanisms of actions are confusing and controversial [31-33].

4. Conclusions

In this work P407/CTS/HA thermosensitive hydrogel loading vitamin A, D and E as antioxidant molecules with important biological effects on wound healing was designed and elaborated. Physicochemical and biological properties of hydrogel were evaluated and results demonstrated that the developed topical system showed the desired mechanical properties for its application in skin wounds possessing antimicrobial and wound healing effects, being totally innocuous for health skin. These findings allow us to hypothesize that V-PCH3 hydrogel is an optimal therapeutic tool, and thus a great candidate to investigate in further clinical stages.

Acknowledgments

The authors would like to thank to Maria Rincón (PhD), Lilian Sosa (PhD), Cristina Moles (BSc) from the University of Barcelona and Noelia Pérez (BSc) from the University of Granada are acknowledged for their excellent technical support.

Conflict of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- [1] World Health Organization. Burns. 2008. <http://www.who.int/news-room/factsheets/detail/burns>. (Accessed 5 January 2019).
- [2] Soriano-Ruiz JL, Calpena-Capmany AC, Cañadas-Enrich C, Febrer NB, Suñer-Carbó J, Souto EB, Clares-Naveros B. Biopharmaceutical profile of a clotrimazole nanoemulsion: Evaluation on skin and mucosae as anticandidal agent. *Int J Pharm*. 2018;554:105-15.
- [3] Ryan JL. Ionizing radiation: the good, the bad, and the ugly. *J Invest Dermatol*. 2012;132(3Pt 2):985-93.
- [4] American Burn Association. National Burn Repository 2017 Update. http://ameriburn.org/wp-content/uploads/2018/05/2017_aba_nbr_annual_report-1.pdf. (Accessed 30 December 2018).
- [5] Fitzmaurice SD, Sivamani RK, Isseroff RR. Antioxidant therapies for wound healing: a clinical guide to currently commercially available products. *Skin Pharmacol Physiol*. 2011;24(3):113-26.
- [6] Musalma M, Nizrana MY, Fairuz AH, NoorAini AH, Azian AL, Gapor MT, Wan Ngah WZ. Comparative effects of palm vitamin e and α -tocopherol on healing and wound tissue antioxidant enzyme levels in diabetic rats. *Lipids*. 2005;40(6): 575-80.
- [7] Reins RY, Hanlon SD, Magadi S, McDermott AM. Effects of topically applied vitamin D during corneal wound healing. *PLoS One*. 20;11(4):e0152889.
- [8] Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, Schaubert J, Wu K, Meinken C, Kamen DL, Wagner M, Bals R, Steinmeyer A, Zügel U, Gallo RL, Eisenberg D, Hewison M, Hollis BW, Adams JS, Bloom BR, Modlin RL. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*. 2006;311(5768):1770-3.
- [9] Hunt TK. Vitamin A and wound healing. *J Am Acad Dermatol*. 1986;15(4 Pt 2):817-21.
- [10] Wiegand C, Hipler UC. Polymer-based biomaterials as dressings for chronic stagnating wounds, *Macromol Symp*. 2010;294:1-13.
- [11] Annabi N, Tamayol A, Uquillas JA, Akbari M, Bertassoni LE, Cha C, Camci-Unal G, Dokmeci MR, Peppas NA, Khademhosseini A. 25th anniversary article: Rational design and applications of hydrogels in regenerative medicine. *Adv Mater*. 2014;26(1):85-123.
- [12] Brugués AP, Naveros BC, Calpena Campmany AC, Pastor PH, Saladrigas RF, Lizandra CR. Developing cutaneous applications of paromomycin entrapped in stimuli-sensitive block copolymer nanogel dispersions. *Nanomedicine (Lond)*. 2015;10(2):227-40.
- [13] Rodríguez-Vázquez M, Vega-Ruiz B, Ramos-Zúñiga R, Saldaña-Koppel DA, Quiñones-Olvera LF. Chitosan and its potential use as a scaffold for tissue engineering in regenerative medicine. *Biomed Res Int*. 2015;2015:821279.
- [14] Mayol L, De Stefano D, Campani V, De Falco F, Ferrari E, Cencetti C, Matricardi P, Maiuri L, Carnuccio R, Gallo A, Maiuri MC, De Rosa G. Design and characterization of a chitosan physical gel promoting wound healing in mice. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25(6):1483-93.
- [15] Zhao X, Wu H, Guo B, Dong R, Qiu Y, Ma PX. Antibacterial anti-oxidant electroactive injectable hydrogel as self-healing wound dressing with hemostasis and adhesiveness for cutaneous wound healing. *Biomaterials*. 2017;122:34-47.
- [16] Prosdocimi M, Bevilacqua C. Exogenous hyaluronic acid and wound healing: an updated vision. *Panminerva Med*. 2012;54(2):129-35.
- [17] Esposito E, Drechsler M, Huang N, Pavoni G, Cortesi R, Santonocito D, Puglia

- C. Ethosomes and organogels for cutaneous administration of crocin. *Biomed Microdevices*. 2016;18(6):108.
- [18] Hudzicki J. 2009. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology. Protocol. 3189. <http://www.asmscience.org/docserver/fulltext/education/protocol/protocol.3189.pdf?expires=1546990230&id=id&acname=guest&checksum=3BBDDDB248802E16CC627C66E989A30E7> (Accessed 5 January 2019).
- [19] World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects *Japan Med Assoc J*. 2014;57(5-6):291-2.
- [20] du Plessis J, Stefaniak A, Eloff F, John S, Agner T, Chou TC, Nixon R, Steiner M, Franken A, Kudla I, Holness L. International guidelines for the in vivo assessment of skin properties in non-clinical settings: Part 2. transepidermal water loss and skin hydration. *Skin Res Technol*. 2013;19(3):265-78.
- [21] Clares B, Calpena AC, Parra A, Abrego G, Alvarado H, Fangueiro JF, Souto EB. Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: effect on skin permeation. *Int J Pharm*. 2014;473(1-2):591-98.
- [22] Dickinson LE, Gerecht S. Engineered Biopolymeric Scaffolds for Chronic Wound Healing. *Front Physiol*. 2016;7:341.
- [23] Lambers H, Piessens S, Bloem A, Pronk H, Finkel P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci*. 2006;28(5):359-70.
- [24] Jones EM, Cochrane CA, Percival SL. The effect of pH on the extracellular matrix and biofilms. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015;4(7):431-9.
- [25] Pretel E, Arias JL, Cabeza L, Melguizo C, Prados J, Mallandrich M, Suñer J, Clares B. Development of biomedical 5-fluorouracil nanoplateforms for colon cancer chemotherapy: Influence of process and formulation parameters. *Int J Pharm*. 2017;530(1-2):155-64.
- [26] Gao Y, Kong W, Li B, Ni Y, Yuan T, Guo L, Lin H, Fan H, Fan Y, Zhang X. Fabrication and characterization of collagen-based injectable and self-crosslinkable hydrogels for cell encapsulation. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018;167:448-56.
- [27] Ur-Rehman T, Tavelin S, Gröbner G. Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. *Int J Pharm*. 2011;409(1-2):19-29.
- [28] Mallandrich M, Fernández-Campos F, Clares B, Halbaut L, Alonso C, Coderch L, Garduño-Ramírez ML, Andrade B, Del Pozo A, Lane ME, Calpena AC. Developing transdermal applications of ketorolac tromethamine entrapped in stimuli sensitive block copolymer hydrogels. *Pharm Res*. 2017;34(8):1728-1740.
- [29] Liu Y, Yang F, Feng L, Yang L, Chen L, Wei G, Lu W. In vivo retention of poloxamer-based in situ hydrogels for vaginal application in mouse and rat models. *Acta Pharm Sin B*. 2017;7(4):502-509.
- [30] Rabea EI, Badawy ME, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 2003;4(6):1457-65.
- [31] Abdelmalek M, Spencer J. Retinoids and wound healing. *Dermatol Surg*. 2006;32(10):1219-30.
- [32] Leivo T, Kiistala U, Vesterinen M, Owaribe K, Burgeson RE, Virtanen I, Oikarinen A. Re-epithelialization rate and protein expression in the suction-induced wound model: comparison between intact blisters, open wounds and calcipotriol-pretreated open wounds. *Br J Dermatol*. 2000;142(5):991-1002.
- [33] Thiele JJ, Ekanayake-Mudiyanselage S. Vitamin E in human skin: organ-specific

physiology and considerations for its use in
dermatology. *Mol Aspects Med.*
2007;28(5-6):646-67

Artículo 5

DESIGN AND EVALUATION OF CHITOSAN/GLYCOSAMINOGLYCANS QUATERNARY HYDROGELS SCAFFOLDS FOR MESENCHYMAL STEM CELLS AIMED FOR SKIN BURNS

*(Diseño y evaluación de hidrogeles cuaternarios
chitosan/glicosaminoglicanos como andamios para células
madre mesenquimales destinadas a las quemaduras en piel)*

*José L. Soriano-Ruiz, Patricia Gálvez-Martín, Elena López-
Ruiz, Joaquim Suñer-Carbó, Ana C. Calpena-Campmany,
Juan A. Marchal, Beatriz Clares-Naveros*

Materials Science and Engineering: C

(SOMETIDO; Ref. MSEC_2018_3564)

ISSN: 0928-4931
eISSN: 1873-0191
Editorial: Elsevier Science BV (Holanda)
Factor de Impacto: 5.080
Categoría: Material Science, Biomaterials
Posición: 6/33
Cuartil: 1°

Resumen

El principal objetivo de este estudio fue el diseño, desarrollo y caracterización de un sustrato de quitosán para andamiaje incluyendo cuatro glicosaminoglicanos para proveer de un microambiente a células madre mesenquimales de origen humano (hMSCs) aisladas de tejido adiposo. Las propiedades físicas de los hidrogeles y la estabilidad fueron investigadas. Los andamios se evaluaron mediante ensayos de estructura y microscopía, así como cultivo celular. El hidrogel con mejores propiedades se seleccionó como candidato para la encapsulación de las hMSCs. La viabilidad de estas hMSCs permaneció por encima del 75% indicando una buena viabilidad celular, y en los días 5 y 7 el número de hMSCs vivas alcanzó una fase estacionaria alrededor del 100%. La microscopía electrónica de barrido reveló compartimentos irregulares con la presencia de las hMSCs en los días 1 y 7 con división celular. Estos resultados indicaron que nuestro andamio de hidrogel proporcionaba un nicho apropiado para la viabilidad celular y podría ser considerado un excelente candidato para sucesivos estudios *in vivo*.

Design and evaluation of chitosan/glycosaminoglycans quaternary hydrogels scaffolds for mesenchymal stem cells aimed for skin burns

José L. Soriano-Ruiz^a, Patricia Gálvez-Martín^{a,b}, Elena López-Ruiz^{c,d}, Joaquim Suñer-Carbó^e, Ana C. Calpena-Campmany^{e,f}, Juan A. Marchal^{d,g,h}, and Beatriz Clares-Naveros^{a,f,h,*}

^a Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, University Campus of Cartuja, 18071 Granada, Spain

^b Advanced Therapies Area, Bioibérica S.A.U., 08029 Barcelona, Spain

^c Department of Health Sciences, University of Jaén, 23071 Jaén, Spain

^d Biopathology and Regenerative Medicine Institute (IBIMER), Centre for Biomedical Research, University of Granada, 18100 Granada, Spain

^e Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 27-31 Joan XXIII Ave., 08028 Barcelona, Spain

^f Nanoscience and Nanotechnology Institute (IN2UB), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

^g Department of Human Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, University of Granada, 18016 Granada, Spain

^h Biosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), Andalusian Health Service (SAS)—University of Granada, Granada, Spain

* **Corresponding author at:** Dr. Beatriz Clares. Faculty of Pharmacy, University of Granada, University Campus of Cartuja, 18071 Granada, Spain. Tel: +34 958246664; Fax: +34 958248958; E-mail: beatrizclares@ugr.es

Abstract

The main goal of this study was the design, development and characterization of a chitosan based scaffolding substrate including four glycosaminoglycans to provide an optimal microenvironment for human mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue (hMSCs). The physical properties of hydrogels scaffolds and stability were investigated. The scaffolds were evaluated by structural and microscopic assays, as well as cell culture analyses. The hydrogel with best suitable properties was selected as candidate scaffold for hMSCs encapsulation. The viability of hMSCs remained above 75%, indicating good cell viability and at days 5 and 7, the number of living hMSCs reached a steady state up to ~100%. Scanning electron microscopy showed irregular compartments with the presence of the hMSCs at days 1 and 7 showing cell division. These findings indicated that our hydrogel scaffold provided a suitable niche for cell viability and could be considered an outstanding candidate for further *in vivo* studies.

Keywords: Chitosan, glycosaminoglycans, mesenchymal stem cells, hydrogel, scaffold, skin burn.

1. Introduction

Nowadays ionizing radiation is an important human health risk to take in mind because its exposure can be caused by a number of different origins [1]. Among human radiation exposure sources, those with greater relevance might be medical treatments such as interventional radiology or radiotherapy, natural radiation sources as sun, industrial procedures such as nuclear power generation, radiologic accidents as was the case of Fukushima accident in 2011, and malicious acts such as terrorist attacks by a radiation dispersal [2]. In such ionizing radiation scenarios, although many organs could be affected by ionizing energy, skin is often the first line defense barrier from the outside environment [3], giving rise to skin radiation injuries involving damage at several levels of severity, from erythema and dermatitis to tissue necrosis and ulceration [4]. These effects will depend on the distance from the source of exposure, the dose of exposure, the type of the radiation, quantity of energy and individual conditions [5]. The skin is particularly sensitive to radiation exposure due to the existence of continuously proliferating and maturing cells [6]. The basal layer of the skin contains proliferating cells constantly dividing and provides a source of cells that move up through supra basal layers of the [3]. Furthermore, sweat glands, hair follicles and sebaceous glands are also a stem cells niche for skin [7].

Several international guidelines have been reported dealing with potential treatments for these severe skin injuries without a general consensus for a specific treatment. In this context, the most promising therapy for the healing of radiation and burn skin injuries are mesenchymal stem cells (MSCs) [8,9], which represent an attractive area of translational research because MSCs may promote repair and regeneration of damaged tissue [10]. MSCs have the capacity to proliferate and differentiate *in vitro* into diverse cells of the mesoderm-type lineages, as osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, myocytes, and fibroblasts among others. In addition to bone marrow, human MSCs (hMSCs) can be isolated from skeletal muscle, connective tissue, human trabecular bones, adipose tissue, periosteum, fetal blood, liver, umbilical cord and umbilical cord blood [11].

However, the poor delivery and viability of the transplanted hMSCs in the desired site of action, such as skin wounds, is a limiting factor for hMSCs therapeutic efficacy [12]. Thus hMSCs should be delivered effectively remaining in contact with the skin lesion environment [13], and this task represents an area of intensive research [14]. The use scaffolds has been widely reported and recommended for the MSCs transfection maintaining their viability [15]. Concretely, cell scaffolds made of natural polysaccharides are attractive platforms because of their biocompatibility properties as well as biological functions [16].

Chitosan (CTS) [(1 fi 4)-2-amino-2-deoxy-b-D-glucan] is a polycationic copolymer consisting of glucosamine and N-acetylglucosamine units obtained by alkaline deacetylation of the natural polysaccharide chitin [17]. It possesses important properties such as biocompatibility, biodegradability, atoxicity and mucoadhesivity [18]. Furthermore, it has been reported that CTS can also provide analgesic effect, hemostatic activity [19], as well as cell proliferation and differentiation [20]. All these characteristics make CTS an excellent candidate as scaffolding material for biomedical and pharmaceutical applications. Polyelectrolyte complexes CTS with glycosaminoglycans (GAGs), such as hyaluronic acid (HA), chondroitin sulfate (CS), dermatan sulfate (DS) and collagen (CO) have also been explored for their efficacy as dressing materials with promising results in wound healing and tissue engineering [21].

Thus, based on all the above mentioned the main purpose of this study was the design, development and *in vitro* characterization of CTS scaffolds based on quaternary blends of the

four GAGs biomacromolecules (HA, CS, DS and CO), as well as the evaluation of their suitability for the support of hMSCs aimed for use in wound healing to treat skin lesions in a pre-clinical model.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All reagents and solvents used were obtained from commercial and utilized without prior purification. CTS prepared by the alkaline deacetylation of chitin obtained from the shells of shrimp (*Pandalus borealis*), highly viscous, $\geq 75\%$ deacetylated was obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). HA, CS, DS and CO were kindly gifted by Bioibérica S.A.U. (Barcelona, Spain). Human albumin, Ringer's lactate medium and 5% glucose solution were supplied by Grifols (Barcelona, Spain). Collagenase was purchased from Roche Farma (Reinach, BL, Switzerland). Double distilled water was used after filtration in a Milli-Q[®] Gradient A10 system apparatus (Millipore Iberica, Madrid, Spain). All other chemicals were of analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) unless otherwise noted.

2.2. Preparation of HA/CS/DS/CO quaternary hydrogel scaffolds

A package medium for MSCs which was assayed in previous studies [11] composed of 50% of a 5% glucose solution, 45% lactated Ringer's solution, and 5% of 20% albumin solution was used as dispersion medium for the elaboration of scaffolds. 1% lactic acid was then added to the dispersion medium under stirring for 10 min at room temperature until complete dissolution. Hence, 0.4 g, 0.8 g and 1.2 g of CTS powder were dissolved in 40 mL of dispersion medium to reach 1, 2 and 3% chitosan solutions (w/v). Equally, appropriate amounts of GAGs, *viz.* HA, CS, DS and CO (see Table 1) were added to each CTS solution and continued by shaking for 1 h at room temperature. Once hydrogels were elaborated were stored at 4 °C, 25 °C and 37 °C for 24 h and labeled as CTS1/HA/CS/DS/CO, CTS2/HA/CS/DS/CO and CTS2/HA/CS/DS/CO.

2.3. Physicochemical characterization

2.3.1. pH and conductivity measurements

The pH values of selected hydrogels stored at three temperatures were determined using a calibrated digital pH meter GLP 22 (Crison Instruments, Alella, Spain) at 25.0 ± 0.5 °C. The measurements were conducted by direct immersion of the device electrode in the sample contained in a glass vials. Data were expressed as mean \pm SD of three replicates. Electrical conductivity of hydrogel scaffolds was measured with a conductivity meter Crison GLP 30 (Crison Instruments, Alella, Spain). An electrode of the device was dipped into a glass vial of the sample. Data were expressed as mean \pm SD (n=3).

2.3.2. Swelling test

The swelling behavior of hydrogel scaffolds was determined by weighing known amount of samples in an Eppendorf tube with phosphate buffered saline (PBS) at two different pH values, 5.5 and 7.4. The samples were shook at 150 rpm in a water bath at 32 ± 0.5 °C for pH 5.5 and 37 ± 0.5 °C for pH 7.4. At pre-established time intervals samples were centrifuged at 5000 rpm for 2 min and after removing the supernatant the swollen hydrogel samples were weighed. The swelling (Sw) was calculated in triplicate as a measure of weigh lost according to the following equation:

$$Sw (\%) = (W_i - W_d) / W_i \times 100 \quad (1)$$

Where W_i is the initial weigh of hydrogel and W_d the weight of hydrogel at different times.

2.3.3. Degradation test

The degradation was calculated by immersing known amounts of dried hydrogels in PBS at two different pH values, 5.5 and 7.4 and two different temperatures at 32 ± 0.5 °C in the former and 37 ± 0.5 °C in the latter. After removing the excess of PBS samples were weighed. After each measurement a 1 mL of PBS was added to maintain original conditions. The degradation (%) as a measure of weigh lost was calculated in triplicate according to the equation described above (Eq. 1).

2.3.4. Extensibility (spreadability) test

Identical amounts of samples were placed within a circle pre-marked on a glass plate over which a second glass plate was placed, as centered as possible, without sliding of the plates. Force was generated onto the upper plate by adding known weights (10-500 g), so the sample was compressed to uniform thickness. After 60 s, the weights were removed and the area of the sample was recorded. Each sample was tested in triplicate for each weight at room temperature. The results were expressed in terms of the spreading area as a function of the applied mass according to the following equation:

$$S = d^2 \times \pi/4 \quad (2)$$

in which S is the spreading area (cm^2) resulting from the applied mass (g), and d is the mean diameter (cm) reached by the sample.

2.3.5. Extrudability test

The extrudability (E , g/cm^2) of developed hydrogels was evaluated in triplicate by measurement of the weight necessary to be applied to extrude an amount of the hydrogel from an aluminum tube according to the following equation:

$$E = W/A \quad (3)$$

Where W is the weigh applied (g) to extrude the gel from the tube and A the area (cm^2) of the extruded hydrogel from the aluminum tube.

2.4. Stress-stability tests

2.4.1. Heating-cooling cycle

Selected hydrogels were subjected to three heating-cooling cycles over a temperature range from 4 °C (refrigerator) to 45 °C (hot air oven) with storage of each temperature for 48 h, and then examined for sings of physical instability (homogeneity, gel collapse, syneresis, etc.).

2.4.2. Centrifugation

Selected hydrogels were centrifuged (Centrifuge 5804 Eppendorf, Hamburg, Germany) at 3,500 rpm for 30 min, and then visually examined for sings of physical instability.

2.4.3. Freeze-thaw cycle

Hydrogels were maintained subjected to -21 °C (freezer) followed by thawing in a water bath at 25 °C for 48 h each condition three cycles, and then visually examined for sings of physical instability.

2.5. Adhesion and leakage tests

The adhesion and leakage tests of developed scaffolds were conducted in agar gel surfaces [22]. For this task agar (1.5%, w/w) was added to water or PBS (at pH=7.4 and pH=5.5) under stirring at 95 °C until complete dissolution and poured into Petri dishes (in the first case), and glass slides (in the second one), and left to cool at room temperature. Furthermore, assayed samples were colored with methylene blue for improve observation. For the adhesion test, 200 mg samples (n=3) were placed on the center of the Petri dish and subsequently filled with PBS (pH=7.4) and then rested at 37 °C. The residence time (adhesion time) was visually recorded.

For leakage test, 125 mg samples (n=3) were placed onto the end of agar slides, which were put vertically and maintained at 37 °C (pH=7.4 agar slides) and 32 °C (pH=5.5 agar slides). The distance covered by samples was measured after 1, 5 and 10 min. Results are reported as the mean±SD (n=3).

2.6. Rheological studies

Rheological analyses were carried out after 24 h preparation. Formulations were submitted to either a steady-state (rotational) or a dynamic (oscillatory) shear with a Haake Rheostress 1 rheometer (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) connected to a thermostatic circulator Thermo Haake Phoenix II + Haake C25P. Data were analyzed with Haake Rheowin Data Manager v. 3.3 software (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Germany).

2.6.1. Rotational measurements

Steady-state measurements were addressed with cone and a mobile upper cone (C60/2° Ti: 60 mm diameter, 2° angle). The shear stress (τ , Pa) was measured as a function of the shear rate ($\dot{\gamma}$, s⁻¹). Viscosity curves [$\eta=f(\dot{\gamma})$] and flow curves [$\tau=f(\dot{\gamma})$] were recorded at 25±0.1°C. The shear rate ramp program included 3 min ramp-up period from 0 to 100 s⁻¹, 1 min constant shear rate period at 100 s⁻¹, and 3 min ramp-down from 100 to 0 s⁻¹.

Representative mathematical models were fit to flow curves (when resulted to be non-Newtonian) searching for the best descriptive model (Bingham, Ostwald de Waele, Herschel-Bulkley, Casson, and Cross). Selection of the best fitting was based on the determination coefficient (r², observed vs. predicted) and chi-square (χ^2) value. The apparent thixotropy (Pa/s) was estimated as the area of hysteresis loop. Steady-state viscosity (η , Pa·s) was determined from the constant shear section at 100 s⁻¹.

2.6.2. Dynamic oscillatory measurements

Parallel plate-plate geometry (Haake PP60 Ti, 60 mm diameter, 0.5 mm gap) was used to perform dynamic test measurements using the same apparatus described above. Firstly, oscillatory stress sweep test was performed at a constant frequency of 1 s⁻¹ to an increasing shear stress from 0.01 to 1000 Pa in order to determine the linear viscoelastic region (LVR) of the samples. After the determination of LVR, frequency sweep test was carried out varying the frequency range within 0.01-10 s⁻¹ at a constant shear rate within the linear viscoelastic region, in order to determine the related variation of the storage modulus (G'), loss modulus (G''), phase angle (δ), and the complex viscosity (η^*) which were used for sample characterization.

2.7. Cell studies

2.7.1. hMSCs isolation and culture from adipose tissue

hMSCs used in this study were isolated from human adipose tissue and characterized as previously shown [11,23]. Cells were cultured with high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich), 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin (Invitrogen Inc., Grand Island, NY, USA) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Medium was regularly changed every 3 days. At 80% of confluence, cells were subcultured. Cells were used between passages 4 and 6 for all the experiments.

2.7.2. Cell encapsulation in the hydrogel scaffold

For cell encapsulation, hMSCs were trypsinized and mixed with CTS2/HA/CS/DS/CO hydrogel at a density of 1×10⁶ cells/mL. A volume of 0.5 mL per well of the cell-laden hydrogel was deposited in a 48-well plate culture dish and cultured for 7 days under cell culture conditions at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

2.7.3. Cell viability

The metabolic activity of encapsulated cells was measured using Alamarblue[®] assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Cell growth was analyzed on incubation days 1, 3, 5 and 7 at 37 °C. Hydrogels were incubated with 10 µL of Alamar Blue (AB) solution per each 100 µL of hydrogel and incubated for 3 h. To optimize the access of AB solution to the entrapped cells, it was mixed with the hydrogel by gently pipetting. After 3 h of incubation at 37 °C, fluorescence intensity was quantified at an excitation wavelength of 530 nm and emission of 590 nm in a Synergy[®] HT multi-detection microplate reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

2.7.4. Live/dead assay

Cell viability after 1 and 7 days entrapment in the hydrogel was also evaluated investigated by the live/dead staining (Invitrogen Inc., Grand Island, NY, USA), using 1 µM calcein AM and 2 µM ethidium homodimer-3 in DMEM supplemented with 10% (v/v) FBS to stain dead cells in red and live cells in green. After staining, hydrogels were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and observed in a confocal microscopy Nikon Eclipse Ti-E A1 (Nikon Instruments Europe B.V., Amsterdam Netherlands).

2.7.5. Cell distribution in the hydrogel

To assess cell distribution in CTS2/HA/CS/DS/CO hydrogel, hMSCs cultured in flask were harvested by trypsinization, centrifuged and stained with the fluorescent dye CellTracker[®] Red 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) (Invitrogen Inc., Grand Island, NY, USA), following manufacturer's instructions. Stained cells were carefully mixed with the hydrogel as previously described. Presence of the stained cells was evaluated on days 1 and 7. Images were taken by confocal microscopy Nikon Eclipse Ti-E A1 (Nikon Instruments Europe B.V., Amsterdam Netherlands) and analyzed using the software's ImageJ and NIS-Elements. In addition, distribution of the cells was studied by optical microscopy Leica DM LB2 (Leica microsystems, Wetzlar, Germany). A drop (0.2 mL) of hydrogel was placed on a glass microscope slide and observed after 1 and 7 days incubation at 37 °C.

2.8. Environmental scanning electronic microscopy (ESEM)

Hydrogel scaffolds were imaged with a FEI Quanta[®] FEG 650 microscope (Thermo Fisher Scientific-FEI, Fremont, CA, USA) with everhart-thornley detector (E-TD) for dry and conductive samples in high vacuum mode, and gaseous SE detector (GSED) for wet samples in environmental mode.

First, samples were freeze-dried after pre-freezing with liquid nitrogen. They were deposited on a double-coated carbon conductive tape and coated with a carbon layer, using an Emitech[®] K975X (Quorum Technologies Ltd, East Grinstead, UK). The average diameter of pore sizes was analyzed with arbitrary matrix zone. In order to observe hydrated lyophilized structure hydrogel after swelling, some samples were immersed in phosphate buffer for 6 h. They were then lyophilized and adhering to the stub as indicated above. These samples were observed in high vacuum mode.

Since lyophilization alters porosity of the hydrogels by inducing rapid cooling and phase separation followed by sublimation under vacuum which results in void formation in the structure of hydrogels [24]. Samples were also analyzed by critical point drying technique [25].

Both cell-laden and cell-free hydrogels were fixed with a solution of glutaraldehyde 2.5% w/v (Merck, Darmstadt, Germany) in 0.1M sodium cacodylate buffer (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), during 2 h at 4 °C, and then washed three times every 15 min with the same buffer solution. Before analysis, samples were processed using the critical point drying technique. Samples were fixed with osmium tetroxide 1% w/v, during 1 h at room temperature, and washed in bidistilled water (three times every 5 min), dehydrated in a series of ethanol solutions of increasing concentration (50, 70, 90 and 100%), at 4 °C, for each 15 min and critical point dried in a Leica[®] EM CPD300 dryer (Leica microsystems, Wetzlar, Germany). Finally, samples were deposited on a double-coated carbon conductive tape and covered by evaporating them in a high vacuum thermal evaporator Emitech[®] K975X and observed in high vacuum mode.

When cells were not clearly visible by critical point-dried technique, the technique was improved by Peltier-stage, which avoids all processing steps prior to imaging, enabling the use of minimally processed, uncoated samples. For this task fresh samples were mounted on the Peltier-stage, which is used to keep the water in samples inside the ESEM sample chamber and to maintain the temperature of our sample below 2 °C. Furthermore, the environmental mode enables working at different water vapor pressures inside the ESEM chamber (it can range from 1 to 20 Torr), which was graduated depending on the temperature of the sample to maintain the hydrogel between 100 and ~70% of relative humidity.

3. Results and Discussion

3.1. Hydrogel formation and physicochemical properties

A great attention has been focused on the development of skin equivalents for skin wounds in recent years. The potential success of this type of therapy depends on the biocompatibility of the material that houses the cells and its ability to maintain their functionality [26]. CTS based scaffolds have shown suitable properties as tissue engineering biomaterials. But the solely use of chitosan is not sufficient to the formation of engineered skin due to the lack of bioactive components such as GAGs [27]. GAGs are important compounds in different stages of skin tissue regeneration and maturation, being important components of extracellular matrix (ECM).

We developed a CTS hydrogel containing with 4 different GAGs (HA, CS, DS and CO) as scaffold for hMSC therapy aimed for skin wounds. In the first step in the development of our CTS based hydrogel scaffolds was the elaboration of these at different concentrations of CTS, 1, 2 and 3% (w/v) and their gelation properties at different temperatures, 4, 25 and 37 °C as depicted in Table 1.

Table 1
Composition (% w/v) and gelation properties of hydrogels.

Hydrogel	Composition					Gelation temperature		
	Chitosan	Hyaluronic acid	Chondroitin sulfate	Dermatan sulfate	Collagen	4 °C	25 °C	37 °C
CTS1/HA/CS/DS/CO	1	0.2	1	0.1	2	-	-	-
CTS2/HA/CS/DS/CO	2	0.2	1	0.1	2	+	+	+
CTS3/HA/CS/DS/CO	3	0.2	1	0.1	2	+	+	+

Chitosan (CTS) and polyelectrolyte complexes: hyaluronic acid (HA), chondroitin sulfate (CS), dermatan sulfate (DS) and collagen (CO). Negative signs mean no gelation and positive signs mean optimal gelation properties after 24 h.

The CTS1/HA/CS/DS/CO did not form the gel at any of the temperatures, and thus was discarded. Contrary, CTS2/HA/CS/DS/CO and CTS3/HA/CS/DS/CO formed gels at each temperature. However, CTS2/HA/CS/DS/CO showed more homogeneity and better macroscopic gelation properties than CTS3/HA/CS/DS/CO, which appeared more compacted.

The pH value of hydrogel scaffolds was 4.7 ± 0.2 and 5.9 ± 0.3 for CTS2/HA/CS/DS/CO and CTS3/HA/CS/DS/CO, respectively, with conductivity values of 0.81 ± 0.07 S/m and 1.02 ± 0.01 S/m, respectively. The acidic pH values recorded from the hydrogel scaffolds were optimal for the skin application; taking into account that pH of healthy skin is around 4.7 [28]. Furthermore, the maintenance of an acidic pH helps to the inhibition of bacterial growth that need $\text{pH} > 6$, decreases the proteolytic activity and enhances the fibroblast growth [29].

On the other hand, conductivity properties of scaffolds may also contribute to induce the specific differentiation of hMSCs [30]. In this line, the conductivity of the scaffold also enhances the cell adhesion and cell-to-cell communication providing an optimal cell environment that mimics the ECM [31]. High values of conductivity were obtained with CTS2/HA/CS/DS/CO and CTS3/HA/CS/DS/CO in line with results obtained in other studies [32].

The ability to absorb liquid or swelling is an important factor in the development of scaffolds because it can promote the transportation of nutrients and with the surrounding environment and provide high mechanical resiliency [33]. In our study the swelling behavior was assayed at two pH values in an attempt to mimic the skin surface and the more internal skin tissue environment.

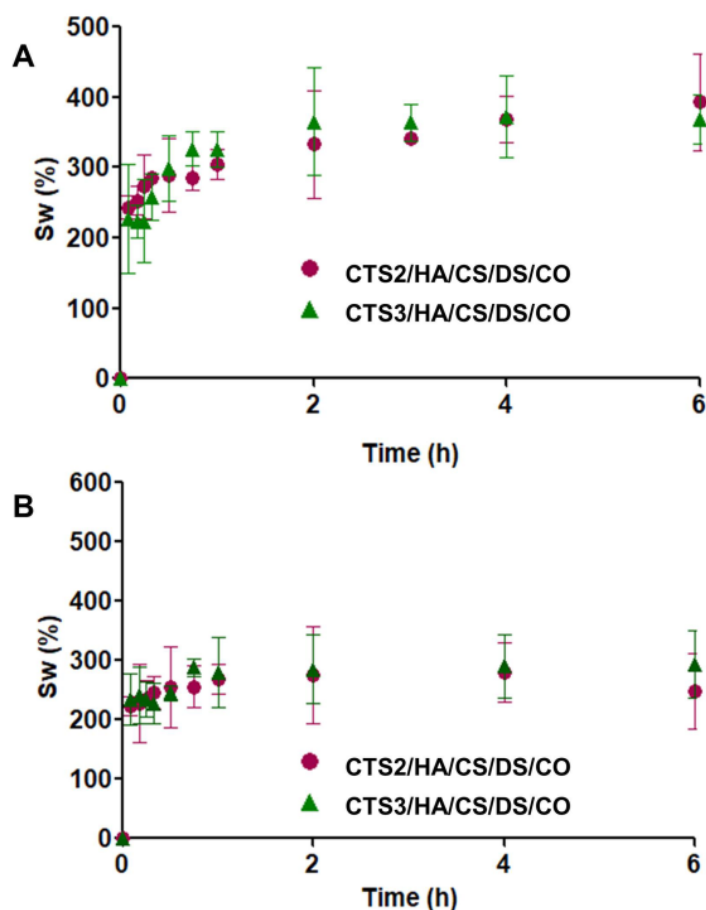


Fig. 1. Swelling behavior (%) of hydrogel scaffolds at pH 5.5 and 32±0.5 °C (A); and pH 7.4 and 37±0.5 °C (B). Each value represents the mean±SD (n = 3).

As shown in Fig. 1 higher swelling rates were observed at pH=5.5 reaching almost 400% than pH=7.4 below 300%. These high swelling could be probably due to the presence of hydrophilic groups, such as amino and hydroxyl groups. The pH environment determined the swelling rate in favor of acidic pH. It might be caused because at low pH, the free amino groups are protonated causing higher electrostatic repulsion between chains promoting polymer solvation.

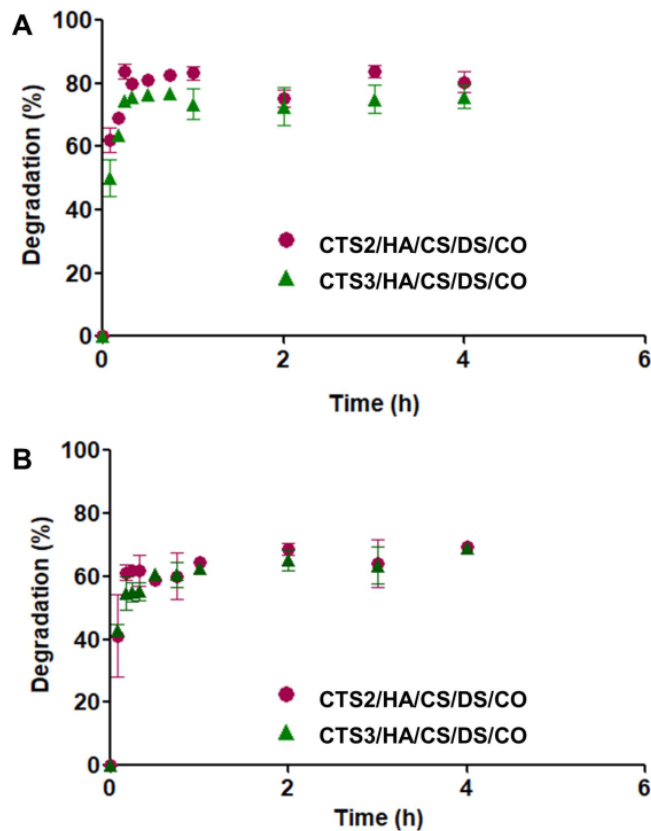


Fig. 2. Degradation percentage of hydrogel scaffolds at pH 5.5 and 32 ± 0.5 °C (A); and pH 7.4 and 37 ± 0.5 °C (B). Each value represents the mean \pm SD (n = 3).

Besides, degradation was lower at pH=7.4 (Fig. 2) when compared with pH=5.5 probably due to higher solubilization of the polymeric matrix of the scaffold, and therefore higher loss. But no differences were observed between hydrogel scaffolds in any of these two studies.

In Fig. 3 is shown the extensibility and extrudability patterns of hydrogel scaffolds. It can be easily observed as the CTS2/HA/CS/DS/CO exhibited higher values of extensibility (cm^2) and better extrudability (g/cm^2); hence, less amount of force was required to extrude the gel from the tube. In fact, extruded amounts of CTS3/HA/CS/DS/CO were obtained only at the highest value of applied weight (500 g). Spreadability and extrudability properties of hydrogels are also important factors to evaluate in topical formulations.

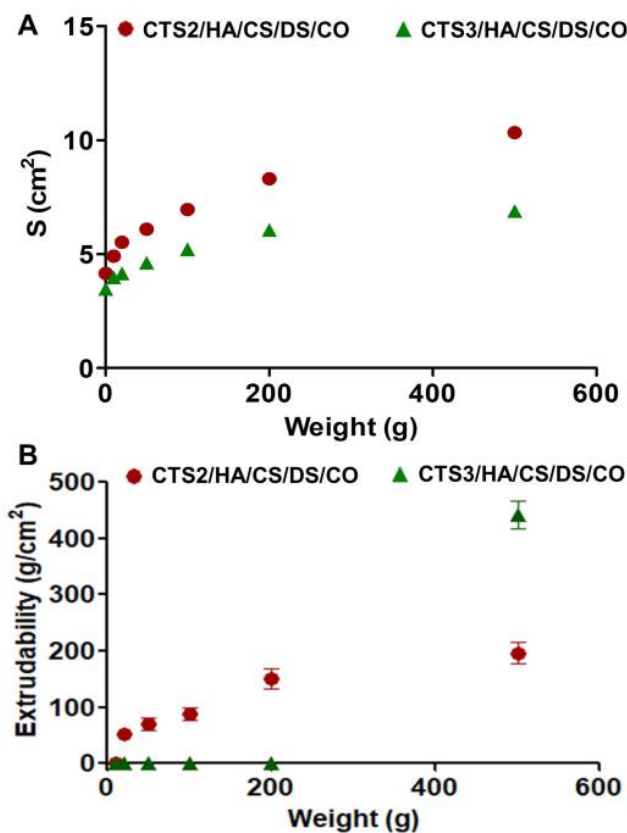


Fig. 3. Spreading area (S , cm^2) as a function of the applied mass (g) at room temperature of hydrogel scaffolds (A); extrudability (g/cm^2) at room temperature of hydrogel scaffolds (B). Values represent mean \pm SD ($n=3$).

The correct administration dose depends highly on the spreading capacity requiring certain application of shear, as well as its ability to extrude from container requires certain force. For this reasons, they should be evaluated during development stages. CTS2/HA/CS/DS/CO substantially possessed better spreadability and extrudability properties than CTS3/HA/CS/DS/CO. Since the compositions of hydrogel scaffolds only differ in the CTS amount, this is the main reason of these differences. Hence, CTS2/HA/CS/DS/CO would provide a more suitable niche for hMSCs in terms of application because lower pressures should be borne by hMSCs.

3.2. Stress-stability tests

After subjecting to heating-cooling cycle, CTS2/HA/CS/DS/CO did not exhibit any sign of instability. Contrary, CTS3/HA/CS/DS/CO showed evident water separation. After centrifugation, both hydrogel scaffolds showed phase separation. However, it was more pronounced in the case of CTS3/HA/CS/DS/CO. Finally, after freeze-thaw cycle,

CTS2/HA/CS/DS/CO remained practically unchanged, while CTS3/HA/CS/DS/CO seemed to be a more compacted appearance. All these stability studies confirmed a trend in favor of CTS2/HA/CS/DS/CO which could enhance its resistance to *in vivo* stresses and cell retention assuring higher levels of the cell therapy efficiency.

3.3. Adhesion and leakage test

The capability of hydrogel scaffolds to adhere was also evaluated. Adhesion of scaffolds to skin is required for suitable wound healing products. A high adhesion is necessary to exert the topical therapeutic action and resists *in vivo* stresses. After 7 h the presence of methylene blue was not detected in the case of CTS3/HA/CS/DS/CO. Contrary the stain in CTS2/HA/CS/DS/CO was clearly detectable up to 12 h suggesting higher adhesion to the agar gel surface and thus higher residence time. Images of the adhesion study are provided as Supplementary Table S1.

On the other hand, an optimal leakage could improve the effectiveness therapy mainly if the scaffold is aimed for injectable administration. Fig. 4 shows the running distances of hydrogel scaffolds at two different pH values after 1, 5 and 10 min after their application. As can clearly be observed CTS2/HA/CS/DS/CO covered significantly higher distance than CTS3/HA/CS/DS/CO at two pH values 7.4 and 5.5. Not so much as to cause administration problems, but sufficient to reach all hardly available locations of the internal wound. Based on the obtained results CTS2/HA/CS/DS/CO was selected as suitable candidate for further studies.

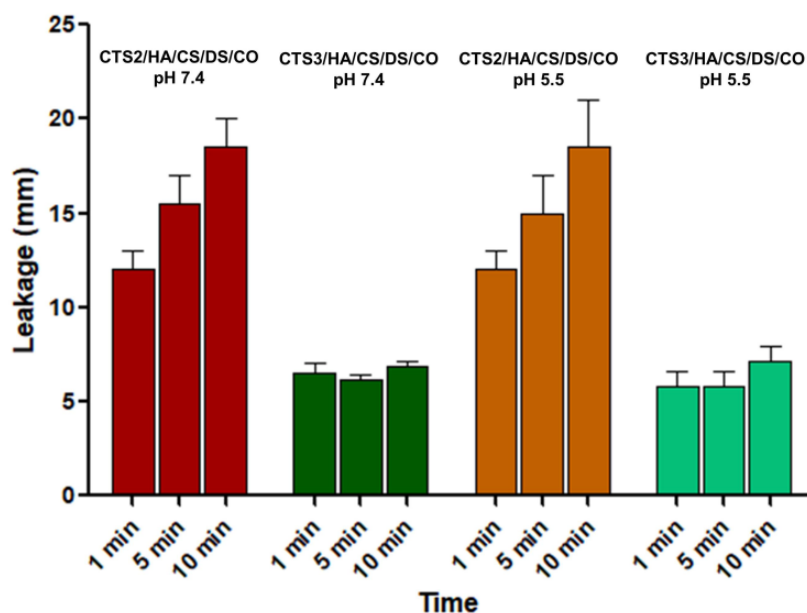


Fig. 4. Leakage (mm) of hydrogel scaffolds after 1, 5 and 10 min, in agar surfaces at different conditions, pH 7.4 and 37 ± 0.5 , and pH 5.5 and 32 ± 0.5 °C. Bars represent mean \pm SD (n=3).

3.4. Rheology

Rheology is a useful technique to characterize the structure strength of semisolid systems and predict their behavior for topical uses indicating how much a sample deforms or how fast it flows by stressing [34]. Steady-state rheological results showed that CTS2/HA/CS/DS/CO exhibited pseudoplastic flow (shear thinning behavior) with a consistent decrease in viscosity with increasing shear rate from 0 to 100 s^{-1} (Fig. 5A). A hysteresis area was also showed, which may be considered as an estimation of the thixotropy. This is a desired property in topical administration because contributes to enhance the retention time [35]. Moreover, this property facilitates the spreading of the hydrogel in a thin and homogeneous layer when applied on the skin [34].

The mathematical model that provided the best overall match of the experimentally observed rheological data based on the highest r^2 and the lowest χ^2 was the Cross model to both ascending and descending stretches. This model provides a general model for pseudoplastic materials showing that flow behavior was not influenced by time or temperature.

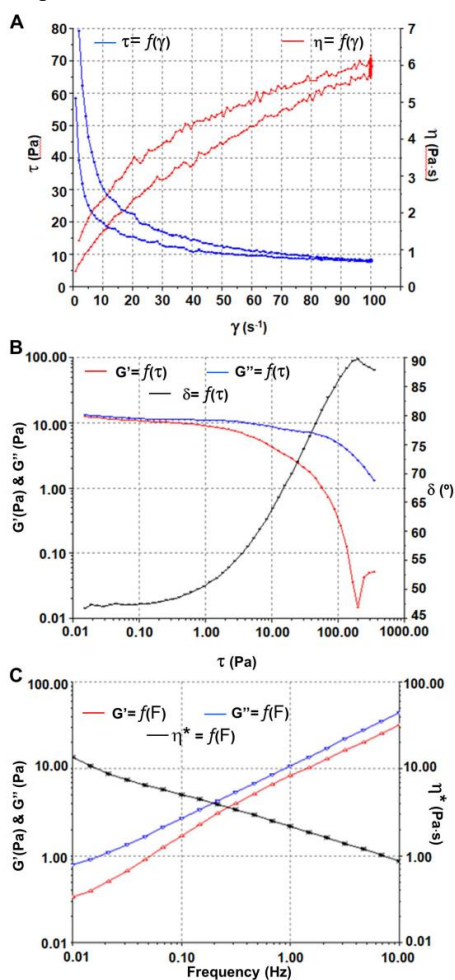


Fig. 5. Viscosity (η) as a function of shear rate (γ) (viscosity curve) and shear stress (τ) as a function of shear rate (flow curve) of CTS2/HA/CS/DS/CO hydrogel (A); Storage modulus (G'), loss modulus (G''), and phase angle (δ) of CTS2/HA/CS/DS/CO hydrogel during sweep stress test at constant frequency of 1 s^{-1} (B); G' , G'' and complex viscosity (η^*) of CTS2/HA/CS/DS/CO as function of frequency (C).

The determination of the disturbance of the microstructure during the test or apparent thixotropy (Pa/s) was evaluated by determination of the area of hysteresis loop. The flow curves indicated certain thixotropy as the rheograms displayed a moderate hysteresis loop with the downward curve below the upward curve (1566 Pa/s). Viscosity values (at 100 s^{-1}) were $673.6 \pm 14.63 \text{ mPa}\cdot\text{s}$.

Oscillatory measurements were performed in order to find the critical stress. During each sweep stress test, the changes in G' , G'' and δ were plotted as a function of shear stress at a frequency of 1 s^{-1} . The end point of the LVR was determined as a critical stress when the G' value was dropped 10% from the linear phase, approximately 2 Pa (Fig. 5B). According to those results, a constant shear stress of 1 Pa (50% of the critical value) was selected to perform the frequency sweep tests. Results for formulations revealed, in this frequency range a prevalence of the viscous over the elastic behavior ($G'' > G'$) (Fig. 5C).

The study of the mechanical properties of the hydrogel scaffolds under dynamic conditions is an important task. It is known that the stiffness of scaffolds affects cell behaviors (adhesion, proliferation, migration etc.) [33]. G' represents the elastic part of the hydrogel, whereas G'' corresponds to the viscous part. From Fig. 5C it can be observed slight predominance of G'' over G' for the entire frequency region, which conferred the property of viscous-like hydrogel scaffold. This was aimed for use in the skin and particularly in wounds, and therefore should not have too much structural strength like other types of scaffolds such as those aimed for articular cartilage tissue engineering or intervertebral disc regeneration, in which high mechanical strength is in demand. Adequate resistance and mechanical properties of the scaffold are intimately related to the receptor tissue needs. This is one important reason why CTS based hydrogels are recommended for skin wound healing and skin regeneration [36].

3.5. Viability and metabolic activity of hMSCs in the scaffolds

Adipose-derived hMSCs are easily isolated in large quantities. These can easily be cultured and amplified which confer a wide potential for their therapeutic uses, among these in wound healing [37]. Once the scaffold was selected and hMSCs isolated, these were embedded in CTS2/HA/CS/DS/CO hydrogel scaffold. In order to evaluate the feasibility of CTS2/HA/CS/DS/CO hydrogel as an adequate scaffold for cell survival, the viability of encapsulated cells was determined. AB tests were performed at 1, 3, 5 and 7 days of cell culture, (Fig. 6A). Cell viability at each time was compared to the viability at day 1 after mixing the hMSCs at a concentration of 1×10^6 cells/mL of CTS2/HA/CS/DS/CO hydrogel. The results showed that the cell viability was reduced at 3 days of culture but was higher than 75% (78.98%). This decrease can be probably attributed to an accommodation phase of the hMSCs with the hydrogel environment [38]. Compared to day 1, cells viability increased from day 3 to day 5 and 100% of living cells were recorded after 7 days of culture. This finding indicates that CTS2/HA/CS/DS/CO provided a suitable niche for cell viability.

The live/dead assay was employed to visualize the presence of living and dead cells after 1 and 7 days in the hydrogel (Fig. 6B). Calcein AM fluoresces green upon the reaction of intracellular esterase and stains live cells; ethidium homodimer-1, which binds to the DNA of dead membrane compromised cells, stains dead cells (red). Few dead cells appeared after 1 and 7 days. However, the number of live cells was obviously much higher confirming cell viability of the hMSCs within the CTS2/HA/CS/DS/CO hydrogel, and no cytotoxic effects were recorded.

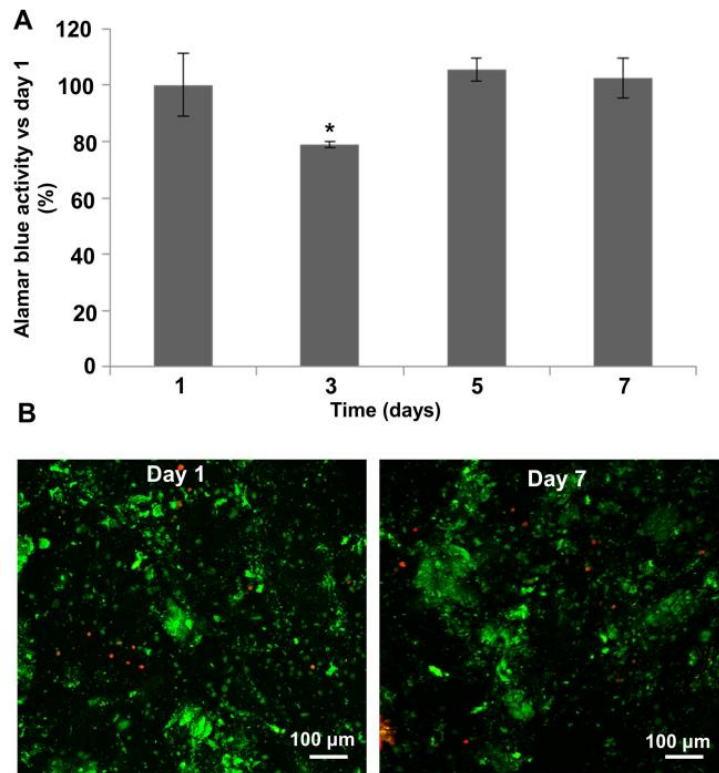


Fig. 6. Cytocompatibility of CTS2/HA/CS/DS/CO hydrogel scaffold with hMSCs (1×10^6 cell/mL). Values are represented as mean \pm SD ($n=3$) normalized per day 1. Statistically significant differences (*; $p < 0.05$) compared with day 1 (A); Representative confocal images of encapsulated hMSCs. Live cells were stained green while dead cells were stained red (B).

3.6. hMSCs distribution in the Hydrogel Scaffold

To determine cell distribution inside the CTS2/HA/CS/DS/CO hydrogel scaffold, hMSCs stained with the fluorescent dye CellTracker[®] red were evaluated on days 1 and 7. Fig. 7A shows the confocal images of hMSCs within the scaffold. hMSCs lost their typical fibroblastic morphology and appeared with a rounded shape and homogeneously distributed throughout the hydrogel. hMSCs were still round in shape after 7 days in culture. Samples were also analyzed under an optical microscope showing a large number of cells embedded within the scaffold (Fig. 7B). hMSCs showed rounded morphology and homogenous distribution throughout the hydrogel. Our results agree with previous studies, suggesting that encapsulated hMSCs into hydrogels can maintain good viability without spreading [39,40].

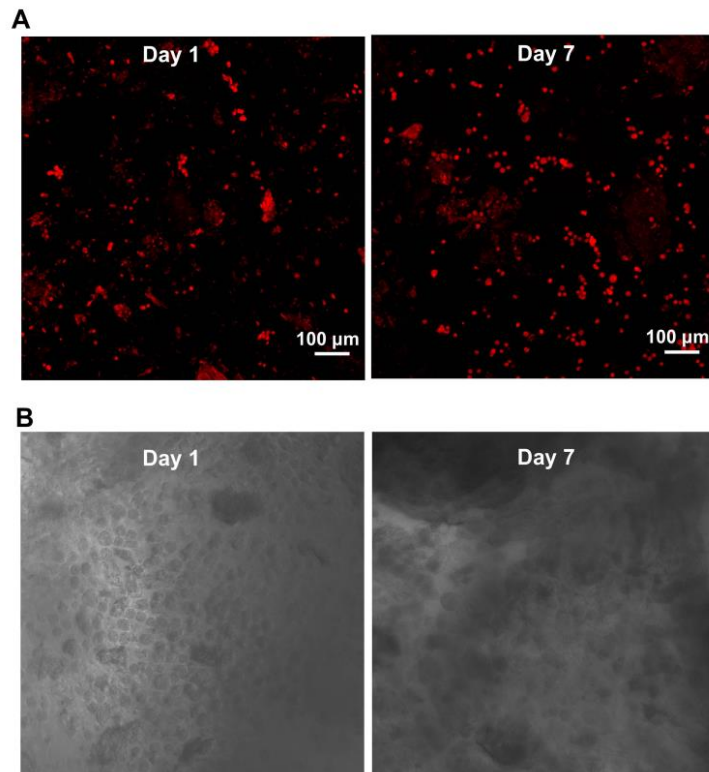


Fig. 7. hMSCs morphology and distribution into the CTS2/HA/CS/DS/CO hydrogel scaffold at day 1 and 7 visible by the fluorescent dye CellTracker[®] 100 μm (A); light microscope images showing encapsulated hMSCs morphology at 1 and 7 days in culture (magnification×10) (B).

3.7. ESEM microscopy of hydrogel scaffolds

Among important factors of tissue engineering the design of a scaffold with suitable properties is an essential requirement. In order to characterize the CTS2/HA/CS/DS/CO hydrogel scaffold microstructural architecture and to visualize the hMSCs embedded into the scaffold an ESEM analysis was carried out on day 1 and 7. This scaffold should possess high porosity and interconnected pores.

Lyophilized CTS2/HA/CS/DS/CO hydrogel resulted in open and parallel sheet structure after lyophilization (Fig. 8A). Figs. 8B and C shows a homogeneous morphology with regular linear pore distribution of those samples which were hydrated previous lyophilization. Average pore diameters in the range of 20-50 μm were measured. This pore interconnectivity allows for cell ingrowth, vascularization, and nutrient diffusion for cell survival, as well as allows the scaffold to support cell encapsulation. However, this method of freeze-drying encounters some difficulties by the formation of a film surface because the matrix may collapse at the scaffold-air interface due to the interfacial tension caused by solvent evaporation [24].

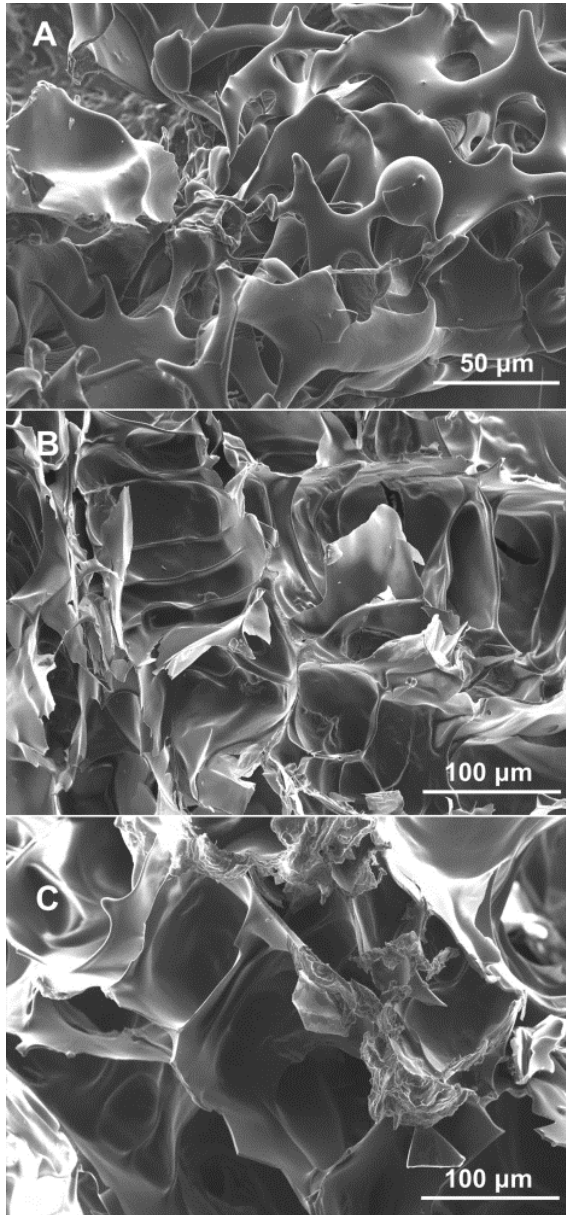


Fig. 8. Representative ESEM images of CTS2/HA/CS/DS/CO hydrogel scaffold after lyophilization before hMSCs encapsulation in high vacuum mode (A), (B) and (C).

For this reason hydrogel was also analyzed by critical point drying technique. In this study, the hydrogel presented a homogeneous and rough morphology (Figs. 9A and B) with regular pore distribution (Fig. 9B).

In order to visualize the hMSCs embedded into the hydrogel a study was carried out on day 1 and 7. Figs. 9C and D show cellular interaction with the hydrogel after 1 and 7 days in culture, respectively.

Finally the environmental mode allowed observing the cells without artifacts derived from the preparation. hMSCs within the hydrogel could be observed as rounded protuberances of approximately 5-10 μm in the scaffold surface (Fig. 9E) and in pores with an average size of $\sim 30 \mu\text{m}$ (Fig. 9F). This structure provides adequate void space for oxygen and nutrient transportation allowing the hydrogel to support cell encapsulation and survival. The average pore size of the hydrogels greatly affects the growth and penetration of cells in the 3D structure of hydrogels and tissue regeneration demonstrating the optimum pore size of 5 μm for neovascularization, 5–15 μm for fibroblast ingrowth and 20–125 μm for regeneration of adult mammalian skin [41]. Moreover, the cells were analyzed in more detail showing cell division (Fig. 9G) which was also indicative of its suitability as niche for encapsulated hMSCs.

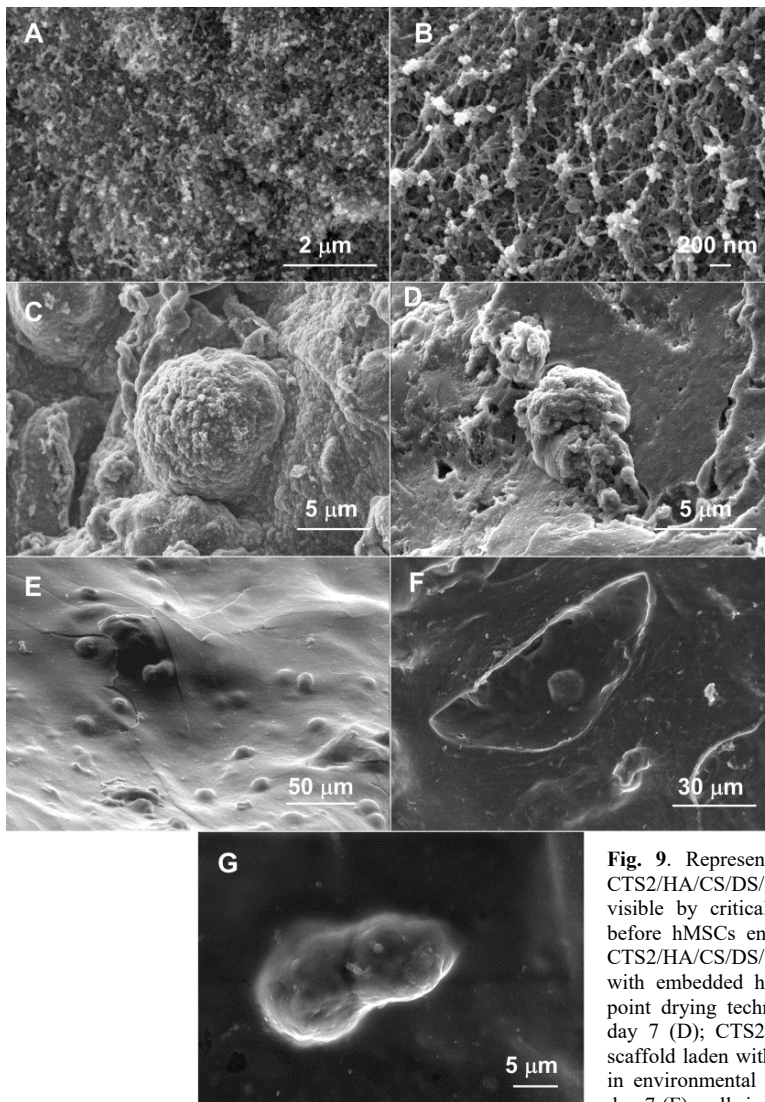


Fig. 9. Representative ESEM images of CTS2/HA/CS/DS/CO hydrogel scaffold visible by critical point drying technique before hMSCs encapsulation (A) and (B); CTS2/HA/CS/DS/CO hydrogel scaffold with embedded hMSCs visible by critical point drying technique on day 1 (C); and day 7 (D); CTS2/HA/CS/DS/CO hydrogel scaffold laden with hMSCs for wet samples in environmental mode on day 1 (E); and day 7 (F); cell in division embedded in the CTS2/HA/CS/DS/CO hydrogel scaffold (G).

4. Conclusions

In this work CTS hydrogels based on quaternary blends of the four different GAGs (HA, CS, DS and CO) were designed and elaborated without use of organic solvent or cytotoxic stabilizers to form a scaffold as support for hMSCs stem cells in tissue engineering and regenerative medicine applications. Physical properties of hydrogels were evaluated as a function of CTS content (1%, 2% and 3%), being the hydrogel with 2% CTS (CTS2/HA/CS/DS/CO) which showed best results. This scaffold showed the desired mechanical properties for its application in skin wounds and a porous microstructure to host cells and allowing an adequate oxygen and nutrient diffusion. After hMSCs encapsulation, this scaffold was able to provide suitable microenvironment in which viability and morphology of hMSCs remained up to 7 days. These findings allow us to hypothesize that CTS2/HA/CS/DS/CO hydrogel scaffold is an optimal platform for hMSCs and thus a great candidate to investigate in further clinical stages.

Funding sources

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (RTC-2016-5451-1) through the European Regional Development Funds (ERDF). Furthermore the work was developed in the context of AdvanceCat with the support of ACCIÓ (Catalonia Trade Investment; Generalitat of Catalunya, Spain) under the ERDF operational program 2014-2020.

References

- [1] J. L. Ryan, Ionizing radiation: the good, the bad, and the ugly, *J. Invest. Dermatol.* 132 (2012) 985-993. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.411>.
- [2] V.K. Singh, P.L. Romaine, T.M. Seed, Medical countermeasures for radiation exposure and related injuries: characterization of medicines, FDA-approval status and inclusion into the strategic national stockpile, *Health Phys.* 108 (2015) 607-630. <https://doi.org/10.1097/HP.0000000000000279>.
- [3] N.D. Evans, R.O. Oreffo, E. Healy, P.J. Turner, Y.H. Man, Epithelial mechanobiology, skin wound healing, and the stem cell niche, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 28 (2013) 397-409. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.04.023>.
- [4] A. Olascoaga, D. Vilar-Compte, A. Poitevin-Chacón, J. Contreras-Ruiz, Wound healing in radiated skin: pathophysiology and treatment options, *Int. Wound. J.* 5 (2008) 246-257. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2008.00436.x>.
- [5] F.N. Bray, B.J. Simmons, A.H. Wolfson, K. Nouri, Acute and chronic cutaneous reactions to ionizing radiation therapy, *Dermatol. Ther. (Heidelb)* 6 (2016) 185-206. <https://doi.org/>
- [6] K.M. Prise, A. Saran, Concise review: stem cell effects in radiation risk, *Stem Cells* 29 (2011), 1315-1321. <https://doi.org/10.1007/s13555-016-0120-y>.
- [7] G. Solanas, S.A. Benitah, Regenerating the skin: a task for the heterogeneous stem cell pool and surrounding niche, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14 (2013) 737-748. <https://doi.org/10.1038/nrm3675>.
- [8] E.B. Eaton, T.R. Varney, Mesenchymal stem cell therapy for acute radiation syndrome: innovative medical approaches in military medicine, *Mil. Med. Res.* 2 (2015) 2. <https://doi.org/10.1186/s40779-014-0027-9>
- [9] E.L. Maranda, L. Rodriguez-Menocal, E.V. Badiavas, Role of mesenchymal stem cells in dermal repair in burns and diabetic

- wounds, *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 12 (2017) 61-70.
<https://doi.org/10.2174/1574888X11666160714115926>.
- [10] Y. Wu, L. Chen, P.G. Scott, E.E. Tredget, Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis, *Stem Cells*, 25 (2007) 2648-2659.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0226>.
- [11] P. Gálvez-Martín, A. Hmadcha, B. Soria, A.C. Calpena-Campmany, B. Clares-Naveros, Study of the stability of packaging and storage conditions of human mesenchymal stem cell for intra-arterial clinical application in patient with critical limb ischemia, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 86 (2014) 459-468.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.11.002>.
- [12] A.M. Hocking, Mesenchymal stem cell therapy for cutaneous wounds, *Adv. Wound Care (New Rochelle)* 1 (2012) 166-171.
<https://doi.org/10.1089/wound.2011.0294>.
- [13] C. Rodrigues, A.M. de Assis, D.J. Moura, G. Halmenschlager, J. Saffi, L.L. Xavier, Mda. C. Fernandes, M.R. Wink, New therapy of skin repair combining adipose-derived mesenchymal stem cells with sodium carboxymethylcellulose scaffold in a pre-clinical rat model, *PLoS One*, 9 (2014) e96241.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096241>.
- [14] A. Arno, A.H. Smith, P.H. Blit, M.A. Shehab, G.G. Gauglitz, M.G. Jeschke, Stem cell therapy: a new treatment for burns?, *Pharmaceuticals (Basel)* 4 (2011) 1355-1380.
<https://doi.org/10.3390/ph4101355>.
- [15] E. Mansilla, R. Spretz, G. Larsen, L. Nuñez, H. Drago, F. Sturla, Outstanding survival and regeneration process by the use of intelligent acellular dermal matrices and mesenchymal stem cells in a burn pig model, *Transplant. Proc.* 42 (2010) 4275-4278.
<https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.09.132>.
- [16] K. Iijima, Y. Tsuji, I. Kuriki, A. akimoto, Y. Nikaido, R. Ninomiya, T. Iyoda, F. Fukai, M. Hashizume, Control of cell adhesion and proliferation utilizing polysaccharide composite film scaffolds, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 160 (2017) 228-237.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.09.025>.
- [17] M. Rodríguez-Vázquez, B. Vega-Ruiz, R. Ramos-Zúñiga, D.A. Saldaña-Koppel, L.F. Quiñones-Olvera, Chitosan and its potential use as a scaffold for tissue engineering in regenerative medicine, *Biomed. Res. Int.* 2015 (2015) 821279.
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/821279>.
- [18] A. Muxika, A. Etxabide, J. Uranga, P. Guerrero, K. de la Caba, Chitosan as a bioactive polymer: processing, properties and applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 105 (2017) 1358-1368.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087>.
- [19] X. Zhao, H. Wu, B. Guo, R. Dong, Y. Qiu, P.X. Ma, Antibacterial anti-oxidant electroactive injectable hydrogel as self-healing wound dressing with hemostasis and adhesiveness for cutaneous wound healing, *Biomaterials*, 122 (2017) 34-47.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.01.011>.
- [20] S.M. Ahsan, M. Thomas, K.K. Reddy, S.G. Sooraparaju, A. Asthana, I. Bhatnagar, Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.* 110 (2018) 97-109.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.140>.
- [21] B. Kaczmarek, A. Sionkowska, A.M. Osyczka, Scaffolds based on chitosan and collagen with glycosaminoglycans cross-linked by tannic acid, *Polym. Test.* 65 (2018) 163-168.
<https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2017.11.026>.

- [22] E. Esposito, M. Drechsler, N. Huang, G. Pavoni, R. Cortesi, D. Santonocito, C. Puglia, Ethosomes and organogels for cutaneous administration of crocin, *Biomed. Microdevices* 18 (2016) 1-12. <https://doi.org/10.1007/s10544-016-0134-3>.
- [23] P. Gálvez, M.J. Martín, A.C. Calpena, J.A. Tamayo, M.A. Ruiz, B. Clares, Enhancing effect of glucose microspheres in the viability of human mesenchymal stem cell suspensions for clinical administration, *Pharm. Res.* 31 (2014) 3515-3528. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1438-8>.
- [24] N. Annabi, J.W. Nichol, X. Zhong, C. Ji, S. Koshy, A. Khademhosseini, F. Dehghani, Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering, *Tissue Eng. B Rev.* 16 (2010) 371-383. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2009.0639>.
- [25] T.F. Anderson, Techniques for the preservation of three dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Tran. N. Y. Acad. Sci.* 13 (1951) 130-133. <https://doi.org/10.1111/j.2164-0947.1951.tb01007.x>.
- [26] Y. Sudhakar, K. Kuotsu, A.K. Bandyopadhyay, Buccal bioadhesive drug delivery—a promising option for orally less efficient drugs, *J. Control. Release* 114 (2006) 15-40. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.012>.
- [27] Y.L. Chen, H.P. Lee, H.Y. Chan, L.Y. Sung, H.C. Chen, Y.C. Hu, Composite chondroitin-6-sulfate/dermatan sulfate/chitosan scaffolds for cartilage tissue engineering, *Biomaterials*, 28 (2007) 2294-22305. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.01.027>.
- [28] H. Lambers, S. Piessens, A. Bloem, H. Pronk, P. Finkel, Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora, *Int. J. Cosmet. Sci.* 28 (2006) 359-370. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2006.00344.x>.
- [29] E.M. Jones, C.A. Cochrane, S.L. Percival, The effect of pH on the extracellular matrix and biofilms, *Adv. Wound Care (New Rochelle)* 4 (2015) 431-439. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0538>.
- [30] G. Jin, K. Li, The electrically conductive scaffold as the skeleton of stem cell niche in regenerative medicine, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 45 (2014) 671-681. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.06.004>.
- [31] J. Gopinathan, M.M. Pillai, K.S. Sahanand, B.K.D. Rai, R. Selvakumar, A. Bhattacharyya, Synergistic effect of electrical conductivity and biomolecules on human meniscal cell attachment, growth, and proliferation in poly-ε-caprolactone nanocomposite scaffolds, *Biomed. Mater.* 12 (2017) 065001. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa7f7b>.
- [32] R. Galante, C.F. Redigueri, I.S. Kikuchi, P.A.S. Vasquez, R. Colaço, A.P. Serro, T.J.A. Pinto, H.A. Santos, About the sterilization of chitosan hydrogel nanoparticles, *PLoS One* 11 (2016) e0168862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168862>.
- [33] Y. Gao, W. Kong, B. Li, Y. Ni, T. Yuan, L. Guo, H. Lin, H. Fan, Y. Fan, X. Zhang, Fabrication and characterization of collagen-based injectable and self-crosslinkable hydrogels for cell encapsulation, *Colloids Surf B: Biointerfaces* 167 (2018) 448-456. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.04.009>.
- [34] M. Mallandrich, F. Fernández-Campos, B. Clares, L. Halbaut, C. Alonso, L. Coderch, M.L. Garduño-Ramírez, B.

- Andrade, A. Del Pozo, M.E. Lane, A.C. Calpena, Developing transdermal applications of ketorolac tromethamine entrapped in stimuli sensitive block copolymer hydrogels, *Pharm. Res.* 34 (2017) 1728-1740. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2181-8>.
- [35] A.C. Silva, M.H. Amaral, E. González-Mira, D. Santos, D. Ferreira, Solid lipid nanoparticles (SLN)-based hydrogels as potential carriers for oral transmucosal delivery of risperidone: preparation and characterization studies, *Colloids Surf B: Biointerfaces* 93 (2012) 241-248. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.01.014>.
- [36] L. Mei, D. Hu, J. Ma, X. Wang, Y. Yang, J. Liu, Preparation, characterization and evaluation of chitosan macroporous for potential application in skin tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.* 5 (2012) 992-997. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.004>.
- [37] A. Sterodimas, J. De Faria, B. Nicaretta, I. Pitanguy, Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications, *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 63 (2010) 1886-1892. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2009.10.028>.
- [38] A. Eddhahak, M. Zidi, Influence of viscoelastic properties of an hyaluronic acid-based hydrogel on viability of mesenchymal stem cells, *Biomed. Mater. Eng.* 26 (2015) 103-114. <https://doi.org/10.3233/BME-151557>.
- [39] C. Ceccaldi, E. Assaad, E. Hui, M. Buccionyte, A. Adoungotchodo, S. Lerouge, Optimization of injectable thermosensitive scaffolds with enhanced mechanical properties for cell therapy, *Macromol Biosci.* 17 (2017) 1600435. <https://doi.org/10.1002/mabi.201600435>.
- [40] A.O. El Sadik, T.A. El Ghamrawy, T.I. Abd El-Galil, The effect of mesenchymal stem cells and chitosan gel on full thickness skin wound healing in albino rats: histological, immunohistochemical and fluorescent study, *PLoS One* 10 (2015) e0137544. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137544>.
- [41] I.V. Yannas, E. Lee, D.P. Orgill, E.M. Skrabut, G.F. Murphy, Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 86 (1989) 933-937. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.3.933>.



DISCUSIÓN

Tratamientos Preventivos

Centrándonos en las irradiaciones recibidas por tratamientos médico-terapéuticos, se han utilizado algunos productos para evitar o en su caso minimizar los efectos de la exposición a radioterapia. La mayoría de estos productos están destinados a proporcionar un cierto grado de hidratación de la piel, y pueden o no, incluir principio activo como antiinflamatorios para evitar reacciones agudas de la piel. En la Tabla 3 (artículo 1) se hace un recorrido esquemático de los tratamientos en la profilaxis de las lesiones cutáneas provocadas por la exposición a radiaciones ionizantes.

En primer término, estos tratamientos preventivos se clasifican por la vía de administración, tópica u oral. Entre los tratamientos tópicos la literatura muestra multitud de estrategias. Se recomienda un correcto aseo de la piel con agua y jabones neutros así como el uso de cremas sin lanolina para aumentar la hidratación de la piel y mantener su flexibilidad. Pero, otra parte de la literatura no aconseja el uso de geles, emulsiones o apósitos hidratantes porque puede causar un efecto “*bolus*” que podría incrementar de forma artificial la dosis de radiación en la superficie cutánea (Zhu y cols., 2016). El uso de antitranspirantes no aporta ninguna ventaja ni desventaja (Watson y cols., 2012). Sin embargo, se recomienda su uso para así mantener unas prácticas higiénicas socialmente aceptadas y evitar posibles efectos psicológicos (Wong y cols., 2013). Realmente, no existe evidencia clínica de que los productos de cuidado de la piel tengan un verdadero efecto preventivo (O'Donovan y cols., 2015).

El láser de intensidad modulada se utiliza para disminuir la dosis de radiación médico-terapéutica en varios estudios. Se ha demostrado una reducción de la severidad de las lesiones producida por radioterapia con esta técnica cuando se comparó con la convencional en el tratamiento del cáncer de pecho. Sin embargo, parece que no ha sido incorporada en la

práctica clínica de los servicios sanitarios (Feight y cols., 2011). Recientemente, ha sido ensayada junto con otras técnicas de planificación (López Alfonso y cols., 2018).

Entre los corticosteroides tópicos para prevenir o mejorar el daño cutáneo, el uso junto con ácido hialurónico parece haber aportado buenos resultados (Bolderston y cols., 2006; Salvo y cols., 2010). Pero tampoco se recomienda su uso por sus efectos secundarios, como pueden ser el debilitamiento y descamación de la piel lo que conlleva un riesgo de infección (Butcher and Williamson 2012).

Entre los antiinflamatorios no esteroídicos ensayados, la trolamina ha sido propuesta por varios autores (Tabla 3, artículo 1), si bien en solo un ensayo se ha podido demostrar una verdadera mejora (Abbas y cols., 2012).

En ese mismo sentido, los estudios realizados con el uso de derivados de plantas como el Aloe vera o la Caléndula han resultado ser no conclusivos (Tabla 3, artículo 1), al igual que el uso tópico de sucralfato. De hecho, en algunas guías internacionales como las de la *Multinational Association of Supportive Care in Cancer* (MASCC) se llega a desaconsejar el uso de Aloe vera (Wong y cols., 2013), por su riesgo a producir enrojecimiento, ardor y escozor. Igualmente algunos autores también desaconsejan el uso de Caléndula (Chan y cols., 2012).

Otros tratamientos profilácticos tópicos son los antimicrobianos como la sulfadiazina, vasoconstrictores como la epinefrina, así como una miscelánea de sustancias. La inmensa mayoría de los estudios publicados concluyen que no existen suficientes evidencias clínicas como para recomendar el uso de estos tratamientos tópicos.

En lo que se refiere a los tratamientos preventivos por vía oral, el sucralfato, es un medicamento indicado para el tratamiento de úlceras duodenales y reflujo gastroesofágico. La amifostina es un fármaco utilizado

como citoprotector en quimioterapia, y la pentoxifilina es un medicamento indicado para la mejora de la circulación periférica. Estos tres medicamentos son los más aceptados por la literatura especializada. Numerosas guías y autores concluyen que no existe suficiente evidencia clínica como para recomendar otros medicamentos orales porque sus efectos secundarios superan su potencial efecto beneficioso.

Tratamientos Curativos

Los diferentes tratamientos farmacológicos que han sido propuestos para las lesiones agudas originadas por la exposición a radiaciones ionizantes se muestran de forma esquemática en la Tabla 4 (artículo1).

Las reacciones agudas se dividen en cuatro grados de severidad. Los tratamientos para el grado 1 son normalmente similares a los tratamientos preventivos vistos en la sección anterior.

Los tratamientos para los grados 2 y 3 contra la descamación húmeda son continuados durante toda la fase aguda. Uno de los más ensayados es el uso de apósitos. Éstos han demostrado importantes resultados. Se han propuesto varios tipos de apósitos, entre ellos los de hidrogel, silicona tipo Mepilex[®], incluso gasas impregnadas con factores de activación de granulocitos y macrófagos (Kouvaris y cols., 2001). Los principales objetivos en atención primaria de las heridas por radiación son mantener la herida limpia para prevenir infecciones, y preservar el tejido sano para evitar mayor daño. De acuerdo a la literatura, los apósitos de silicona parecen ser los más aceptados.

El uso de corticoides no es recomendado a pesar de haber mostrado óptimos resultados en algunos estudios (Tabla 4, artículo 1), pero el riesgo de poder provocar infecciones por patógenos oportunistas desaconseja su uso (Barnes 2006). En tales condiciones, es indicado el uso de

antimicrobianos como la sulfadiazina argéntica, así como, antifúngicos como el clotrimazol (Olascoaga y cols., 2008; Soriano-Ruiz y cols., 2019).

Igualmente, en el caso de tratamientos preventivos como la crema de sucralfato, así como otro tipo de sustancias como pueden ser, la miel, y la enzima superóxido dismutasa, no existe realmente suficiente evidencia clínica como para aconsejar su empleo (Chan, Webster, y cols., 2014).

En el caso de lesiones con severidad de grado 4, como las ulceraciones y necrosis deben ser tratadas quirúrgicamente (Lataillade y cols., 2007), o bien con nuevas terapias avanzadas como las células madre (Bey y cols., 2010), si bien estas se verán en un capítulo específico más adelante.

Hay que resaltar que en un supuesto combinado de quemaduras por radiaciones junto a quemaduras por energía térmica, las lesiones serán más graves surgiendo mayores complicaciones que si fueran de un solo tipo (Palmer y cols., 2011). La asistencia sanitaria en lesiones combinadas conlleva además el aporte de electrolitos, células sanguíneas (transfusiones) y el tratamiento con antimicrobianos de forma preventiva (DiCarlo y cols., 2011).

Tratamientos de las Lesiones a Largo Plazo

Las lesiones a largo plazo o crónicas derivadas de la exposición a radiaciones ionizantes requieren tratamientos muy específicos dependiendo del tipo de lesión. En la Tabla 5 (artículo 1) se describen de forma esquemática dichos tratamientos.

Telangiectasias y Dermatitis

Las telangiectasia son dilataciones de los vasos sanguíneos pequeños bajo la piel o superficies mucosas, también conocidas de forma cotidiana

como “arañas vasculares”. Aunque esta manifestación clínica no es demasiado grave, puede llegar a causar estrés psicológico al paciente. Los casos más severos pueden llegar a causar sangrados.

Los tratamientos con láser de colorante pulsado es el tratamiento de referencia en este tipo de lesiones (Lanigan y Joannides 2003; Nymann y cols., 2009; Rossi y cols., 2014). Este tratamiento es también muy utilizado en medicina estética y cosmética (Spalek 2016).

La aparición de dermatitis crónica es otro efecto crónico frecuente en tratamientos continuados con radiación. La curcumina, una sustancia que posee un potente efecto antioxidante y antiinflamatorio ha sido propuesta para el tratamiento de la dermatitis severa radio-inducida (Okunieff y cols., 2006; Ryan y cols., 2014).

En lo que se refiere a las disfunciones vasculares que aparecen tras la exposición continuada a radiaciones, el uso de pravastatina, un fármaco utilizado para el control de la hipercolesterolemia, ha sido ensayado con el objetivo incrementar los niveles de la enzima óxido nítrico sintetasa con buenos resultados en el tratamiento de dichas lesiones vasculares (Holler y cols., 2009).

Úlceras Crónicas y Heridas

En principio, el tratamiento de las úlceras crónicas y heridas derivadas de la exposición continuada a la radiación ionizante deberían seguir los criterios generales de asistencia sanitaria (Hymes y cols., 2006). La administración de antisépticos tópicos como la sulfodiazina argéntica, povidona, e incluso antibióticos sistémicos es recomendada para evitar infecciones (Drosou y cols., 2003). Las guías de asistencia clínica recomiendan el uso de apósitos que no se adhieran a la herida protegiéndola del medio exterior y que absorban los exudados. Estos

apósitos también contienen agentes antimicrobianos (Hymes y cols., 2006), sustancias activadoras de la producción de macrófagos como el tetraclorodecaóxido (Parikh y cols., 2016), o sustancias con propiedades auto-líticas para facilitar el desbridamiento del tejido necrótico para mejorar la cicatrización (Ramundo y Gray 2008). Además, el uso de laserterapia también ha sido ensayado, concretamente del láser de helio-neón de baja intensidad, con buenos resultados (Schindl y cols., 2000).

Otra estrategia en el tratamiento de las úlceras crónicas es aquella que usa la administración tópica de factores de crecimiento, concretamente el factor de crecimiento plaquetario (Mustoe y cols., 1989; Wollina y cols., 2001; Iervolino y cols., 2013), y el factor de crecimiento fibroblástico (Hom y cols., 2005; Kinoshita y cols., 2012), son los más reportados por la literatura especializada. Sin embargo, el uso de estos factores de crecimiento en heridas producidas por radiación debe ser seriamente evaluado, porque en casos de pacientes irradiados bajo tratamiento oncológico estos factores pueden estimular también el crecimiento del propio tumor (Jacobson y cols., 2017).

No obstante, en aquellos casos de úlceras y/o necrosis muy severas y profundas, solo los tratamientos quirúrgicos pueden ser efectivos, seguidos de una reconstrucción con injertos de tejido o sustitutivos de la piel (Gonyon y Zenn 2003; Fujioka 2014).

Fibrosis Cutáneas

Las fibrosis cutáneas son probablemente los efectos crónicos más graves de la exposición a radiaciones ionizantes. La radiación ionizante en última instancia desencadena la diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos, lo que resulta en una excesiva producción de colágeno en la matriz extracelular y la formación de fibras en el tejido subcutáneo.

Una amplia variedad de tratamientos han sido recomendados para la fibrosis cutánea radioinducida. Parte de estos tratamientos están basados en profundos masajes y ejercicios motores para preservar la movilidad. La laserterapia es también evaluada por varios autores para tratar la fibrosis, a través del láser de colorante pulsado y el láser fraccional de CO₂ (MGH 2013). Igualmente estas técnicas han sido combinadas con injertos de piel (Tran y cols., 2015).

Aunque el uso de la pentoxifilina, un derivado de la metilxantina, sola o en combinación con la vitamina E, ha sido a menudo ensayado específicamente para el tratamiento de la fibrosis cutánea radioinducida (Tabla 7, artículo 1), en otros estudios desaconsejan su uso por sus efectos secundarios a nivel gastrointestinal (Famoso y cols., 2017). Otros antioxidantes como la enzima superóxido dismutasa también han sido ensayados. Esta enzima endógena ha mostrado reducir la fibrosis cutánea radioinducida en el pecho (Delanian y cols., 1994). Otra sustancia antioxidante como la quercetina, un flavonoide natural, también ha sido estudiada como tratamiento para la reducción de la fibrosis cutánea radioinducida en animales (Horton y cols., 2013), pero una mayor evidencia clínica se necesita para poder establecer un verdadero resultado beneficioso.

El efecto beneficioso de la terapia con oxígeno hiperbárico en el tratamiento de la fibrosis cutánea radioinducida no está del todo claro (Pasquier y cols., 2004), a pesar de que en algunos estudios se haya descrito un alivio de dolor (Carl y cols., 2001; Pritchard y cols., 2001; Gothard, Stanton, y cols., 2004; Teas y cols., 2004). Tampoco existe suficiente base clínica para el uso de interferón gamma.

Otra estrategia en el tratamiento de la fibrosis cutánea radioinducida está basada en la administración de factor de crecimiento anti-transformante beta 1(TGF-b1) porque los niveles de numerosas citoquinas, incluida la

TGF- β 1, aparecen muy por encima de lo normal en el tejido irradiado (Muller y Meineke 2007). A sensu contrario, la halofuginona, un derivado sintético halogenado del alcaloide natural febrifugina, se ha usado en el tratamiento de la fibrosis cutánea radioinducida por ser un inhibidor de la TGF- β 1 con efectos positivos en un modelo animal (Xavier y cols., 2004). En otro estudio también se demostró que la halofuginona inhibe la expresión del gen relacionado con la síntesis de colágeno en ratones (Nagler y cols., 2007). Otros fármacos como el fenilbutirato y el ácido valproico, los cuales son inhibidores de un tipo de enzimas llamadas histona deacetilasas, han sido también evaluados por su habilidad para reducir la producción de citoquinas radioinducidas como por ejemplo la TGF- β 1, la TGF- β 2 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Chung y cols., 2004). En este mismo contexto, las sustancias con capacidad de inhibir la proteína Smad3, implicada en la regulación del TNF- β han sido estudiadas (Lee y cols., 2010), si bien mayores evidencias científicas deben ser reportadas para poder considerar un tratamiento a tener en cuenta (Segaert y Van Cutsem 2005). Por último, y como en el caso de las úlceras muy severas, en los casos de fibrosis cutáneas radioinducidas más graves será necesario el tratamiento quirúrgico.

Tratamiento con Células Madre

La eficacia del tratamiento con células madre se ha descrito en varios tipos de lesiones cutáneas, incluida la inducida por radiación. Este enfoque celular para la lesión cutánea inducida por radiación ha sido propuesto como tratamiento de referencia por el Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA 2009). Las MSCs desempeñan un papel importante en los procesos de regeneración de la piel (Gálvez-Martín y cols., 2017). El resultado de su uso en humanos utilizando MSCs alogénicas de médula

ósea similares a fibroblastos en pacientes con quemaduras térmicas cutáneas extensas han resultado esperanzadores (Rasulov y cols., 2005).

También se obtuvieron unos buenos resultados en el estudio realizado por Bey y cols. (2010) en una lesión por radiación localizada en el brazo, la cual se trató con MSCs autólogas de médula ósea, y Kotenko y cols. (2012) en dos pacientes con una lesión producida por radiación local en la región interescapular del primer paciente y en la pierna del segundo.

La terapia celular basada en MSCs derivadas de tejido adiposo es la más prometedora debido a una serie de ventajas como pueden ser la facilidad de aislamiento y abundancia, efectos antiinflamatorios, antiapoptóticos y proangiogénicos (Nauta y cols., 2013), estas MSCs también poseen una mayor capacidad proliferativa y una senescencia más baja que otros tipos de células madre (Izadpanah y cols., 2006). Los estudios que informan el uso de MSCs derivadas de tejido adiposo también han demostrado ser muy efectivos en humanos. En un estudio, la piel irradiada de los pacientes se trató con lipoaspirado autólogo purificado (MSCs de adultos derivados de tejido adiposo) utilizando una cánula de inyección (Rigotti cols., 2007). Así mismo, Kølle y cols. (2013) también demostraron que un injerto autólogo enriquecido con MSCs derivadas de tejido adiposo inyectado por una cánula generaba una mayor cantidad de tejido conectivo recién formado y una menor necrosis que el injerto de control. En principio, la administración local sería la mejor ruta para su uso en la piel. Sin embargo, en lugar de simplemente administrar las MSCs en el sitio de acción, las MSCs a menudo se incluyen en *scaffolds* (andamios) elaborados a partir de biomateriales que deben proporcionar un microentorno que imite las condiciones *in vivo* de la matriz extracelular para mantener la viabilidad celular en aspectos tan importantes como son la morfogénesis, diferenciación, proliferación, adhesión y migración de las células (Dvir y cols. 2011).

Nanoemulsión de Clotrimazol

El mayor inconveniente en la liberación tópica de fármacos es la permeación a través de la piel o mucosa, que suponen una barrera para alcanzar una concentración efectiva en el sitio de acción (Parra y cols., 2016). Además, la baja solubilidad del clotrimazol reduce su permeación a través de las membranas biológicas. Las nanoemulsiones mejoran la solubilidad, la absorción y la difusión de fármacos. El éxito de una terapia a nivel tópico depende de las características fisicoquímicas del fármaco, la permeabilidad a través de la piel, la composición química, así como de las propias características del vehículo (Marwah y cols., 2016). Por tanto las nanoemulsiones pueden constituir una estrategia prometedora para la liberación de fármacos, especialmente en dermatología.

Todos los componentes de la nanoemulsión son atóxicos y se seleccionaron en función de su capacidad de solubilizar clotrimazol y su biocompatibilidad con la piel o las mucosas. El Labrafac[®] fue elegido como fase oleosa, el propilenglicol como fase hidrofílica y la mezcla labrasol[®]:capryol[®] 90 en una proporción fija (4:1) como surfactante y co-surfactante. Concretamente, labrafac[®] y labrasol[®] poseen una baja irritabilidad cuando se utilizan en sistemas tópicos que cargan otros fármacos antifúngicos (Fernández Campos y cols., 2012).

Los diagramas de fase se construyeron en ausencia de clotrimazol para identificar la formulación con las mejores propiedades (Figura 1B, artículo 2) en un intento de optimización de la formulación. Después de la elaboración, se midió el tamaño de gota y se procedió a su observación morfométrica para confirmar la efectiva formación de la nanoemulsión.

Se obtuvieron gotas de tamaño nanométrico que fueron confirmadas por microscopía de transmisión electrónica, la cual confirmó los resultados

previamente obtenidos por la técnica de difracción dinámica de la luz (Tabla 1 y Figura 2, artículo 2).

El clotrimazol fue incluido en la nanoemulsión en dos concentraciones, 1% y 2% destinadas a la piel y las mucosas, respectivamente, de manera similar a las formulaciones tópicas de clotrimazol disponibles comercialmente en España.

Las nanoemulsiones fueron del tipo O/W. Este tipo de nanoemulsión es más apropiada para la inclusión de fármacos lipofílicos, mientras que los sistemas W/O parecen ser una mejor opción para los fármacos hidrofílicos (Azeem y Rizwan 2009).

La inclusión del fármaco en la nanoemulsión implicó el aumento del tamaño de la gota. Esto indicaba que la incorporación de moléculas de fármaco interactuaba con la estructura del sistema. Este es un fenómeno generalmente observado en varios principios activos, particularmente cuando su molécula posee propiedades anfifílicas y/o mesogénicas (Alvarado y cols., 2018).

Los valores de potencial Z (ZP) de las nanoemulsiones fueron negativos y no revelaron diferencias entre la nanoemulsión sin fármaco y la cargada con fármaco, lo que evidencia una eficiente inclusión del clotrimazol dentro de la fase oleosa. En este contexto, se ha demostrado que el pH puede determinar las propiedades electrocinéticas de los sistemas coloidales (Pretel y cols., 2017). Como se muestra en la Figura 3 (artículo 2), las propiedades electrocinéticas de las nanoemulsiones mostraron ser dependientes de las variaciones del pH. A medida que los valores de pH variaron desde 4 hasta 8, el ZP aumentó (en valores absolutos). Por tanto, las variaciones de pH no afectarán la estabilidad de la formulación porque valores más altos de ZP contribuyen a un mayor grado de repulsión entre las gotitas con carga similar. Estos valores de ZP cada vez más negativos

pueden ser ocasionados por el aumento de la concentración de iones OH^- en la solución, lo que tiende a favorecer una ganancia en H^+ .

El pH también es un factor importante a tener en cuenta para evitar la irritación de la piel o la infección bacteriana (Brugués y cols., 2015), el pH de las nanoemulsiones fue de aproximadamente 5.7, es decir, un valor biocompatible para su aplicación tópica (Sierra y cols., 2013).

El estudio de las propiedades reológicas es otro aspecto a tener en cuenta en las formulaciones destinadas a la administración tópica. Las propiedades reológicas pueden modular las propiedades biofarmacéuticas, como la liberación y su aplicación en las áreas afectadas (Sosa y cols., 2017). Las nanoemulsiones mostraron un comportamiento newtoniano con bajos valores de viscosidad. Este comportamiento newtoniano facilita su aplicación en modo de “spray” o sistemas “roll-on”. En el tratamiento de las infecciones por hongos, esta propiedad es de crucial importancia porque en casos de infecciones que afectan áreas extensas de la piel, se puede aplicar una capa en toda la superficie sin frotar, evitando la propagación a otras áreas (Martín-Villena y cols., 2013). Sin embargo, las referencias comerciales mostraron un comportamiento pseudoplástico, no newtoniano, con valores de viscosidad mucho más altos (Figura S1, artículo 2). Estas propiedades reológicas están estrechamente relacionadas con la extensibilidad de las formulaciones. Como era de esperar, los valores de extensibilidad de las nanoemulsiones fueron más altos que el de las referencias comerciales debido a sus menores viscosidades, lo que facilita su aplicación, especialmente en zonas anatómicas que son difíciles de aplicar, como puede ser la mucosa vaginal. Las formulaciones con baja viscosidad y, por lo tanto, una mayor extensibilidad se pueden diseminar fácilmente dentro de las cavidades bucales y vaginales, facilitando el contacto con el epitelio (Brugués y cols., 2015).

Los resultados obtenidos demostraron que las nanoemulsiones eran sistemas estables. Los estudios de estabilidad física no detectaron signos de desestabilización del sistema (cremado, sedimentación, floculación o coalescencia). Las variaciones en la señal de transmisión que excedan el 10% son indicativas de inestabilidad. Sin embargo, como se muestra en la Figura 4 (artículo 2), las señales transmisión en ambos casos se mantuvieron constantes a lo largo del estudio, lo que confirma la estabilidad del sistema. En este contexto y a pesar del bajo valor de ZP, las nanoemulsiones mostraron una buena estabilidad, permaneciendo casi sin cambios durante los 6 meses de almacenamiento. Este fenómeno podría explicarse por la estabilización estérica de las gotitas por la presencia del labrasol[®], un agente tensioactivo no iónico dispersable en agua compuesto principalmente por polietilenglicol (PEG) y diésteres del ácido caprílico (C8) y cáprico (C10), y una pequeña fracción de mono, di y triglicéridos. Esto implica que las cadenas de PEG en la interfaz O/W evitan que las gotas entren en contacto entre sí. Esto es suficiente para mantener las gotitas separadas por repulsiones estéricas y en esas separaciones inhiben las atractivas (fuerzas de Van der Waals).

La evaluación de los resultados de liberación *in vitro* proporciona información importante que podría usarse como control de calidad para predecir el comportamiento *in vivo* y profundizar en el análisis de los mecanismos involucrados (Alvarado y cols., 2015). El primer proceso que se produce tras la aplicación tópica de un vehículo transportador de fármacos sobre la piel o una superficie mucosa es la liberación del fármaco desde el sistema antes de la penetración a través del tejido biológico. El conocimiento de cómo se lleva a cabo este proceso es necesario para la evaluación de la terapia para enfermedades dermatológicas locales. Por eso, con frecuencia se utiliza un modelo matemático que describa la liberación del fármaco desde el sistema de liberación, aunque si bien es

cierto que, la descripción completa de dicho proceso mediante modelos matemáticos es difícil debido a la variedad de variables físicas que se deben tener en cuenta (Sierra y cols., 2013). Sin embargo, el uso de modelos empíricos proporciona información valiosa mediante el simple ajustado de los datos experimentales a las ecuaciones matemáticas. En este caso concreto, el modelo matemático de primer orden fue el que estadísticamente mejor ajustó los datos experimentales. Esto significa que la liberación de clotrimazol desde la nanoemulsión siguió un patrón dependiente del gradiente de concentración, basado en la primera ley de Fick, donde las cantidades liberadas son directamente proporcionales a las cantidades que quedan en el vehículo.

El estudio de permeación *ex vivo* del fármaco es un modelo relevante para el desarrollo preclínico y la optimización de las formulaciones (Parra y cols., 2016). Los perfiles de permeación a través de piel humana y mucosas de cerdo se analizaron sobre la base de un modelo de difusión en condiciones de dosis infinita. En general, no se observaron diferencias significativas entre los perfiles de permeación de la nanoemulsión de clotrimazol al 1% (CLT-NE1) y la referencia comercial del clotrimazol al 1% (CR1) (Figura 6A, artículo 2), por lo que tampoco se obtuvieron diferencias significativas en los parámetros de permeación ni en las cantidades retenidas por la piel como se muestra en la Tabla 2 (artículo 2). Además, como era de esperar el clotrimazol apenas se absorbió tras la aplicación sobre la membrana de piel humana. En el caso de la permeación a través de las mucosas, y concretamente en el caso de la mucosa bucal y sublingual (Figura 6B, artículo 2), los perfiles mostraron valores de permeación más altos en las referencias comerciales. Los valores del parámetro de partición (P_1) y del parámetro de difusión (P_2) no se pudieron calcular ya que no se podía extrapolar la intersección con el eje X en la gráfica de la Figura 6B (artículo 2). Dado que en el mercado español no hay

disponibles formulaciones comerciales de clotrimazol al 2% destinadas a la aplicación sublingual y bucal, a efectos comparativos se utilizó como referencia una solución de clotrimazol al 2% en transcuto[®]l P:agua, 70:30 (CLT-SOL2). Esta fue la razón principal por la que los valores de permeación (flujo y constante de permeación) fueron más altos que la nanoemulsión de clotrimazol al 2% (CLT-NE2), ya que el transcuto[®]l P, además de poseer excelentes propiedades de solubilización y biocompatibilidad con las mucosas, es un conocido potenciador de la permeación transdérmica (Fernández Campos y cols., 2012). Por el contrario, en el caso del estudio de permeación a través de la mucosa vaginal, en el que sí se utilizó una referencia comercial, los valores de flujo y constante de permeación de la nanoemulsión desarrollada por nosotros fueron significativamente más altos que la referencia comercial. Inversamente, las cantidades retenidas de clotrimazol en las mucosas fueron significativamente mayores para CLT-NE2 que las referencias en todos los casos, incluida la mucosa vaginal (Tabla 2, artículo 2). Este resultado puede ser debido a la propia actividad del vehículo en sí mismo, es decir a la nanoemulsión. Las nanoemulsiones tienen una notable capacidad para potenciar la permeación transdérmica de fármacos poco solubles (Fernández-Campos y cols., 2013). Esta propiedad puede propiciar una acción antimicótica del clotrimazol aún más potente debido a que una mayor cantidad de fármaco puede estar disponible en el sitio de acción.

De acuerdo a los valores teóricos de concentración plasmática que se alcanzarían (C_{ss}), la CLT-NE2 puede considerarse segura y no se produciría efectos secundarios debido a que estos valores están por debajo de los niveles sistémicos publicados en la literatura que el clotrimazol alcanza tras una administración oral (0.835 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Brugnara y cols., 1996; Rifai y cols., 1995).

Con respecto a la eficacia antifúngica, nuestros resultados demostraron que los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) se mejoraron cuando el clotrimazol fue vehiculizado en la nanoemulsión en comparación a las referencias comerciales (Tabla 3, artículo 2). Esta mejora puede deberse también a la menor carga eléctrica de superficie de las gotitas de la nanoemulsión, lo que provoca una mejor interacción con los componentes fosfolípidos de la membrana de los hongos, que está cargada negativamente (Ing y cols., 2012). Igualmente, la nanoemulsión ofrece una mayor área de superficie que las referencias comerciales por lo que la interacción con el agente patógeno será también mayor.

En lo que se refiere a la tolerancia de la nanoemulsión, como así demostraron los resultados obtenidos ninguno de los voluntarios del estudio de tolerancia mostró signos de enrojecimiento, picazón u otra reacción cutánea. Como resultado general, se puede considerar que CLT-NE1 no altera las propiedades biofísicas de la piel y, por lo tanto, es adecuada y segura para su aplicación. El índice de pérdida hídrica transepidérmica (TEWL, del inglés *Transepidermal Water Loss*) como medida de la integridad del tejido se utiliza como indicador de la función biológica. Este valor podría incrementarse por la acción del propilenglicol de la nanoemulsión y podría ser la razón por la que el TEWL aumentó después de 6 h (Figura 7^a, artículo 2). Se ha demostrado que el propilenglicol incrementa la actividad descamativa de la proteasa calicreína 7 y esta acción conlleva el aumento del valor de TEWL (Hirata y cols., 2014). Sin embargo, este incremento representó un porcentaje tan bajo que pasó desapercibido para los voluntarios y la función protectora de la piel no se vio afectada. De manera similar, 2 h justo después de la aplicación de la formulación, el valor de hidratación del estrato córneo (SCH, del inglés *Stratum Corneum Hydration*) fue mayor que el valor de referencia (Figura 7C, artículo 2), debido a la formación de una capa protectora de la

formulación contra la pérdida de agua. Esta es la razón por la que los valores de TEWL se mantuvieron constantes, y después de 2 h comenzaron a aumentar. Aparte de eso, también se registraron pequeñas variaciones en la temperatura de la piel, pero estos cambios podrían explicarse por el ritmo circadiano de la temperatura corporal central (Kruchi 2002).

Emulsión Múltiple de Clotrimazol

La baja solubilidad del clotrimazol complica su permeación a través de membranas biológicas, lo que da lugar a la búsqueda y evaluación de estrategias farmacotecnológicas como el diseño y desarrollo de sistemas de liberación de fármacos que mejoren este aspecto fisicoquímico. En este sentido se elaboró una emulsión múltiple W/O/W conteniendo clotrimazol a diferentes concentraciones mediante un método de doble emulsificación. Este sistema de liberación de fármacos engloba gotas de una fase líquida en otra fase líquida lo que le confiere bastantes aplicaciones en el campo farmacéutico.

Tras la elaboración de la emulsión múltiple W/O/W de clotrimazol, se caracterizó en términos de tamaño y morfología de gota. La observación microscópica de la formulación confirmó la obtención de emulsiones múltiples en forma de gotas esféricas, cuyos tamaños coincidían con las mediciones que proporcionó la técnica de difracción de láser. La inclusión del principio activo en la fase oleosa de la emulsión múltiple provocó el aumento del tamaño, lo que denotaba las interacciones de la molécula de clotrimazol con la estructura del sistema de vehiculización. Este fenómeno es observado generalmente cuando la molécula posee propiedades anfífilicas y/o mesogénicas (Alvarado et al., 2018).

Los valores ligeramente ácidos de pH, que rondaban 6.4, les hace totalmente óptimas para su aplicación cutánea. El valor de pH es un factor a tener en cuenta en formulaciones destinadas a la aplicación tópica para evitar la irritación de piel o mucosas, especialmente cuando están afectadas por infecciones micóticas.

No se observaron diferencias entre los valores de ZP entre las emulsiones múltiples vacías y las cargadas con clotrimazol. Este hecho indica que el clotrimazol se encuentra en la fase oleosa. El ZP es un

parámetro indicativo de estabilidad en sistemas coloidales como las emulsiones (Delfanian y cols., 2018). Los altos valores observados de potencial zeta mayores de 56 mV (en valor absoluto) contribuyen a su estabilidad. Está demostrado que valores de ZP por encima de 30 mV en valor absoluto proporcionan mayor estabilidad en los sistemas coloidales debido a las repulsiones entre las gotas evitando así su agregación (Clares y cols., 2014). Es también bien conocida la influencia de cómo el pH puede afectar las propiedades electrocinéticas de los coloides. En este sentido, las propiedades electrocinéticas de las emulsiones múltiples de clotrimazol mostraron una dependencia con el pH (Ishikawa y cols., 2005). Tal y como se muestra en la Figura 2 (artículo 3), a medida que el pH aumentaba de 4.5 a 8, el valor absoluto de ZP también aumentaba, y por tanto no afectaría a la estabilidad del sistema. La interface O/W₂ se estabilizó mediante el uso de un surfactante anfotérico (cocamidopropil betaína), que puede influir en los valores alcanzados de ZP a medida que el pH se hacía más básico. Sin embargo, también es interesante resaltar que los valores de carga de superficie a valores de pH neutro eran negativos. Es posible que esta negatividad pueda estar también sustentada en la también carga eléctrica negativa de los ácidos grasos presentes en la fase oleosa (Crețu y Șolea 2017).

La esprayabilidad se define como el área ocupada por una cantidad determinada de muestra que debe someterse a una presión estándar entre dos placas de vidrio (Sanz y cols., 2018). Como se esperaba, los valores de esprayabilidad de la emulsión múltiple fueron más altos que las referencias comerciales (Figura S, artículo 3). La eficacia de una terapia tópica depende de la dosis adecuada que se aplique o administre en el sitio de acción. Esto está directamente relacionado con una esprayabilidad óptima, que también es responsable de la facilidad de aplicación en la piel o en mucosas (Brugués y cols., 2012). Esta propiedad es aún más importante para el caso

de zonas anatómicas que son difíciles de aplicar, como la mucosa vaginal. Como demostraron los resultados, las emulsiones múltiples de clotrimazol poseen mejores propiedades de esprayabilidad que las referencias comerciales.

La caracterización reológica es otro aspecto a tener en cuenta en formulaciones destinadas a la administración tópica. Las características reológicas pueden modular las propiedades biofarmacéuticas, como la liberación y su administración tópica (Sosa y cols., 2017). Como se puede observar en la Figura S2 (artículo 3), todas las formulaciones mostraron una disminución de la viscosidad cuando la velocidad de cizalla aumentó de 0 a 100 s^{-1} , lo que fue indicativo de un marcado comportamiento pseudoplástico. Sin embargo, los valores de viscosidad de las referencias comerciales fueron más altos (Tabla S2, artículo 3), como así se presumía ya que son cremas. Las emulsiones múltiples de clotrimazol también mostraron ciclos de histéresis lo que sugería una respuesta tixotrópica. Los valores de tixotropía también se muestran en la Tabla S2 (artículo 3). Esta respuesta tixotrópica es una característica deseable en las formulaciones tópicas, ya que deben facilitar la aplicación y contribuir a aumentar el tiempo de retención local (Martín y cols., 2015). En el caso de emulsiones múltiples, la cizalladura podría producir cambios estructurales irreversibles con la ruptura de las gotitas y, por lo tanto, la disminución de la fracción de volumen y la viscosidad (Suñer-Carbó y cols., 2017). El modelo matemático de Cross fue la ecuación que mejor ajustó los datos experimentales, y de lo que se deriva que el comportamiento del flujo no estuvo influenciado por el tiempo ni por la temperatura. Se supone que el flujo pseudoplástico está relacionado con la formación y ruptura de los enlaces estructurales de los materiales. Aparte de eso, las pruebas de barrido oscilatorio y de barrido de frecuencia se realizaron para evaluar la región viscoelástica lineal, la viscosidad compleja (η^*), el módulo elástico o de almacenamiento (G') y el

módulo de pérdida o módulo viscoso (G'') para evaluar la preponderancia entre el comportamiento viscoso y elástico de las emulsiones múltiples de clotrimazol. Como se muestra en la Figura S3 (artículo 3), nuestros resultados revelaron la preponderancia del comportamiento elástico sobre el viscoso ($G' > G''$) en todas las formulaciones. Esta preponderancia elástica mejora la estabilidad física y la resistencia a las fuerzas externas, lo que favorece la capacidad de extenderse sobre la piel o la superficie de la mucosa (Korhonen y cols., 2000). La emulsión múltiple con clotrimazol al 1% (CLT-ME01) y la emulsión múltiple de clotrimazol al 2% (CLT-ME02) mostraron valores de η^* menores que sus referencias comerciales. Una formulación vaginal de baja viscosidad (tangente del ángulo de desfaseamiento (G'/G''): $\tan(\delta) > 1$) se extiende fácilmente dentro de la cavidad vaginal y mejora el contacto con el epitelio vaginal (Brugués y cols., 2012).

La estabilidad de las formulaciones se evaluó mediante una tecnología basada en el análisis de la dispersión múltiple de la luz. Las variaciones de retro-dispersión mayores de $\pm 10\%$ son indicativas de inestabilidad en la formulación. El gráfico de la señal óptica de las formulaciones representado en la Figura S4 (artículo 3) muestra señales constantes cerca de la línea del 70% durante todo el estudio lo que confirma la estabilidad de los sistemas de emulsión múltiple desarrollados. La caída de la señal de retro-dispersión en la mencionada Figura S4 a los 40 mm de altura probablemente se debió a un llenado inadecuado de la cubeta. La estabilidad también fue confirmada por los resultados del resto de las pruebas de estabilidad, que confirmaron la estabilidad de CLT-ME01 y CLT-ME02 durante al menos 180 días.

Los estudios de liberación *in vitro* proporcionan datos importantes para predecir el comportamiento *in vivo* y profundizar en el análisis de los mecanismos involucrados (Alvarado y cols., 2015). Para estos estudios se

utilizó una membrana de nailon con un área de difusión efectiva de 2.54 cm². Aunque se alcanza niveles asintóticos a tiempos similares aproximadamente, el fármaco se libera de forma más rápida desde las emulsiones múltiples y en mayor cantidad que desde las formulaciones comerciales, como se muestra en la Figura 3 (artículo 3). Esta mayor liberación puede estar ligada a la menor viscosidad de las emulsiones múltiples, lo que proporciona una mayor movilidad para las moléculas de fármaco, por consiguiente, una liberación más rápida de una manera controlada. Se pueden observar patrones de liberación bifásicos. En primer lugar, en los primeros tiempos ("efecto burst" inicial) con una velocidad de liberación rápida, seguido de una fase de liberación de clotrimazol casi constante. Aunque la completa descripción del proceso de liberación por modelos matemáticos es complicada, el uso de estos modelos empíricos proporciona una información valiosa para predecir su comportamiento. En nuestro caso, los datos experimentales se ajustaron a modelos de regresión no lineal, y en función del menor valor del criterio de información de Akaike (AIC), se demostró que la cinética de liberación del fármaco seguía un modelo hiperbólico, lo que implica, que proporciona una liberación prolongada de clotrimazol (Espinoza y cols., 2018).

Los perfiles de permeación se analizaron sobre la base de un modelo de difusión para condiciones de dosis infinitas. Se asumió que, en condiciones de total solubilidad, la concentración del fármaco en el compartimiento del receptor es despreciable en comparación con la del compartimiento del donante. Como se muestra en la Figura 4A (artículo 3), la permeación del fármaco a través de la piel de la formulación CLT-ME01 fue mayor que la referencia comercial. Los resultados mostrados en la Tabla 2 (artículo 3) demostraron valores significativamente mayores a favor de CLT-ME01, así como mayores cantidades de clotrimazol retenidas en la piel, lo que podría implicar un mayor efecto farmacológico, ya que las formulaciones están

dirigidas a la actividad antimicótica local. Sin embargo, aunque las cantidades retenidas con la formulación CLT-ME01 fueron altas, teóricamente no se alcanzaría concentraciones plasmáticas suficientes como para causar efectos secundarios, de acuerdo con el cálculo de la C_{ss} (Tabla 2 artículo 3).

En el caso de la permeación a través de mucosas, y concretamente en la mucosa bucal y sublingual (Figura 4B, artículo 3), nuestros resultados mostraron perfiles de permeación más altos para las referencias. Como se mencionó anteriormente, en el caso de las nanoemulsiones, los parámetros P_1 y P_2 tampoco se pudieron calcular en el caso de la solución de referencia de clotrimazol al 2% para uso sublingual y bucal debido a la imposibilidad de extrapolación en la gráfica para calcular el valor de la intersección con el eje X (Figura 4B, artículo 3). Al igual que en el caso de las nanoemulsiones de clotrimazol, para este experimento, como no existen en España referencias comerciales de clotrimazol al 2% para aplicación sublingual y bucal, se utilizaron soluciones de clotrimazol al 2% en transcutol® P:agua (70:30) (CLT-SOL02). Esta fue la razón principal, al igual que en el caso de las nanoemulsiones, por la que los valores de permeación fueron más altos que CLT-ME02. Por el contrario, en el caso del estudio de permeación a través de la membrana de mucosa vaginal, en el que efectivamente se utilizó una referencia comercial, no se observaron diferencias significativas en los parámetros de permeación entre CLT-ME02 y CLT-CR02 (Tabla 2, artículo 3). A la inversa, las cantidades retenidas de CTL en mucosas fueron significativamente mayores para CLT-ME02 que las referencias en todos los casos, incluida la mucosa vaginal. Estos resultados confirmaron los resultados obtenidos con las nanoemulsiones y dicho efecto se atribuye al propio vehículo. Las emulsiones múltiples de W/O/W tienen una notable capacidad para mejorar la permeabilidad (Han y cols., 2018) y pueden influir en la distribución del fármaco en la piel tras su aplicación tópica (Schmidts y

cols., 2012). Estas cantidades retenidas reforzarían la acción antimicótica en la biofase. Al igual que en el caso de la piel, según los valores de C_{ss} , pueden considerarse seguros y no alcanzarían concentraciones plasmáticas teóricas suficientes como causar efectos secundarios.

Valores bajos de CMI indican una mayor actividad anti-fúngica. Los resultados mostrados en la Tabla 3 (artículo 3) demostraron que la emulsiones múltiples de clotrimazol inhiben las cepas del género *Candida* a concentraciones más bajas que la solución del fármaco e incluso más bajas que las referencias comerciales de clotrimazol para las cepas *C. glabrata* y *C. parapsilopsis*.

Hidrogel con Vitaminas Antioxidantes

La selección de los componentes del hidrogel destinado al tratamiento de las quemaduras de la piel se basó en su biocompatibilidad y propiedades farmacológicas intrínsecas para facilitar la cicatrización de la herida, como en el caso de quitosan y el ácido hialurónico (Dickinson y cols., 2016). Por otro lado, el hidrogel debe ser capaz de solubilizar el principio activo, en este caso moléculas lipofílicas como las vitaminas A, D y E. Es bien conocida la capacidad del poloxámero 407 para solubilizar este tipo de moléculas mediante la formación de micelas.

Sobre la base de la formulación que mostró mejores propiedades de gelificación, el vehículo de hidrogel marcado como PCH3 se seleccionó para la inclusión de agentes antioxidantes activos (Tabla 1, artículo 4), el cual estaba compuesto de un 18% de poloxámero 407, 0.5% de quitosan y un 0.2% de ácido hialurónico.

El valor de pH de las formulaciones tópicas debe evaluarse dadas sus numerosas y significativas implicaciones. El pH del hidrogel V-PCH3 fue de 4.6 ± 0.1 , un valor óptimo teniendo en cuenta que el pH de una piel sana es de ~ 4.7 (Lamber y cols., 2006). Este ambiente ácido representa una barrera para la expansión bacteriana y facilita el crecimiento de los fibroblastos (Jones y cols., 2015). Además, se ha demostrado que el pH determina las propiedades electrocinéticas de los coloides (Pretel y cols., 2017). Como se muestra en la Figura 1 (artículo 4), las propiedades electrocinéticas del hidrogel de PCH3 mostraron una dependencia mucho más marcada que el V-PCH3 en función del pH. Este efecto podría deberse a la acción de las vitaminas sobre el ZP del hidrogel cargado. En el caso de PCH3 a pH ácido, la concentración de H^+ es alta, y los grupos amino del quitosan están cargados positivamente (NH_3^+). Cuando el pH aumenta, la concentración de H^+ es baja y los grupos amino son neutros. En el caso de V-PCH3, los

grupos amino de CTS podrían no estar disponibles debido a alguna interacción con las vitaminas.

Las propiedades de hinchamiento del vehículo en la cicatrización de heridas podrían ayudar a absorber los exudados y proporcionar resistencia mecánica al sistema de administración en el lugar de acción (Gao y cols., 2018). Nuestros resultados mostraron unas altas tasas de hinchamiento siendo el hidrogel V-PCH3 (cargado con las vitaminas) la mejor formulación en este sentido a pH=5.5. Este hallazgo estaba en concordancia con los resultados de porosidad a los dos valores de pH, según los cuales, el V-PCH3 poseía valores de porosidad más altos. En el estudio, se evaluó el comportamiento de hinchamiento a dos valores de pH en un intento de imitar la superficie de la piel y el entorno más interno de la herida. El ángulo de contacto se utilizó como medida de humectabilidad, que reveló un valor inicial de 37.42 °. Este valor era inferior a 90 °, lo que indicaba una alta humectabilidad y, por lo tanto, su capacidad de mantener ambientes húmedos.

En la Figura 3B (artículo 4) se muestran los patrones de extensibilidad del hidrogel blanco y el cargado con las vitaminas. Se pueden observar unas óptimas propiedades de extensibilidad, por lo tanto, se requeriría menor fuerza para extraer el gel del recipiente contenedor y así una mejor dosificación en la administración. Esta propiedad también implica la capacidad de expansión del hidrogel en la superficie, lo cual requiere cierta aplicación de fuerza para su extensión.

Un sistema de administración tópica también debe poseer unas propiedades biomecánicas adecuadas para soportar las diversas fuerzas que se generan en condiciones *in vivo*, así como poder adherirse adecuadamente a la superficie de la herida. De acuerdo con nuestros resultados, V-PCH3 podría permanecer adherido durante aproximadamente 3 h y así ejercer su acción farmacológica. La incorporación del quitosan a

formulaciones basadas en poloxámeros es una estrategia para mejorar la adhesividad y el tiempo de residencia que ha sido utilizada en otros estudios (Ur-Rehman y cols., 2007).

Los resultados del test de derramamiento mostraron que V-PCH3 cubrió una distancia significativamente más corta en ambas condiciones de pH, 7.4 y 5.5. No en una extensión desmesurada como para causar problemas de administración, pero sí en la suficiente medida como para llegar a todos los lugares de la herida interna que son difíciles de alcanzar.

La reología es una técnica útil para caracterizar la resistencia de la estructura de los sistemas semisólidos y predecir su comportamiento para usos tópicos que indican cuánto se deforma una muestra o sus propiedades de flujo. Los módulos elástico G' y viscoso G'' son importantes parámetros reológicos para formulaciones basadas en poloxámeros. Como se muestra en la Figura 5 (artículo 4), las formulaciones mostraron sensibilidad térmica. Estos cambios en el comportamiento de la viscoelasticidad con la temperatura podrían implicar variaciones beneficiosas en la textura y adhesividad del producto que pueden facilitar la aplicación tópica y la eficacia farmacológica. Estas temperaturas podrían considerarse como el punto de gelificación de cada muestra. Tras las mismas, los sistemas se espesaron considerablemente y se volvieron predominantemente elásticos ($G' > G''$) exhibiendo una meseta elástica en las temperaturas de 35 °C en el caso del hidrogel con vitaminas y 28 °C en el hidrogel blanco. Este comportamiento se debe a los cambios de hidrofiliidad de los bloques que componen el P407 en función de la temperatura y la concentración del polímero (Brugués y cols., 2015).

Con respecto a los resultados de eficacia antimicrobiana, el propio vehículo aporta una mejora importante en las propiedades antimicrobianas de la formulación, que aunque no es en sí misma una formulación antibiótica, demostró ser capaz de ejercer una actividad antimicrobiana

similar a la referencia comercial (silvederma[®]) que contenía el antibiótico sulfadiazina argéntica y está indicada específicamente para el tratamiento antibiótico a nivel tópico. Como ya se ha mencionado, se ha demostrado que el quitosán tiene propiedades antimicrobianas, y ejerce tal acción farmacológica por medio de la desestabilización de las membranas microbianas (Rabea y cols., 2003). Por lo tanto, esta acción proporcionaría un efecto sinérgico en la curación de heridas actuando como un desinfectante.

Con relación al estudio de tolerancia *in vivo*, no se observaron signos de enrojecimiento, picazón u otras reacciones cutáneas en la piel de ninguno de los individuos. Por tanto se puede considerar que el hidrogel V-PCH3 no alteró las propiedades biofísicas de la piel y, consecuentemente su aplicación en piel es segura. El TEWL como medida de integridad de un tejido, fue mayor solo durante los primeros momentos justo después de su aplicación volviendo a los valores previos a la aplicación de la formulación en la siguiente medición. Sin embargo, el valor de SCH fue significativamente mayor para la formulación referencia silvederma[®] probablemente debido a la acción hidratante de alguno de sus ingredientes. De forma contraria, el hidrogel blanco (sin vitaminas) dio como resultado un valor de SCH significativamente menor durante todas las mediciones del estudio.

La aplicación del hidrogel con vitamina (V-PCH3) en un modelo de piel quemada en ratones demostró tener un posible efecto curativo. Los estudios histológicos mostraron acción regenerativa sobre las quemaduras similar a la de la referencia comercial silvederma[®], posiblemente a través de la actividad antioxidante y cicatrizante de las vitaminas A, D y E como ya se ha reportado en otros estudios, aunque los mecanismos de acción aún no están del todo claros (Leivo y cols., 2000; Abdelmalek y Spencer 2006; Thiele y Ekanayake-Mudiyanselage 2007).

Terapias Avanzadas

En los últimos años se ha generado una gran expectación en la comunidad científica sobre el desarrollo de nuevas terapias para las heridas en la piel. El potencial éxito de este tipo de terapias depende de la biocompatibilidad del material que alberga las células madre y su capacidad para mantener su funcionalidad (Sudhakar y cols., 2006).

Los “*scaffolds*” o andamios basados en quitosan han demostrado propiedades adecuadas como biomateriales de la ingeniería de tejidos. Pero el uso de quitosan no es suficiente para la regeneración de la piel diseñada debido a la falta de componentes bioactivos como los glucosaminoglicanos (GAG) (Chen y cols., 2007). Los GAG son compuestos biológicos de vital importancia en las diferentes etapas de regeneración y maduración del tejido cutáneo, siendo componentes importantes de la ECM.

Se desarrolló un hidrogel que contiene 4 GAG diferentes: ácido hialurónico (HA), condroitín sulfato (CS), dermatán sulfato (DS) y colágeno (CO) como andamiaje para la terapia con células madre mesenquimales de origen humano (hMSC) como terapia avanzada para el tratamiento de heridas en la piel. Como primer paso en el desarrollo del andamio se elaboraron hidrogeles de quitosan a diferentes concentraciones: 1, 2 y 3% (p/v), y registrados como CTS1/HA/CS/DS/CO, CTS2/HA/CS/DS/CO y CTS3/HA/CS/DS/CO. Posteriormente, se evaluaron sus propiedades de gelificación a diferentes temperaturas, 4, 25 y 37 °C (Tabla 1 artículo 5). La mezcla de quitosan al 1% no formó gel a ninguna de las temperaturas por lo que se eligieron las otras dos para posteriores estudios, si bien el hidrogel CTS2/HA/CS/DS/CO fue el que mejores propiedades mostraba *a priori*.

El pH de los soportes fue de 4.7 ± 0.2 y 5.9 ± 0.3 para el hidrogel CTS2/HA/CS/DS/CO y el CTS3/HA/CS/DS/CO, respectivamente. Estos valores de pH fueron óptimos para su aplicación en piel, teniendo en cuenta

que el pH de una piel sana es de alrededor de 4.7 (Lambers y cols., 2006). Además, el mantenimiento de un pH en valores ácidos ayuda a la inhibición del crecimiento bacteriano, disminuye la actividad proteolítica y aumenta el crecimiento de fibroblastos (Jones y cols., 2015).

Los hidrogeles también poseían altos valores de conductividad. Estas propiedades de conductividad también pueden contribuir a inducir la diferenciación específica de las hMSC, mejora la adhesión celular y la comunicación célula-célula, proporcionando un entorno celular óptimo que imita la ECM (Gopinathan y cols., 2017).

Por otro lado, la capacidad de absorber líquidos es un factor importante en el desarrollo de andamios porque puede promover el transporte de nutrientes con el entorno circundante y proporcionar una alta resistencia mecánica (Gao y cols., 2018). En este sentido los valores de hinchamiento de los hidrogeles alcanzaron casi un 400% a pH=5.5 en contraposición de los valores alrededor del 300% a pH=7.4. Esta alta capacidad de hinchamiento podría deberse probablemente a la presencia de grupos hidrófilos, como los grupos amino e hidroxilo. La diferencia entre pH puede deberse a que a un pH bajo, los grupos amino libres están protonados, lo que provoca una mayor repulsión electrostática entre las cadenas que promueven la solvatación del polímero.

Además, la degradación fue menor a pH=7.4 (Figura 2, artículo 5) cuando se comparó con pH=5.5, probablemente debido a una mayor solubilización de la matriz polimérica del andamio, y por lo tanto una mayor pérdida.

Se pudo observar que el hidrogel CTS2/HA/CS/DS/CO exhibió valores más altos de extensibilidad (cm^2) y mejor extrudabilidad (g/cm^2), lo que conlleva que se requiera menor fuerza para sacarlo de su recipiente contenedor. Esta mayor extrudabilidad confiere mejores condiciones a la hora de una correcta dosificación, y esta dosificación depende en gran

medida de la capacidad de extrusión porque requiere la aplicación de cierta fuerza para sacarla del envase contenedor (tubo estéril, jeringa pre-cargada, etc.). Dado que las composiciones de los andamios solo difieren en la cantidad de quitosan, sería ésta, la variable que dio lugar a las diferencias, y el hecho de tener que ejercer una menor presión sobre el hidrogel hará que las hMSCs que contengan sufran menos estrés.

Los ensayos de estabilidad demostraron una tendencia a favor del hidrogel CTS2/HA/CS/DS/CO tras los ciclos de estrés ambiental por lo que, en potenciales condiciones *in vivo* podría asegurar niveles más altos de eficacia de la terapia celular.

La capacidad de adhesión de los hidrogeles fue también estudiada en un modelo de superficie de agar. Se requiere una determinada adhesión de los andamios a la herida para poder ejercer su acción terapéutica y resistir las tensiones que se generan en condiciones *in vivo*. Después de 7 h no se detectó la presencia de azul de metileno en el caso de CTS3/HA/CS/DS/CO. Al contrario, la tinción en el hidrogel CTS2/HA/CS/DS/CO fue claramente detectable hasta pasadas 12 h, lo que demuestra una mayor capacidad de adhesión a la superficie del agar y, por lo tanto, un mayor tiempo de residencia. Por otro lado, una capacidad óptima de goteo podría mejorar la eficacia de la terapia, principalmente si el andamio está dirigido a la administración en inyectables. La Figura 4 (artículo 5) muestra las distancias recorridas de ambos hidrogeles a pH 7.4 y 5.5, después de 1, 5 y 10 minutos. Se pudo observar claramente que el hidrogel CTS2/HA/CS/DS/CO cubrió una distancia significativamente mayor que el hidrogel CTS3/HA/CS/DS/CO en ambos casos, no tanto como para causar problemas de administración, pero sí lo suficiente para llegar a los lugares más recónditos de la herida interna y que son difíciles de alcanzar. Sobre la base de los resultados obtenidos, el hidrogel CTS2/HA/CS/DS/CO fue seleccionado para el resto de estudios.

La reología es una propiedad muy útil para caracterizar la resistencia de la estructura de los sistemas semisólidos y predecir su comportamiento para usos tópicos, lo que indica cuánto se deforma una muestra o lo rápido que puede llegar a fluir (Mallandrich y cols., 2017). Los resultados mostraron que el hidrogel CTS2/HA/CS/DS/CO exhibió unas características de flujo pseudoplásticas con una constante disminución de la viscosidad al aumentar la velocidad de cizallamiento de 0 a 100 s^{-1} (Figura 5^a, artículo 5). También formó un área de histéresis, que puede considerarse como una estimación de la tixotropía, lo que *a priori*, en las condiciones de administración tópica contribuye a mejorar el tiempo de retención (Silva y cols., 2012). Además, esta propiedad facilita la extensión del hidrogel en una capa delgada y homogénea cuando se aplica sobre la piel (Mallandrich y cols., 2017). El modelo matemático que proporcionó el mejor ajustado de los datos observados experimentalmente fue el modelo de Cross tanto en tramos ascendentes como descendentes. Este modelo proporciona un modelo general para materiales pseudoplásticos donde el flujo no es dependiente del tiempo ni la temperatura.

La evaluación de las propiedades mecánicas de los andamios en condiciones dinámicas es una tarea importante. Una excesiva rigidez de los andamios afectaría los comportamientos celulares (adhesión, proliferación, migración, etc.) (Gao y cols., 2018). G' representa la parte elástica del hidrogel, mientras que G'' corresponde a la parte viscosa. En la Figura 5C (artículo 5) se puede observar un ligero predominio de G'' sobre G' para toda la región de frecuencia. Este andamio se diseñó para uso en la piel y particularmente en heridas, y por lo tanto no debe tener demasiada resistencia estructural como otros tipos de andamios, como los destinados a la ingeniería del cartílago articular o la regeneración del disco intervertebral, en los cuales se requiere una alta resistencia mecánica. La resistencia y las propiedades mecánicas del andamio están íntimamente relacionadas con

las necesidades del tejido receptor. Esta es una razón importante por la que los hidrogeles de quitosan se recomiendan en el tratamiento de heridas y la regeneración de la piel (Mei y cols., 2012).

Las hMSC derivadas de tejido adiposo son fácilmente aisladas y en cantidad suficiente. Además, pueden ser fácilmente cultivadas y amplificadas. Estas características les confieren un amplio potencial para uso terapéutico en la curación de heridas (Sterodimas y cols., 2010). Una vez se aislaron las hMSCs, éstas se incorporaron en el andamio CTS2/HA/CS/DS/CO, y se evaluó su viabilidad en el mismo con el reactivo alamarBlue[®]. Los resultados mostraron que la viabilidad celular se redujo a los 3 días de cultivo, pero fue superior al 75% (78.98%). Esta disminución puede atribuirse probablemente a una fase de adaptación de las hMSC con el entorno de hidrogel (Eddhahak y cols., 2015). A partir del día 3 la viabilidad celular se incrementó hasta el 100%, por lo que el hidrogel desarrollado proporcionaba un nicho adecuado para la viabilidad celular.

Igualmente, se realizó un ensayo para visualizar la presencia de células vivas y muertas después de 1 y 7 días en el hidrogel (Figura 6B, artículo 5). La calceína AM presenta una fluorescencia verde ante la reacción de la esterasa intracelular y tiñe las células vivas, y el homodímero 1 de etidio se une al ADN de las células con disrupción de membrana tiñendo a las células muertas (rojo). Como se aprecia en la referida figura, el número de células vivas confirmó la viabilidad celular de las hMSC dentro del hidrogel CTS2/HA/CS/DS/CO.

Para determinar la distribución celular dentro del andamio las hMSCs fueron teñidas con tinte fluorescente CellTracker[®] rojo. La Figura 7A (artículo 5) muestra las imágenes de microscopía confocal de hMSCs dentro del andamio. Las hMSC perdieron su morfología fibroblástica típica y aparecieron con una forma redondeada y distribuidas homogéneamente en todo el hidrogel. Las hMSC seguían siendo de forma redonda después de 7

días en cultivo. Las muestras también se analizaron bajo un microscopio óptico, observándose un gran número de células incrustadas dentro del andamio (Figura 7B, artículo 5). Las hMSC mostraron una morfología redondeada y una distribución homogénea en todo el hidrogel.

El diseño de un andamio con propiedades adecuadas es un requisito esencial en la ingeniería de tejidos. Con el fin de caracterizar la arquitectura microestructural del andamio CTS2/HA/CS/DS/CO y visualizar las hMSCs incrustados en él se realizó un análisis mediante microscopía electrónica de barrido ambiental en los días 1 y 7. El hidrogel liofilizado de CTS2/HA/CS/DS/CO dio como resultado una estructura de lámina abierta y paralela después de la liofilización. Se observó una morfología homogénea con una distribución lineal y regular de poros interconectados, con un diámetro medio de poro de 20-50 μm (Figura 8, artículo 5). Esta interconexión de poros permite el crecimiento celular y la difusión de nutrientes para la supervivencia celular.

La observación microscópica por barrido también se realizó mediante la técnica de secado en punto crítico, por la cual se pudo observar una estructura homogénea y rugosa (Figuras 9A y B, artículo 5) con una distribución regular de poros.

También se pudo observar las hMSC como protuberancias redondeadas de aproximadamente 5-10 μm en la superficie del andamio (Figura 9E, artículo 5) y en los poros con un tamaño promedio de ~ 30 μm (Figura 9F, artículo 5). Esta estructura proporciona un espacio adecuado para el transporte de oxígeno y nutrientes, lo que permite que el hidrogel sea óptimo para la encapsulación y la supervivencia de las células. Además, tras analizar las células con más detalle se pudieron captar imágenes de algunas de ellas en división (Figura 9G, artículo 5), lo que también fue indicativo de su idoneidad como nicho para las hMSC encapsuladas.



CONCLUSIONES

El **principal objetivo** de esta Tesis Doctoral ha sido el estudio de diferentes formas de dosificación tópicas frente a la amenaza NRBQ, especialmente frente a los agentes radiológicos. Los resultados obtenidos han permitido concluir lo siguiente:

Sobre el estado del arte:

1. Actualmente los agentes nucleares/radiológicos se encuentran entre aquellos NRBQ con mayor impacto sobre la salud humana. El origen de esta amenaza puede ser natural, accidental e intencionada; en este último caso, con fines médicos o terroristas. Se han identificado las vías de entrada y descrito las lesiones, tanto agudas como crónicas, consecuencia de la exposición radiológica. Independientemente de la fuente, la piel (junto a las mucosas) es uno de los órganos más afectados, siendo además, uno de los principales focos de contaminación sistémica.

2. Se han revisado las terapias actuales y propuestas futuras. Se ha descrito un amplio arsenal de medicamentos y productos sanitarios para la prevención y el tratamiento de los daños cutáneos derivados de la exposición aguda o crónica, bien de aplicación tópica o sistémica, de diferente actividad farmacológica y, de origen vegetal, sintético o celular.

La correcta elección del tratamiento será decisiva para el beneficio terapéutico de la radioterapia médica, así como reducir la potencial mortalidad ante cualquier ataque o accidente radiológico.

3. Desafortunadamente, la complejidad de las lesiones y variaciones intra-inter individuales impiden un tratamiento estándar, no habiendo agentes particularmente aprobados para lesiones en la piel causadas por la radiación ionizante.

Se han desarrollado cuatro formas de dosificación potencialmente útiles para el tratamiento del daño radio-inducido. Dos de ellas, son sistemas coloidales portadores de clotrimazol, en concreto, una nanoemulsión y una emulsión múltiple. Además se ha elaborado un *scaffold*-hidrogel como plataforma de MSCs y un hidrogel termosensible como sistema de liberación de tres vitaminas.

Sobre las Nanoemulsiones y Emulsiones Múltiples de Clotrimazol

1. Composición

La elección de los componentes de la nanoemulsión se realizó en base a su capacidad para solubilizar el clotrimazol y compatibilidad con piel o mucosas. Tras la elaboración de varios diagramas pseudoternarios, con un total de 54 formulaciones y normalización de la técnica de emulsificación por ultrasonidos, la composición más idónea para la preparación del vehículo fue: 10% de triglicéridos de cadena media (Labrafac[®] lipófilo) (como fase oleosa), 60% glicéridos del caprilo caproil macrogol-8: monocaprilato de propilenglicol (Labrasol[®]:Capryol[®] 90) en proporción 4:1 (como mezcla surfactante/co-surfactante) y 30% de propilenglicol (como fase acuosa).

Para la preparación de la emulsión múltiple se siguió el método de emulsificación en dos pasos. Los componentes de la formulación seleccionada fueron: 11% de triglicéridos de cadena media (Labrafac[®] lipófilo 1349) y 2% de sorbitán estearato (Span[®] 60) (como fase oleosa), 1.5 % de cetil dimeticona copoliol (Abil[®] EM 90) (como emulgente primario), 0.7% de cocamidopropilbetaína (Tego[®] Betain F (como emulgente secundario) y 0.2% de un polímero de ácido acrílico (Tego[®] Carbomer 341) (como agente viscosizante de la fase acuosa).

Se han elaborado dos nanoemulsiones y otras dos emulsiones múltiples de clotrimazol: con referencia 01, para su aplicación cutánea y con referencia 02, para su aplicación sobre la mucosa bucal, sublingual y vaginal. El % de clotrimazol incorporado fue del 1% y 2%, dependiendo de su aplicación sobre piel o mucosas, respectivamente; de forma similar a las especialidades comercializadas.

Como fórmulas de referencia se utilizaron dos medicamentos comerciales: Canesten® crema, para los ensayos en piel, y Gine-canesten® crema, para los ensayos en vagina. Dado que no existe una referencia comercial de aplicación sobre mucosa oral, se elaboró una solución de clotrimazol al 2%.

2. Caracterización Físico-Química

Los sistemas resultantes presentaron un tamaño de gota inferior a 200 nm e índice de polidispersión inferior a 0.4 para la nanoemulsión. En el caso de la emulsión múltiple se obtuvieron tamaños inferiores a 50 μm y un bajo valor de factor span.

Estos resultados fueron avalados mediante Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) para la nanoemulsión, y Microscopía óptica para la emulsión múltiple. Con ambas técnicas se aprecia una morfología regular, esférica y bien definida, así como, una distribución homogénea. Además, junto a los valores de conductividad, confirman la idoneidad de las técnicas seleccionadas para la obtención de una nanoemulsión O/W y una emulsión múltiple W/O/W, lo cual es preferible para la vehiculización de fármacos lipofílicos como el clotrimazol.

Todas las formulaciones presentaron un valor de pH biocompatible.

El análisis comparativo de las propiedades eléctricas superficiales en ambos sistemas, entre la formulación blanco y cargada, fue indicativo de la

eficacia en la incorporación del principio activo en la fase interna. Además las propiedades electrocinéticas en función del pH y fuerza iónica del medio mostraron una dependencia, lo que constituye una herramienta eficaz en la predicción de la estabilidad, posibilitando un adecuado control de las formulaciones mediante el manejo de estos parámetros.

Las nanoemulsiones exhibieron un comportamiento Newtoniano. En cambio las emulsiones múltiples presentaron un flujo no Newtoniano de tipo pseudoplástico y respuesta tixotrópica. Estas últimas revelan una prevalencia del comportamiento elástico sobre el viscoso ($G' > G''$).

Tanto las nanoemulsiones como las emulsiones múltiples resultaron ser más fluidas que las referencias comerciales con mayores valores de esprayabilidad. Por lo que cabe esperar una fácil aplicación y mayor accesibilidad a cavidades de mucosas.

Tanto las nanoemulsiones como las emulsiones múltiples resultaron ser estables durante al menos 6 meses. En el primer caso, probablemente, debido a fenómenos estéricos y en el segundo, a fenómenos eléctricos.

3. Caracterización Biofarmacéutica

La metódica analítica para la cuantificación del clotrimazol resultó ser lineal, exacta y precisa.

La liberación del fármaco desde las nanoemulsiones siguió una cinética de primer orden. Las emulsiones múltiples y las referencias comerciales ajustaron a una hipérbola. Los valores asintóticos se alcanzaron a las 60 y 30 horas, respectivamente.

Los estudios de permeación *ex vivo* en piel y mucosas revelan cantidades de clotrimazol permeadas ínfimas y en ningún caso se espera que alcancen concentraciones sistémicas significativas.

Las cantidades retenidas de clotrimazol en mucosas fueron significativamente más altas en las nanoemulsiones que en las referencias.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los productos cutáneos.

Para las emulsiones múltiples, las cutáneas muestran mayores cantidades permeadas y retenidas que su análogo en el mercado. En el caso de la permeación a través de mucosas bucal y sublingual existe una mayor permeación de las referencias pero menor retención. Finalmente, sobre mucosa vaginal se observaron cantidades permeadas similares aunque mayor retención de la emulsiones múltiples respecto a la referencia.

No se observaron signos de intolerancia cutánea tras la aplicación de nanoemulsiones o emulsiones múltiples, constituyendo formas de dosificación adecuadas y seguras para su aplicación en piel.

4. Capacidad Antimicrobiana

De los estudios de eficacia antifúngica es importante destacar valores de MIC mejorados cuando el clotrimazol se vehiculiza en las nanoemulsiones y emulsiones múltiples, presentando mayor eficacia que las fórmulas comerciales.

Sobre el Hidrogel Termosensible Portador de Antioxidantes

1. Composición

La formulación compuesta por poloxamer 407 18%, chitosan 0.5%, hialuronato sódico 0.2%, vitamina A o retinol palmitato 6000 UI/g, vitamina D o colecalciferol 400 UI/g y vitamina E o α -tocoferol acetato 2%, fue seleccionada como la más idónea en base a su temperatura (32 °C) y tiempo (1.30 min) de gelificación. El método seguido para su elaboración fue el directo o simple.

2. Caracterización Físico-Química

El hidrogel presentó un pH de 4.6 ± 0.1 , óptimo y adecuado valor para la curación de heridas.

El estudio sobre las propiedades electrocinéticas reveló un ZP positivo en todos los casos. Los ensayos en función del pH y fuerza iónica del medio mostraron una dependencia entre estos parámetros y los valores del ZP.

El hidrogel presentó una porosidad alrededor del 40%, que varía en función del pH. Dicha porosidad fue confirmada mediante microscopía electrónica de barrido mostrando un tamaño de poro de 500 nm, disposición relativamente homogénea y tamaños micelares de ~ 60 nm.

3. Propiedades Mecánicas

Se observó una elevada capacidad de hinchamiento, mayor a pH ácido que básico, en concreto 350% por más de 100 min, valor muy adecuado para la absorción de exudados. Estos resultados coinciden con la mayor porosidad a este pH y, están en la línea del ángulo de contacto, 37.42° , indicativo de la elevada humectabilidad de la formulación.

En contraste, la degradación fue similar a ambos pHs llegando al 100% a los 30 min. En esta línea el estudio de adhesión *in vitro* mostró valores máximos de 3 horas a pH 7.4, lo que podría predecir su comportamiento en herida abierta.

El test de “leakage” mostró distancias considerables pero en poco tiempo no comprometiendo la correcta dosificación del preparado y suficiente para alcanzar cavidades internas de la herida.

Los estudios reológicos oscilatorios confirmaron el carácter termosensible del gel y una temperatura de gelificación de 27°C . A bajas temperaturas se observó una prevalencia del comportamiento viscoso

($G'' > G'$) mientras que superada la temperatura de gelificación predominó el comportamiento elástico ($G' > G''$).

Como cabría esperar la formulación presentó buenas características de esprayabilidad a bajas temperaturas.

Las propiedades biomecánicas de la piel permanecieron constantes tras la aplicación del hidrogel. Tampoco se observaron signos de intolerancia. Todo ello avala la seguridad de la formulación.

4. Eficacia Antimicrobiana

El hidrogel mostró mayor capacidad de inhibición que la referencia comercial, sobre diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

5. Eficacia *in vivo*

Los resultados histológicos, tras 10 días desde la inducción de quemaduras térmicas sobre ratones, revelaron una acción regenerativa del hidrogel vitaminado similar a la referencia comercial.

Sobre el Scaffold Hidrogel como plataforma de hMSCs

1. Composición

La capacidad de formación y gelificación de diferentes hidrogeles se evaluaron en función de la temperatura y del contenido de chitosan al 1%, 2% y 3%, siendo el hidrogel con chitosán 2%, hialuronato sódico 0.2%, condroitín sulfato 1%, dermatán sulfato 0.1% y colágeno 2%, el que mostró mejores resultados. Como fase dispersante se utilizó un medio de acondicionamiento compuesto de 45% de Ringer lactato, 5% de albúmina (20%) y 50% de glucosa (5%). La concentración de células fue de 1×10^6 células/mL.

2. Caracterización Físico-Química

La formulación seleccionada presentó un pH eudérmico y adecuadamente ácido como para promover la cicatrización de heridas. Gracias a los elevados valores de conductividad, el *scaffold* contribuirá a la diferenciación, adhesión y comunicación de hMSCs.

La formulación se mantuvo estable bajo las siguientes condiciones de stress: ciclo de calentamiento-enfriamiento, centrifugación y ciclo de congelación y descongelación.

3. Propiedades mecánicas

El análisis de la capacidad de hinchamiento del *scaffold* en función del pH y la temperatura fue elevada, en concreto 400% a pH 5.5/32 °C y 300% a pH 7.4/37 °C, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas. De forma similar la degradación fue menor a pH = 7.4.

El *scaffold* mostró buenas características para ser esprayado o extruido, algo fundamental en caso de emergencia. Además las hMSCs soportarán presiones más bajas.

Los ensayos de adhesión *in vitro* alcanzaron valores de 12 horas lo que sugiere un elevado tiempo de residencia *in vivo*. En contrapartida el test de *leakage* mostró distancias considerables en poco tiempo.

Los estudios reológicos revelaron un comportamiento no Newtoniano de tipo pseudoplástico y respuesta tixotrópica. Los ensayos oscilatorios muestran una prevalencia del comportamiento viscoso sobre el elástico ($G'' > G'$), *a priori* adecuado para su administración tópica.

4. Caracterización Celular y Estudio de la Microestructura del Scaffold

El *scaffold* provee un adecuado nicho para la viabilidad celular, la cual se redujo al tercer día, aunque volvió a aumentar tras este tiempo hasta el 100%. Imágenes de microscopía confocal confirmaron estos resultados.

Tras la encapsulación de hMSCs, el andamio fue capaz de proporcionar un microambiente adecuado sin alterar la viabilidad y la morfología de las hMSCs al menos durante 7 días, revelando incluso división celular.

Las células presentaron una morfología redondeada y homogénea distribución en el scaffold. El hidrogel presentó una red lineal y regular de poros, con un tamaño en el rango de 20-50 μm , adecuados para el transporte de oxígeno y nutrientes. Aspectos confirmados mediante microscopía electrónica de barrido ambiental.

Las lesiones en piel o mucosas radio-inducidas representan un problema cada vez más acuciante de salud. Su curación constituye un proceso complicado que involucra varios factores, los cuales deberían ser tratados en conjunto de forma multidisciplinar.

A pesar de los satisfactorios resultados obtenidos con esta Tesis Doctoral somos conscientes de las lagunas que presenta el tratamiento del paciente afectado por radiaciones ionizantes, el cual, sigue constituyendo un desafío tecnológico, biológico y clínico.



BIBLIOGRAFÍA

Abbas H, Bensadoun RJ. 2012. Trolamine emulsion for the prevention of radiation dermatitis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Support Care Cancer*. 20(1):185-190.

Abdelmalek M, Spencer J. 2006. Retinoids and wound healing. *Dermatol Surg*. 32(10):1219-1230.

Adams MJ, Grant EJ, Kodama K, Shimizu Y, Kasagi F, Suyama A, y cols. 2012. Radiation dose associated with renal failure mortality: a potential pathway to partially explain increased cardiovascular disease mortality observed after whole-body irradiation. *Radiat Res*. 177:220-228.

[AEMPS] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. 2018. Preguntas y Respuestas sobre Regulación de Medicamentos de Terapias Avanzadas. Ministerio de Sanidad Consumo y Bienestar Social.

https://www.aemps.gob.es/investigacionClinica/terapiasAvanzadas/preg-resp_TA.htm#preg1. (Consultado el 9 de enero de 2019).

[ADH] Australian Department of Health. 2012. Australian Clinical Guidelines for Radiological Emergencies. Commonwealth of Australia. [https://www.health.gov.au/internet/publications/publishing.nsf/Content/ohp-radiological-toc/\\$FILE/Aust-Rad-Guidelines-Sept2012.pdf](https://www.health.gov.au/internet/publications/publishing.nsf/Content/ohp-radiological-toc/$FILE/Aust-Rad-Guidelines-Sept2012.pdf). (Consultado el 2 de enero de 2019).

[AFRRI] Armed Forces Radiobiology Research Institute. 2003. Medical Management of Radiological Casualties, 2nd edn. Bethesda (MD): Armed Forces Radiobiology Research Institute. <http://ehs.columbia.edu/2edmmrhandbook.pdf>. (Consultado el 15 de noviembre de 2018).

Alexandridis P, Holzwarth JF, Hatton TA. 1994. Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in

aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association. *Macromolecules* 27:2414-2425.

Alsterholm M, Karami N, Faergemann, J. 2010. Antimicrobial activity of topical skin pharmaceuticals - an in vitro study. *Acta Derm Venereol.* 90:239-245.

Alvarado HL, Abrego G, Garduño-Ramirez ML, Clares B, Calpena AC, y cols. 2015. Design and optimization of oleanolic/ursolic acid loaded nanoplateforms for ocular anti-inflammatory applications. *Nanomedicine* 11:521-530.

Alvarado HL, Calpena AC, Garduno-Ramirez ML, Ortiz R, Melguizo C, Prados JC, y cols. 2018. Nanoemulsion strategy for ursolic and oleanic acids isolates from *Plumeria obtusa* improves antioxidant and cytotoxic activity in melanoma cells. *Anticancer Agents Med Chem.* 18(6):847-853.

Athanasopoulos T, Munye MM, Yáñez-Muñoz RJ. Nonintegrating Gene Therapy Vectors. *Hematol Oncol Clin North Am.* 31(5):753-770.

Azeem A, Rizwan M. 2009. Nanoemulsion components screening and selection: a technical note. *AAPS PharmSciTech.* 10:69-76.

Bancroft WD. 1913. The theory of emulsification. *J Phys Chem.* 17:501-519.

Barnaby F. 2007. Litvinenko: measuring the lethal dose. *NBC International* 24-26.

Barnes PJ. 2006. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol.* 148(3):245-54.

Baumann LS, Spencer J. 1999. The effects of topical vitamin E on the cosmetic appearance of scars. *Dermatol Surg.* 25:311-315.

- Ben-David MA, Elkayam R, Gelernter I, Pfeffer RM. 2016. Melatonin for prevention of breast radiation dermatitis: a phase ii, prospective, double-blind randomized trial. *Isr Med Assoc J.* 18(3-4):188-192.
- Benichou A, Aserin A, Garti N. 2004. Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Adv Colloid Interface Sci.* 108-109:29-41.
- Bey E, Prat M, Duhamel P, Benderitter M, Brachet M, Trompier F, Battaglini P, Ernou I, Boutin L, Gourven M, y cols. 2010. Emerging therapy for improving wound repair of severe radiation burns using local bone marrow-derived stem cell administrations. *Wound Repair Regen.* 18(1):50-58.
- Blais M, Parenteau-Bareil R, Cadau S, Berthod F. 2013. Concise review: tissue- engineered skin and nerve regeneration in burn treatment. *Stem Cells Transl Med.* 2:545-551.
- Bodratti AM, Alexandridis P. 2018. Formulation of poloxamers for drug delivery. *J Funct Biomater.* 9(1).
- Bolderston A, Lloyd NS, Wong RK, Holden L, Robb-Blenderman L. 2006. The prevention and management of acute skin reactions related to radiation therapy: a systematic review and practice guideline. *Support Care Cancer.* 14(8):802-817.
- Brown KR, Rzucidlo E. 2011. Acute and chronic radiation injury. *J Vasc Surg.* 53:15S-21S.
- Brown W, Schillen K, Almgren M, Hvidt S, Bahadur P. 1991. Micelle and gel formation in a poly(ethylene oxide)/poly(propylene oxide)/poly(ethylene oxide) triblock copolymer in water solution: Dynamic and static light scattering and oscillatory shear measurements. *J Phys Chem.* 95:1850-1858.

Brugnara C, Gee B, Armsby CC, Kurth S, Sakamoto M, Rifai N, Alper SL, Platt OS. 1996. Therapy with oral clotrimazole induces inhibition of the Gardos channel and reduction of erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. *J Clin Invest.* 97:1227-1234.

Brugnara C. 2003. Sickle cell disease: from membrane pathophysiology to novel therapies for prevention of erythrocyte dehydration. *J Pediatr Hematol Oncol.* 25:927-933.

Brugués AP, Naveros BC, Calpena Campmany AC, Pastor PH, Saladrigas RF, Lizandra CR. 2015. Developing cutaneous applications of paromomycin entrapped in stimuli-sensitive block copolymer nanogel dispersions. *Nanomedicine (Lond)*, 10:227-240.

Bunn M. 2005. Securing the bomb. The threat. The demand for black market fissile material. http://www.nti.org/e_research/cnwm/threat/demand.asp. (Consultado el 3 de diciembre de 2018).

Butcher K, Williamson K. 2012. Management of erythema and skin preservation; advice for patients receiving radical radiotherapy to the breast: a systematic literature review. *J Radiother Pract.* 11(1):44-54.

Carl UM, Feldmeier JJ, Schmitt G, Hartmann KA. 2001. Hyperbaric oxygen therapy for late sequelae in women receiving radiation after breast-conserving surgery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 49(4):1029-1031.

Cassatt DR, Kaminski JM, Hatchett RJ, DiCarlo AL, Benjamin JM, Maidment BW. 2008. Medical countermeasures against nuclear threats: Radionuclide decorporation agents. *Radiat Res.* 170(4):540-548.

Cerpnjak K, Zvonar A, Gašperlin M, Vrečer F. 2013. Lipid-based systems as a promising approach for enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Acta Pharm.* 63(4):427-445.

- Chain Y, Illanes L. 2017. Radiofármacos en medicina nuclear Fundamentos y aplicación clínica. Buenos Aires: Editorial Universidad de la Plata; pp. 1-72.
- Chan RJ, Larsen E, Chan P. 2012. Re-examining the evidence in radiation dermatitis management literature: an overview and a critical appraisal of systematic reviews. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 84(3): 357-362.
- Chan RJ, Webster J, Chung B, Marquart L, Ahmed M, Garantziotis S. 2014. Prevention and treatment of acute radiation-induced skin reactions: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Cancer.* 14:53.
- Chang JY, Oh YK, Kong HS, Kim EJ, Jang DD, Nam KT, y cols. 2002. Prolonged antifungal effects of clotrimazole-containing mucoadhesive thermosensitive gels on vaginitis. *J Control Release* 82:39-50.
- Chao NJ. 2007. Accidental or intentional exposure to ionizing radiation: biodosimetry and treatment options. *Exp Hematol.*, 35(4 Suppl 1):24-27.
- Chung YL, Wang AJ, Yao LF. 2004. Antitumor histone deacetylase inhibitors suppress cutaneous radiation syndrome: implications for increasing therapeutic gain in cancer radiotherapy. *Mol Cancer Ther.* 3(3):317-325.
- Clares B, Calpena AC, Parra A, Abrego G, Alvarado H, Fangueiro JF, Souto EB. 2014. Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: effect on skin permeation. *Int J Pharm.* 473:591-598.
- Clark RA. 1993. Biology of dermal wound repair. *Dermatol Clin.* 11:647-666.
- Colgan PA, Organo C, Hone C, Fenton D. 2008. Radiation doses received by the irish population RPII 08/01. Dublin: Radiological Protection Institute of Ireland.

https://www.epa.ie/pubs/reports/radiation/RPII_Radiation_Doses_Irish_Population_2008.pdf. (Consultado el 18 de diciembre de 2018).

Cox JD, Stetz J, Pajak TF. 1995. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 31:1341-1346.

[CPR] Center for Preparedness and Response. 2018. Bioterrorism agents/diseases. <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>. (Consultado el 3 de diciembre de 2018).

Crețu R, Șolea LC. 2017. Zeta potential and color investigations of vegetable oil based emulsions as eco-friendly lubricants. *Sci Stud Res*. 18:167-180.

Crowley PD, Gallagher HC. 2014. Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *J Appl Microbiol*. 117(3):611-617.

[CSN] Consejo de Seguridad Nuclear. 2001. Reglamento de Protección Sanitaria contra Radiaciones Ionizantes. (BOE 26 de julio de 2001).

[CSN] Consejo de Seguridad Nuclear. 2019. Las radiaciones. <https://www.csn.es/radiaciones-ionizantes>. (Consultado el 18 de diciembre de 2018).

Cudmore SL, Delgaty KL, Hayward-McClelland SF, Petrin DP, Garber GE. 2004. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev*. 17:783-793.

Delanian S, Baillet F, Huart J, Lefaix JL, Maulard C, Housset M. 1994. Successful treatment of radiation-induced fibrosis using liposomal Cu/Zn superoxide dismutase: clinical trial. *Radiother Oncol*. 32(1):12-20.

Delfanian M, Razavi SMA, Haddad Khodaparast MH, Esmaeilzadeh Kenari R, Golmohammadzadeh S. 2018. Influence of main emulsion components on the physicochemical and functional properties of W/O/W nano-emulsion:

Effect of polyphenols, Hi-Cap, basil seed gum, soy and whey protein isolates. *Food Res Int.* 108:136-143.

DiCarlo AL, Maher C, Hick JL, Hanfling D, Dainiak N, Chao N, y cols. 2011. Radiation injury after a nuclear detonation: medical consequences and the need for scarce resources allocation. *Disaster Med Public Health Prep.* 5(Suppl 1):S32-S44.

Dickinson LE, Gerecht S. 2016. Engineered biopolymeric scaffolds for chronic wound healing. *Front Physiol.* 7:341.

Dion MW, Hussey DH, Osborne JW. 1989. The effect of pentoxifylline on early and late radiation injury following fractionated irradiation in C3H mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 17:101-107.

Donnelly EH, Nemhauser JB, Smith JM, Kazzi ZN, Farfán EB, Chang AS, Naeem SF. 2010. Acute radiation syndrome: assessment and management. *South Med J.* 103:541-546.

Dormand E, Banwell P, Goodacre T. 2005. Radiotherapy and wound healing. *Int Wound J.* 2:112-127.

Dragicevic N, Copes N, O'Neal-Moffitt G, Jin J, Buzzeo R, Mamcarz M, y cols. 2011. Melatonin treatment restores mitochondrial function in Alzheimer's mice: a mitochondrial protective role of melatonin membrane receptor signaling. *J Pineal Res.* 51:75–86.

Dreifke, MB, Jayasuriya AA, Jayasuriya AC, 2015. Current wound healing procedures and potential care. *Mater Sci Eng.* 48:651-662.

Drobnik J. 2012. Wound healing and the effect of pineal gland and melatonin. *J Exp Integr Med.* 2(1): 3-14.

Drosou A, Falabella A, Kirsner RS. 2003. Antiseptics on wounds: an area of controversy. *Wounds.* 15(5):149-66.

Dvir T, Timko BP, Kohane DS, Langer R. 2011. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat Nanotechnol.* 6(1):13-22.

Eaton D, Wilson K. 1979. Reaction of imidazole and hydroquinone with oxymyoglobin. *J Inorg Biochem.* 10:195-203.

Eddhahak A, Zidi M. 2015. Influence of viscoelastic properties of an hyaluronic acid-based hydrogel on viability of mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng.* 26:103-114.

Enna SJ, Bylund DB. 2008. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference.* New York: Elsevier.

Escobar-Chávez JJ, López-Cervantes M, Naïk A, Kalia YN, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. 2006. Applications of thermoreversible Pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J Pharm Pharmaceut Sci.* 9(3):339-358.

Espinoza LC, Vacacela M, Clares B, Garcia ML, Fabrega MJ, Calpena AC. 2018. Development of a nasal donepezil-loaded microemulsion for the treatment of Alzheimer's disease: in vitro and ex vivo characterization, *CNS Neurol Disord Drug Targets* 17:43-53.

Famoso JM, Laughlin B, McBride A, Gonzalez VJ. 2017. Pentoxifylline and vitamin E drug compliance after adjuvant breast radiation therapy. *Adv Radiat Oncol.* 3(1):19-24.

Farhan F, Kazemian A, Alagheband H. 2007. Topical betamethasone for the prevention of acute radiation dermatitis in breast cancer patients. *Iran J Radiat Res.* 1(2):105-111.

Feight D, Baney T, Bruce S, McQuestion M. 2011. Putting evidence into practice. *Clin J Oncol Nurs.* 15(5):481-492.

Fernández Campos F, Calpena Campmany AC, Rodríguez Delgado G, López Serrano O, Clares Naveros B. 2012. Development and characterization of a novel nystatin-loaded nanoemulsion for the buccal treatment of candidosis: ultrastructural effects and release studies. *J Pharm Sci.* 101:3739-3752.

Fernández-Campos F, Clares Naveros B, López Serrano O, Alonso Merino C, Calpena Campmany AC. 2013. Evaluation of novel nystatin nanoemulsion for skin candidosis infections. *Mycoses* 56:70-81.

Fitzmaurice SD, Sivamani RK, Isseroff RR. 2011. Antioxidant therapies for wound healing: a clinical guide to currently commercially available products. *Skin Pharmacol Physiol.* 24(3):113-126.

Florence AT, Whitehill D. 1981. Some features of breakdown in water-in-oil-in-water multiple emulsions. *J Colloid Interface Sci.* 79:243-256.

Florence AT, Whitehill D. 1982. The formulation and stability of multiple emulsions. *Int. J. Pharm.* 11(4):277-308.

Fujioka M. 2014. Surgical reconstruction of radiation injuries. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 3(1):25-37.

Galvez-Martín P, Martín JM, Ruiz AM, Clares B. 2017. Encapsulation in cell therapy: Methodologies, materials, and clinical applications. *Curr Pharm Biotechnol.* 18(5):365-377.

Gao Y, Kong W, Li B, Ni Y, Yuan T, Guo L, y cols. 2018. Fabrication and characterization of collagen-based injectable and self-crosslinkable hydrogels for cell encapsulation, *Colloids Surf B: Biointerfaces* 167:448-456.

Gonyon DL, Zenn MR. 2003. Simple approach to the radiated scalp wound using INTEGRA skin substitute. *Ann Plast Surg.* 50(3):315-320.

Gopinathan J, Pillai MM, Sahanand KS, Rai BKD, Selvakumar R, Bhattacharyya A. 2017. Synergistic effect of electrical conductivity and biomolecules on human meniscal cell attachment, growth, and proliferation in poly- ϵ -caprolactone nanocomposite scaffolds. *Biomed Mater.* 12:065001.

Gothard L, Stanton A, MacLaren J, Lawrence D, Hall E, Mortimer P, Parkin E, Pritchard J, Risdall J, Sawyer R, y cols. 2004. Non-randomised phase II trial of hyperbaric oxygen therapy in patients with chronic arm lymphoedema and tissue fibrosis after radiotherapy for early breast cancer. *Radiother Oncol.* 70(3):217-224.

Gourmelon P, Benderitter M, Bertho JM, Huet C, Gorin NC, De Revel P. 2010. European consensus on the medical management of acute radiation syndrome and analysis of the radiation accidents in Belgium and Senegal. *Health Phys.* 98(6):825-832.

Griffin WC. Clasiffication of surface active agents by HLB. *J Soc Cosmet Chem.* 1:311-326.

Gupta A, Burak E, Hattona A and Doyle P. 2016. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter.* 12(11):2826-2841.

Han L, Yang R, Yuan S, Ding S, Wu Z, Wu Z, y cols. 2018. Soft multiple emulsions demonstrating reversible freeze-thawing capacity and enhanced skin permeability of diclofenac sodium. *Colloid Polym Sci.* 296:471-481

Hirata K, Mohammed D, Hadgraft J, Lane ME. 2014. Influence of lidocaine hydrochloride and penetration enhancers on the barrier function of human skin. *Int J Pharm.* 477:416-420.

Holler V, Buard V, Gaugler MH, Guipaud O, Baudelin C, Sache A, Perez Mdel R, Squiban C, Tamarat R, Milliat F, y cols. 2009. Pravastatin limits radiation-induced vascular dysfunction in the skin. *J Invest Dermatol.* 129(5):1280-1291.

Hom DB, Unger GM, Pernell KJ, Manivel JC. 2005. Improving surgical wound healing with basic fibroblast growth factor after radiation. *Laryngoscope*. 115(3):412-422.

Horton JA, Li F, Chung EJ, Hudak K, White A, Krausz K, Gonzalez F, Citrin D. 2013. Quercetin inhibits radiation-induced skin fibrosis. *Radiat Res*. 180(2):205-215.

Hubner G, Brauchle M, Smola H, Madlener M, Fassler R, Werner S. 1996. Differential regulation of proinflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine* 8:548-556.

Hymes SR, Strom EA, Fife C. Radiation dermatitis: clinical presentation, pathophysiology, and treatment 2006. *J Am Acad Dermatol*. 54(1):28-46.

[IAEA] International Atomic Energy Agency. 2009. The radiological accident in Nueva Aldea. Vienna. https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/Pub1389_web.pdf.

(Consultado el 29 de diciembre de 2018).

[ICRP] International Commission on Radiological Protection. 1996. Conversion coefficients for use in radiological protection against external radiation. ICRP Publication 74. *Annals of the ICRP* 26(3-4).

Iervolino V, Di Costanzo G, Azzaro R, Diodato AM, Di Macchia CA, Di Meo T, Petruzzello A, Loquercio G, Muto P, Apice G, y cols. 2013. Platelet gel in cutaneous radiation dermatitis. *Support Care Cancer*. 21(1):287-293.

Ilan N, Mahooti S, Madri JA. 1998. Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis. *J Cell Sci*. 111:3621-3631.

Ing LY, Zin NM, Sarwar A, Katas H. 2012. Antifungal activity of chitosannanoparticles and correlation with their physical properties. *Int J Biomater.* 632698.

[IPC] Illinois Poison Center. 2005. Fact sheet for emergency evaluation and treatment. Cutaneous radiation injury. Chicago (IL). https://www.illinoispoisoncenter.org/ipc_media/pdf/CutaneousRadiation.pdf. (Consultado el 26 de diciembre de 2018).

Ishikawa Y, Katoh Y, Ohshima H. 2005. Colloidal stability of aqueous polymeric dispersions: effect of pH and salt concentration. *Colloids Surf B Biointerfaces* 42:53-58.

Israelachvili J. 1992. *Intermolecular and Surface Force*, Second Edition. London: Academic Press.

Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, Bunnell BA. 2006. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem.* 99(5):1285-1297.

Izquierdo P, Feng J, Esquena J, Tadros TF, Dederen JC, Garcia MJ, y cols. 2005. The influence of surfactant mixing ratio on nanoemulsion formation by the PIT method. *J Colloid Interface Sci.* 285:388-394.

Jacobson LK, Johnson MB, Dedhia RD, Niknam-Bienia S, Wong AK. 2017. Impaired wound healing after radiation therapy: A systematic review of pathogenesis and treatment. *JPRAS Open.* 13:92-105.

Jaschke W, Schmuth M, Trianni A, Bartal G. 2017. Radiation-induced skin injuries to patients: what the interventional radiologist needs to know. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 40:1131-1140.

Javier B, Ackerman AB. 2001. Keratinocyte?. *Dermatol Pract Conceptual* 7:175-178.

- Jenkins BM. 2008. Will terrorists go nuclear?. New York: Prometheus Books.
- Jones E., Cochrane CA, Percival SL. 2015. The effect of pH on the extracellular matrix and biofilms. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 4:431-439.
- Kalb R, Grossman M. 1985. Contact dermatitis to clotrimazole. *Cutis* 36:240-242.
- Kalhapure RS, Sonawane SJ, Sikwal DR, Jadhav M, Rambharose S, Mocktar C, y cols. 2015. *Colloids Surf B Biointerfaces* 136:651-658.
- Kamiya K, Ozasa K, Akiba S, Niwa O, Kodama K, Takamura N, Zaharieva EK, Kimura Y, Wakeford R. 2015. Long-term effects of radiation exposure on health. *Lancet*. 386(9992):469-478.
- Karagas MR, Nelson HH, Zens MS, Linet M, Stukel TA, Spencer S, y cols. 2007. Squamous cell and basal cell carcinoma of the skin in relation to radiation therapy and potential modification of risk by sun exposure. *Epidemiology*. 18:776-784.
- Kesminiene A, Evrard AS, Ivanov VK, Malakhova IV, Kurtinaitise J, Stengrevics A, y cols. 2009. Risk of thyroid cancer among chernobyl liquidators. *Radiat Res*. 178: 425-36.
- Kinoshita N, Tsuda M, Hamuy R, Hamuy R, Nakashima M, Nakamura-Kurashige T, Matsuu-Matsuyama M, Hirano A, Akita S. 2012. The usefulness of basic fibroblast growth factor for radiation-exposed tissue. *Wound Repair Regen*. 20(1):91-102.
- Kølle SF, Fischer-Nielsen A, Mathiasen AB, Elberg JJ, Oliveri RS, Glovinski PV, y cols. 2013. Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue derived stem cells for graft survival: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet*. 382(9898):1113-1120.

Korhonen M, Niskanen H, Kiesvaara J, Yliruusi J. 2000. Determination of optimal combination of surfactants in creams using rheology measurements. *Int J Pharm.* 197:143-151

Kotenko K, Moroz B, Nadezhina N, Galstyan I, Eremin I, Deshevoy J, y cols. 2012. Successful treatment of localised radiation lesions in rats and humans by mesenchymal stem cell transplantation. *Radiat Prot Dosimetry.* 151(4):661-665.

Kouvaris JR, Kouloulis VE, Plataniotis GA, Balafouta EJ, Vlahos LJ. 2001. Dermatitis during radiation for vulvar carcinoma: Prevention and treatment with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor impregnated gauze. *Wound Repair Regen.* 9(3):187-193.

Kruchi K. 2002. How is the circadian rhythm of core body temperature regulated?. *Clin Auton Res.* 12:147-149.

Lambers H, Piessens S, Bloem A, Pronk H, Finkel P. 2006. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci.* 28:359-370.

Lanigan SW, Joannides T. 2003. Pulsed dye laser treatment of telangiectasia after radiotherapy for carcinoma of the breast. *Br J Dermatol.* 148(1):77-79.

Lataillade JJ, Doucet C, Bey E, Carsin H, Huet C, Clairand I, Bottollier-Depois JF, Chapel A, Ernou I, Gourven M, y cols. 2007. New approach to radiation burn treatment by dosimetry guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy. *Regen Med.* 2(5):785-794.

Lee JW, Tutela JP, Zoumalan RA, Thanik VD, Nguyen PD, Varjabedian L, Warren SM, Saadeh PB. 2010. Inhibition of Smad3 expression in radiation-induced fibrosis using a novel method for topical transcutaneous gene therapy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 136(7):714-719.

Leivo T, Kiistala U, Vesterinen M, Owaribe K, Burgeson RE, Virtanen I, y cols. 2000. Re-epithelialization rate and protein expression in the suction-induced wound model: comparison between intact blisters, open wounds and calcipotriol-pretreated open wounds. *Br J Dermatol* 142:991-1002.

Linse P. 1993. Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymers in aqueous solution. *Macromolecules* 26:4437-4449.

Loh W. 2002. Block Copolymer Micelles. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*. New York: Marcel Dekker; p. 802-813.

López Alfonso JC, Parsai S, Joshi N, Godley A, Shah C, Koyfman SA, y cols. 2018. Temporally feathered intensity-modulated radiation therapy: A planning technique to reduce normal tissue toxicity. *Med Phys*. 45(7):3466-3474.

Mahomed F, Rikhotso E, Altini M. 2011. Subcutaneous calcinosis as late sequela of radiotherapy to the neck. *J Oral Maxillofac Surg*. 69(6):123-127.

Mallandrich M, Fernández-Campos F, Clares B, Halbaut L, Alonso C, Coderch L, y cols. 2017. Developing transdermal applications of ketorolac tromethamine entrapped in stimuli sensitive block copolymer hydrogels. *Pharm Res*. 34:1728-1740.

Martella S, Rietjens M, Lohsiriwat V, Lazzari R, Vavassori A, Jereczek BA, y cols. 2010. Acute radiation dermatitis in breast cancer: topical therapy with vitamin E acetate in lipophilic gel base. *Ecancermedicalsecience* 4:190.

Martín MJ, Calpena AC, Fernández F, Mallandrich M, Gálvez P, Clares B. 2015. Development of alginate microspheres as nystatin carriers for oral mucosa drug delivery. *Carbohydr Polym*. 117:140-149.

Martínez Pons JA. 2006. Armas químicas qué son y cómo actúan. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 1:55-64.

- Martín-Villena MJ, Fernández-Campos F, Calpena-Campmany AC, Bozal-de Febrer N, Ruiz-Martínez MA, Clares-Naveros B. 2013. Novel microparticulate systems for the vaginal delivery of nystatin: development and characterization. *Carbohydr Polym.* 94:1-11.
- Marwah H, Garg T, Goyal AK, Rath G. 2016. Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. *Drug Deliv.* 23; 564-578.
- Mason TG, Wilking JN, Meleson K, Chang CB, Graves SM. 2006. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *J Phys Condens Matter.* 18:R635-R666.
- McClements DJ. 2013. Nano emulsion-based oral delivery systems for lipophilic bioactive components: nutraceuticals and pharmaceuticals. *Ther Deliv.* 4(7):841-857.
- McClements DJ. 2012. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter.* 8(6):1719–1729.
- McKenzie M, Betts D, Suh A, Bui K, Kim LD, Cho H. 2015. Hydrogel-based drug delivery systems for poorly water-soluble drugs. *Molecules* 20(11):20397-20408.
- McQuestion M. 2011. Evidence-based skin care management in radiation therapy: clinical update. *Semin Oncol Nurs.* 27:1-7.
- Mei L, Hu D, Ma J, Wang X, Yang Y, Liu J. 2012. Preparation, characterization and evaluation of chitosan macroporous for potential application in skin tissue engineering. *Int J Biol Macromol.* 5:992-997.
- Mettler FA Jr, Gus'kova AK, Gusev I. 2007. Health effects in those with acute radiation sickness from the Chernobyl accident. *Health Phys.* 93(5):462-469.

[MGH] Massachusetts General Hospital (US). 2013. Pilot study of the effect of laser on reversing chronic radiation injury. Bethesda (MD): National Library of Medicine. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01910818>. (Consultado el 12 de noviembre de 2018).

Muscholik G. 2007. Multiple emulsions for food use. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 12(4-5):213-220.

Mustoe TA, Purdy J, Gramates P, Deuel TF, Thomason A, Pierce GF. 1989. Reversal of impaired wound healing in irradiated rats by platelet-derived growth factor-BB. *Am J Surg.* 158(4):345-350.

Nagler A, Ohana M, Leiba M, Levdansky L, Gorodetsky R. 2007. Effect of halofuginone, a collagen alpha1(I) inhibitor, on wound healing in normal and irradiated skin: implication for hematopoietic stem cell transplantation. *Acta Haematol.* 118(2):77-83.

Nasser NJ, Fenig S, Ravid A, Nouriel A, Ozery N, Gardyn S, y cols. 2017. Vitamin D ointment for prevention of radiation dermatitis in breast cancer patients. *NPJ Breast Cancer* 3:10.

Nauta A, Seidel C, Deveza L, Montoro D, Grova M, Ko SH, Hyun J, Gurtner GC, Longaker MT, Yang F. 2013. Adipose derived stromal cells overexpressing vascular endothelial growth factor accelerate mouse excisional wound healing. *Mol Ther.* 21(2):445-455.

[NCI] National Cancer Institute. 2017. Common Terminology Criteria for Adverse Events Version 5. Washington (DC): Department of Health and Human Services. https://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/CTCAE_v5_Quick_Reference_8.5x11.pdf. (Consultado el 27 de diciembre de 2018).

Need AG, O'Loughlin PD, Morris HA, Coates PS, Horowitz M, Nordin BE. 2008. Vitamin D metabolites and calcium absorption in severe vitamin D deficiency. *J Bone Miner Res.* 23:1859-1863.

Nimse SB, Palb D. 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* 5:27986-28006.

Nisisako T. 2008. Microstructured devices for preparing controlled multiple emulsions. *Chem Eng Technol.* 31(8):1091-1098.

Noble R. 2003. *Micromedex Healthcare Series.* Pharmaceutical Press.

Nymann P, Hedelund L, Haedersdal M. 2009. Intense pulsed light vs. long-pulsed dye laser treatment of telangiectasia after radiotherapy for breast cancer: a randomized split-lesion trial of two different treatments. *Br J Dermatol.* 160(6):1237-1241.

O'Donovan A, Coleman M, Harris R, Herst P. 2015. Prophylaxis and management of acute radiation-induced skin toxicity: a survey of practice across Europe and the USA. *Eur J Cancer Care (Engl).* 24(3):425-435.

Okunieff P, Xu J, Hu D, Liu W, Zhang L, Morrow G, y cols. 2006. Curcumin protects against radiation-induced acute and chronic cutaneous toxicity in mice and decreases mRNA expression of inflammatory and fibrogenic cytokines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 65(3):890-898.

Olascoaga A, Vilar-Compte D, Poitevin-Chacón A, Contreras-Ruiz J. 2008. Wound healing in radiated skin: pathophysiology and treatment options. *Int Wound J.* 5(2):246-257.

[OPCW] Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons. 2005. Convention on the prohibition of the development, production, stockpiling and use of chemical weapons and on their destruction. https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/CWC/CWC_en.pdf. (Consultado el 3 de diciembre de 2018).

Ostwald W. 1896. Lehrbuch der Allgemeinen Chemie. 1st ed. Leipzig: Nabu Press.

Palmer JL, Deburghraeve CR, Bird MD, Hauer-Jensen M, Kovacs EJ. 2011. Development of a combined radiation and burn injury model. *J Burn Care Res.* 32(2):317–323.

Parikh R, Bakhshi G, Naik M, Gaikwad B, Jadhav K, Tayade M. 2016. The efficacy and safety of tetrachlorodecaoxide in comparison with super-oxidised solution in wound healing. *Arch Plast Surg.* 43(5):395-401.

Parra A, Clares B, Rosselló A, Garduño-Ramírez ML, Abrego G, García ML, y cols. 2016. Ex vivo permeation of carprofen from nanoparticles: A comprehensive study through human, porcine and bovine skin as anti-inflammatory agent. *Int J Pharm.* 501:10-17.

Pasquier D, Hoelscher T, Schmutz J, Dische S, Mathieu D, Baumann M, y cols. 2004. Hyperbaric oxygen therapy in the treatment of radio-induced lesions in normal tissues: A literature review. *Radiother Oncol.* 72(1):1-13.

Pavelić Z, Skalko-Basnet N, Jalsenjak I. 2005. Characterisation and in vitro evaluation of bioadhesive liposome gels for local therapy of vaginitis. *Int J Pharm.* 301:140-148.

Preston DL, Ron E, Tokuoka S, Funamoto S, Nishi N, Soda M, y cols. 2007. Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998. *Radiat Res.* 168:1-64.

Pretel E, Arias JL, Cabeza L, Melguizo C, Prados J, Mallandrich M, y cols. 2017. Development of biomedical 5-fluorouracil nanoplatfoms for colon cancer chemotherapy: Influence of process and formulation parameters. *Int J Pharm.* 530(1-2):155-64.

Prise K.M., Saran A. 2011. Concise review: stem cell effects in radiation risk. *Stem Cells* 29:1315-1321.

- Pritchard J, Anand P, Broome J, Davis C, Gothard L, Hall E, y cols. 2001. Double-blind randomized phase II study of hyperbaric oxygen in patients with radiation-induced brachial plexopathy. *Radiother Oncol.* 58(1):279-286.
- Qiu Y, Park K. 2012. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 64:49-60.
- Rabea EI, Badawy ME, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4(6):1457-65.
- Ramundo J, Gray M. 2008. Enzymatic wound debridement. *J Wound Ostomy Continence Nurs.* 35(3):273-280.
- Rao J, McClements DJ. 2011. Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: influence of composition and preparation method. *J Agric Food Chem.* 59(9):5026-5035.
- Rasulov MF, Vasilchenkov AV, Onishchenko NA, Krasheninnikov ME, Kravchenko VI, Gorshenin TL, y cols. 2005. First experience of the use bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns. *Bull Exp Biol Med.* 139(1):141-144.
- Raymond EG. 1984. On the theory of lower critical solution points in hydrogen-bonded mixtures. *J Chem Phys.* 80:5340-5341.
- Reihnsner R, Balogh B, Menzel EJ. 1995. Two-dimensional elastic properties of human skin in terms of an incremental model at the in vivo configuration. *Med Eng Phys.* 17:304-313.
- Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX. 2009. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 44:175-200.

[REMM] Radiation Emergency Medical Management (US). 2011. Radiation Emergency Medical Management. Cutaneous radiation syndrome. Washington (DC): Department of Health and Human Services. <http://www.remm.nlm.gov/cutaneoussyndrome.htm>. (Consultado el 26 de diciembre de 2018).

Renau AI, García-Vidal C, Salavert M. 2016. Enfermedades invasivas por hongos levaduriformes en pacientes quemados graves. *Rev Iberoam Micol.* 33(3):160-169.

Renau Escrig AI, Salavert M, Vivó C, Cantón E, Pérez Del Caz MD, Pemán J. 2016. Candidemia in major burns patients. *Mycoses* 59(6):391-398.

Ricardo C. Pasquali, Diego A. Chiappetta, Carlos Bregni. 2005. Los copolímeros en bloques anfífilicos y sus aplicaciones farmacéuticas. *Acta Farm. Bonaerense* 24(4):610-618.

Richardson D, Sugiyama H, Nishi N, Sakata R, Shimizu Y, Grant EJ, y cols. 2009. Ionizing radiation and leukemia mortality among Japanese atomic bomb survivors, 1950-2000. *Radiat Res.* 172:368-382.

Rifai N, Sakamoto M, Law T, Platt O, Mikati M, Armsby CC, y cols. 1995. HPLC measurement, blood distribution, and pharmacokinetics of oral clotrimazole, potentially useful antisickling agent. *Clin Chem.* 41:387-391.

Rigotti G, Marchi A, Galiè M, Baroni G, Benati D, Krampera M, y cols. 2007. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 119(5):1409-1424.

Rossi AM, Nehal KS, Lee EH. 2014. Radiation-induced breast telangiectasias treated with the pulsed dye laser. *J Clin Aesthet Dermatol.* 7(12):34-37.

Ryan JL. 2012. Ionizing radiation: the good, the bad, and the ugly. *J Invest Dermatol.* 132(3 Pt 2):985-993.

Salvo N, Barnes E, van Draanen J, Stacey E, Mitera G, Breen D, Giotis A, Czarnota G, Pang J, De Angelis C. 2010. Prophylaxis and management of acute radiation-induced skin reactions: a systematic review of the literature. *Curr Oncol.* 17(4):94-112.

Sánchez A, Calpena AC, Clares B. 2015. Evaluating the oxidative stress in inflammation: role of melatonin. *Int J Mol Sci.* 16(8):16981-7004.

Sanz R, Clares B, Mallandrich M, Suñer-Carbó J, Montes MJ, Calpena AC. 2018. Development of a mucoadhesive delivery system for control release of doxepin with application in vaginal pain relief associated with gynecological surgery. *Int J Pharm.* 535:393-401

Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H, Mossbacher U, Schindl L. 2000. Low intensity laser irradiation in the treatment of recalcitrant radiation ulcers in patients with breast cancer-long-term results of 3 cases. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 16(1):34-37.

Schmidts T, Marquardt K, Schlupp P, Dobler D, Heinz F, Mäder U, y cols. 2012. Development of drug delivery systems for the dermal application of therapeutic DNAzymes. *Int J Pharm.* 431:61-69.

Sefiriz W. 1925. Studies in emulsions. *J Phys Chem.* 29:738-749.

Segaert S, Van Cutsem E. 2005. Clinical signs, pathophysiology and management of skin toxicity during therapy with epidermal growth factor receptor inhibitors. *Ann Oncol.* 16(9):1425-1433.

Senet P. 2008. Fisiología de la cicatrización cutánea. *EMC-Dermatología* 42(1):1-10.

Sera N, Hida A, Imaizumi M, Nakashima E, Akahoshi M. 2013. The association between chronic kidney disease and cardiovascular disease risk factors in atomic bomb survivors. *Radiat Res.* 179:46-52.

Sheppard E, Tcheurekdjian N. 1977. Comments on multiple-phase emulsions. *J Colloid Interface Sci.* 62(3):564-565.

Sierra AF, Ramirez ML, Campmany AC, Martinez AR, Naveros BC. 2013. In vivo and in vitro evaluation of the use of a newly developed melatonin loaded emulsion combined with UV filters as a protective agent against skin irradiation. *J Dermatol Sci.* 69:202-214.

Silva AC, Amaral MH, González-Mira E, Santos D, Ferreira D. 2012. Solid lipid nanoparticles (SLN)-based hydrogels as potential carriers for oral transmucosal delivery of risperidone: preparation and characterization studies. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 93:241-248.

Singer AJ, Clark RA. 1999. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 341:738-746.

Singh A, Bahari K. 2003. Use of High-Energy Radiation in Polymer Blends Technology. In: Utracki L.A. (eds) *Polymer Blends Handbook*. Dordrecht: Springer; pp. 757-859.

Singh VK, Romaine PL, Seed TM. 2015. Medical countermeasures for radiation exposure and related Injuries: characterization of medicines, FDA-approval status and inclusion into the strategic national stockpile. *Health Phys.* 108(6):607-630.

Soriano JL, Calpena AC, Souto EB, Clares B. 2018. Therapy for prevention and treatment of skin ionizing radiation damage: A review. *Int J Radiat Biol.* Doi: 10.1080/09553002.2019.1562254.

Soriano-Ruiz JL, Calpena-Capmany AC, Cañadas-Enrich C, Febrer NB, Suñer-Carbó J, Souto EB, Clares-Naveros B. 2019. Biopharmaceutical

profile of a clotrimazole nanoemulsion: Evaluation on skin and mucosae as anticandidal agent. *Int J Pharm.* 554:105–115.

Soriano-Ruiz JL, Calpena-Capmany AC, Cañadas-Enrich C, Febrer NB, Suñer-Carbó J, Souto EB, Clares-Naveros B. 2018. Biopharmaceutical profile of a clotrimazole nanoemulsion: Evaluation on skin and mucosae as anticandidal agent. *Int J Pharm.* 554:105-115.

Sosa L, Clares B, Alvarado HL, Bozal N, Domenech O, Calpena AC. 2017. Amphotericin B releasing topical nanoemulsion for the treatment of candidiasis and aspergillosis. *Nanomedicine* 13:2303-2312.

Spalek M. 2016. Chronic radiation-induced dermatitis: challenges and solutions. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 9:473-482.

Stahl W, Sies H. 1996. Lycopene: a biologically important carotenoid for humans?. *Arch. Biochem Biophys.* 336:1-9.

Sterodimas A, De Faria J, Nicaretta B, Pitanguy I. 2010. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 63:1886-1892.

Suárez B, López-Abente G, Martínez C, Navarro C, Tormo MJ, Rosso S, y cols. 2007. Occupation and skin cancer: the results of the HELIOS-I multicenter case-control study. *BMC Public Health.* 7(1):180.

Sugiyama H, Misumi M, Kishikawa M, Iseki M, Yonehara S, Hayashi T, y cols. 2014. Skin cancer incidence among atomic bomb survivors from 1958 to 1996. *Radiat. Res.* 181:531-539.

Suñer J, Calpena AC, Clares B, Cañadas C, Halbaut L. 2017. Development of clotrimazole multiple W/O/W emulsions as vehicles for drug delivery: effects of additives on emulsion stability. *AAPS PharmSciTech.* 18: 539-550.

Suñer-Carbó J, Boix-Montañés A, Halbaut-Bellowa L, Velázquez-Carralero N, Zamarbide-Ledesma J, Bozal-de-Febrer N, y cols. 2017. Skin permeation of econazole nitrate formulated in an enhanced hydrophilic multiple emulsion. *Mycoses* 60:166-177,

Sweetman SC. 2007. *Martindale: the complete drug reference*. London: Pharmaceutical Press; p.764.

Tadros T. 2009. *Emulsions Science and Technology*. Weinheim:Wiley-VCH.

Teas J, Cunningham JE, Cone L, Jansen K, Raghavan SK, Nitcheva DK, Xie D, Butler WM. 2004. Can hyperbaric oxygen therapy reduce breast cancer treatment-related lymphedema? a pilot study. *J Womens Health (Larchmt)*. 13(9):1008-1018.

Thiele JJ, Ekanayake-Mudiyanselage S. 2007. Vitamin E in human skin: organ-specific physiology and considerations for its use in dermatology. *Mol Aspects Med*. 28(5-6):646-67.

Tian M, Dong MQ, Chiu SW, Lau CP, Li GR. 2006. Effects of the antifungal antibiotic clotrimazole on human cardiac repolarization potassium currents. *Br J Pharmacol*. 147(3):289-297.

Traber MG, Atkinson J. 2007. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med*. 43(1):4-15.

Tran TN, Hoang MV, Phan QA, Phung TL, Purschke M, Ferinelli WA, Sabir S, Ziegler A, Nelson S, Anderson RR. 2015. Fractional epidermal grafting in combination with laser therapy as a novel approach in treating radiation dermatitis. *Semin Cutan Med Surg*. 34(1):42-47.

Trivedi V, Chand P, Srivastava K, Puri SK, Maulik PR, Bandyopadhyay U. 2005. Clotrimazole inhibits hemoperoxidase of *Plasmodium falciparum* and induces oxidative stress. Proposed antimalarial mechanism of clotrimazole. *J Biol Chem*. 280:41129-41136.

Ur-Rehman T, Tavelin S, Gröbner G. 2011. Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. *Int J Pharm.* 409(1-2):19-29.

Vadnere M, Amidon G, Lindenbaum S, Haslam JL. 1984. Thermodynamic studies on the gel-sol transition of some pluronic polyols. *Int J Pharm.* 22:207-218.

Van der Graaf S, Schroen C, Boom R. 2005. Preparation of double emulsions by membrane emulsification - a review. *J Membrane Sci.* 251(1-2):7-15.

Verma P, Ahuja M. 2015. Optimization, characterization and evaluation of chitosantailored cubic nanoparticles of clotrimazole. *Int J Bio. Macromol.* 73:138-145.

Watson LC, Gies D, Thompson E, Thomas B. 2012. Randomized control trial: evaluating aluminum- based antiperspirant use, axilla skin toxicity, and reported quality of life in women receiving external beam radiotherapy for treatment of stage 0, I, and II breast cancer. *Int J Rad Oncol Biol Phys.* 83(1):28-34.

Whitehill D, Florence AT. 1979. Mechanisms of instability in w/o/w multiple emulsions. *J Pharm Pharmacol.* Suppl 3P.

Wiener SL, Barrett J. 1986. Trauma Management for Civilian and Military Physicians. Philadelphia (PA): W. B. Saunders. Chapter 7, Thermonuclear weapons; p. 497-506.

Wollina U, Liebold K, Konrad H. 2001. Treatment of chronic radiation ulcers with recombinant platelet-derived growth factor and a hydrophilic copolymer membrane. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 15(5):455-457.

Wong RK, Bensadoun RJ, Boers-Doets CB, Bryce J, Chan A, Epstein JB, Eaby-Sandy B, Lacouture ME. 2013. Clinical practice guidelines for the

prevention and treatment of acute and late radiation reactions from the MASCC Skin Toxicity Study Group. *Support Care Cancer*. 21(10):2933-2948.

Xavier S, Piek E, Fujii M, Javelaud D, Mauviel A, Flanders KC, Samuni AM, Felici A, Reiss M, Yarkoni S, y cols. 2004. Amelioration of radiation-induced fibrosis: inhibition of transforming growth factor-beta signaling by halofuginone. *J Biol Chem*. 279(15):15167-15176.

Yoshida E, Watanabe T, Takata J, Yamazaki A, Karube Y, Kobayashi S. 2006. Topical application of a novel, hydrophilic gamma-tocopherol derivative reduces photo- inflammation in mice skin. *J Invest Dermatol*. 26:1633-1640.

Yuen CW, Yip J, Liu L, Cheuk K, Kan CW, Cheung HC, y cols. 2012. Chitosan microcapsules loaded with either miconazole nitrate or clotrimazole, prepared via emulsion technique. *Carbohydr Polym* 89:795-801.

Zanuy M, Carranza F. 2007. Metabolismo, fuentes endógenas y exógenas de vitamina D. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*. 16.4:63-70.

Zetner D, Andersen LP, Rosenberg J. 2016. Melatonin as protection against radiation injury: a systematic review. *Drug Res (Stuttg)* 66(6):281-296.

Zhang J, Michniak-Kohn BB, 2018. Investigation of microemulsion and microemulsion gel formulations for dermal delivery of clotrimazole. *Int J Pharm*. 536:345-352.

Zhu G, Lin JC, Kim SB, Bernier J, Agarwal JP, Vermorken JB, Think DHQ, Cheng HC, Yun HJ, Chitapanarux I, y cols. 2016. Asian expert recommendation on management of skin and mucosal effects of radiation,

with or without the addition of cetuximab or chemotherapy, in treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 16: 42-55.

