

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

PROGRAMA DOCTORADO

CIENCIAS DE LA SALUD

TÍTULO

VÍAS TRANSDÉRMICAS DE ADMINISTRACIÓN DE
FÁRMACOS

AUTOR: **IGNACIO ORDÍZ GARCÍA**



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: VIAS TRANSDERMICAS DE ADMINISTRACION DE FARMACOS	Inglés: TRANSDERMIC DRUGS ADMINISTRATION
2.- Autor	
Nombre: Ignacio ORDIZ GARCIA	DNI/Pasaporte/NIE
Programa de Doctorado: CIENCIAS DE LA SALUD	
Órgano responsable: COORDINADOR DEL PROGRAMA DE DOCTORADO CIENCIAS DE LA SALUD	

RESUMEN (en español)

El presente trabajo de investigación se diseñó para estudiar la absorción de medicamentos (procaína, ketoprofeno, biotina y cafeína) a través de la piel utilizando diferentes técnicas de permeación cutánea: intradérmica (mesoterapia), microperforación y electroiontoporación y la asociación de las dos últimas. Se utilizó *Sus scorfa*, doméstica, como modelo experimental y se analizaron las muestras de piel en el momento de la administración del fármaco, a los 15, 30 y 60 minutos, y a los 7 y 14 días.

Las técnicas de estudio utilizadas fueron: HPLC para determinar la cinética cutánea de los fármacos; técnicas estructurales y ultraestructurales (microscopía electrónica de transmisión y de barrido) y de inmunohistoquímica (proteína S100, vimentina, colágeno IV) para valorar los cambios estructurales, ultraestructurales y de densidad de células dendríticas (melanocitos y células de Langerhans). Se valoraron, además, los cambios inducidos por las técnicas de aplicación y las moléculas en el espesor relativo de dermis/epidermis, de densidad de la red capilar papilar dérmica.

Los resultados demuestran que la piel es una buena vía de absorción de moléculas de diferentes características organolépticas y su acción local se ejerce principalmente antes de los siete días de su administración. Las concentraciones cutáneas más altas para la biotina y el ketoprofeno, se obtienen por la vía intradérmica; para la cafeína y la procaína, las cuatro técnicas utilizadas logran concentraciones cutáneas similares y se mantienen más elevadas en el tiempo con las técnicas microperforación, electroiontoporación y la combinación de ambas. Ninguna de las técnicas de permeación cutánea utilizadas asociadas a las moléculas producen lesiones estructurales objetivables, ni modificaciones en el grosor relativo de dermis y epidermis. Las vías de facilitación de medicamentos estudiadas, *per se*, independientemente de las moléculas que se les asocie, no producen incremento de la cantidad de fibroblastos (demostrables por la expresión de vimentina), lo que sugiere que en ningún caso se estimula el proceso cicatricial. La microperforación es una forma sencilla y mínimamente invasiva de incrementar la absorción de sustancias por vía percutánea. Su efectividad se potencia cuando se asocia a electroiontoporación, logrando concentraciones más elevadas y persistentes en el tiempo de los productos



estudiados. Las técnicas de electroiontoporación y microperforación más electroiontoporación producen cambios en la densidad de melanocitos y células dendríticas, sin que ello suponga, *a priori*, modificaciones a largo plazo ni en la pigmentación ni en el espesor de la dermis.

RESUMEN (en Inglés)

The present study was designed to investigate the use of the skin as a *via* for drug administration (procaine, ketoprophen, biotine y caffeine) using different techniques of cutaneous permeation: intradermic, microneedling, electro-iontoporation, and the association both the two last ones. The model used was the skin of domestic pig (*Sus scrofa*, domestica), and the skin samples were assessed immediately after drug administration, and after 15, 30 and 60 min, 7 and 14 days. The techniques used were: HPLC to establish the cutaneous kinetics of the compounds; structural and ultrastructural (scanning and transmission electron microscopy) techniques, as well as immunohistochemistry (S100 protein, vimentin, type IV collagen) to evaluate the structural, ultrastructural variations, and the density in dendritic cells (melanocytes and Langerhans' cells). Furthermore, the relative epidermis/dermis thickness and the density of dermal papillary capillaries were evaluated. The results demonstrated that molecules with different organoleptic properties can be absorbed throughout the skin and their local actions are more effective before 7 days from the administration. The cutaneous levels of biotine and ketoprophen were reached using the intradermic via; nevertheless, for caffeine and procaine similar tissue concentrations were obtained independently of the used technique. The higher tissue levels in time were obtained when using microneedling, electro-iontoporation, or both associated. Neither cutaneous structural nor relative epidermis/dermis relative thickness changed with the drugs and/or drug administration technique employed. Moreover, the cutaneous permeation methods used do not increase the density of vimentin-positive fibroblasts thus suggesting they do not stimulate the wound process. Microneedling is an easy, reliable and minimally invasive method for delivery drugs through the skin, and its effectiveness is potentiated when associated to electro-iontoporation, being the more effective in reaching higher drug concentration with time. Electro-iontoporation together with microneedling increases the density of melanocytes, but presumably did not alter cutaneous pigmentation or dermis thickness long-term.

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE _____ /

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

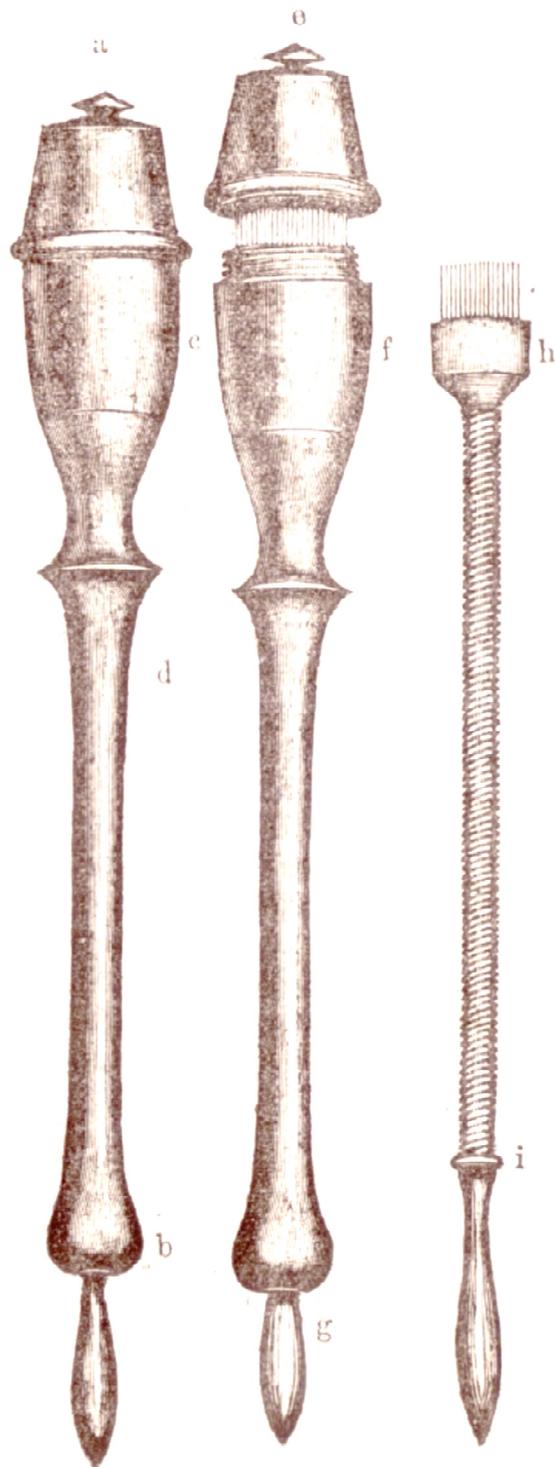
***Cambia tu forma de ver las cosas
y las cosas cambiarán***

Wayne Dyer (1940-2015)

Fig. 1.

Fig. 2.

Fig. 3.



Agradecimientos

A **Mami**, mi abuela, por iniciarme en el poder de las agujas.

A **José Antonio Vega y Miguel del Valle** por dirigirme el trabajo.

A **Teresa Sánchez y Agustín Brea** por el manejo con los animales.

A **Olivia García y Roberto Cabo** por el apoyo inmunohistoquímico.

A **Sergio Cueto** por los estudios de HPLC.

A **Marta Sanchez Pitiot** por las preparaciones histológicas.

A **Ángel M. Nistal y Marta A. Guervós** por el procesado de imágenes.

A **Susana Montes y Tamara Martínez** por el apoyo estadístico.

A **Antonio Gomis** por el empuje bibliográfico.

A mi buen amigo **Joan Carles Font** por la aportación económica.

A mis **pacientes**, que durante 30 años me han permitido aprender.

Gracias, gracias, gracias a todas aquellas personas que en algún momento me han apoyado y que ahora no recuerdo pero jamás olvido.

¡Gracias a la vida, que me ha dado tanto!

¡Gracias, mamá, por mi vida y porque sé que estás orgullosa de mí!

A Chapela y Carmen

... y poniendo en todo ello todo nuestro corazón.

Oviedo, marzo de 2016

Contenido

1. Introducción	4
2. Estado actual.	8
2.1. La piel.....	8
2.1.1. Estructura de la piel.....	8
2.1.2. Vascularización e inervación de la piel.....	17
2.1.3. Estructura de la piel del modelo animal utilizado.....	18
2.2. La piel como vía de administración de fármacos: vías transcutáneas	20
2.3. Moléculas estudiadas	50
3. Objetivos.....	57
4. Material y técnicas.....	59
4.1. Material	59
4.1.1. Animal de experimentación	59
4.1.2. Equipos utilizados	62
4.1.3 Sustancias estudiadas.....	66
4.2. Técnicas de aplicación de los fármacos.....	67
4.2.1. Microagujas	67
4.2.2. Electroporación-iontoforación	68
4.2.3. Inyección intradérmica	69
4.3. Técnicas de estudio de las muestras	70
4.3.1. Técnicas estructurales	70
4.3.2. Técnicas de microscopía electrónica de transmisión y de barrido.	71
4.3.3. Técnica de inmunohistoquímica PAP indirecta.....	72
4.3.4. Análisis morfométrico de la piel en las diferentes condiciones experimentales	73
4.3.4.1. Cálculo del grosor de la piel	73

4.3.5. HPLC (high pression liquid chormatography)	76
5. Resultados.	79
5.1. Estructura y ultraestructura de la piel del dorso del tronco del cerdo	79
5.2. Concentración cutánea de las moléculas estudiadas en función de la técnica empleada y el tiempo transcurrido: HPLC.....	86
5.2.1 Procaína	86
5.2.2. Ketoprofeno.....	87
5.2.3. Biotina.....	89
5.2.4. Cafeína	90
6. Discusión.....	119
6.1. Consideraciones generales	119
6.2. Discusión de los resultados	122
6.2.1. Concentraciones cutáneas de las moléculas.....	122
6.2.2. Las técnicas de permeación cutánea utilizadas no producen cambios en la estructura de la piel.....	126
6.2.3. La técnica de permeación cutánea de electroporación o electroporación asociada a microagujas incrementa la densidad de células dendríticas de la piel	127
6.3. Consecución de los objetivos y limitaciones del trabajo.....	128
6.4. Perspectivas de futuro.....	129
7. Conclusiones.....	132
Anexo 1	135
8. Bibliografía.....	143
9 . Resumen de Currilucum Vitae	158

Introducción

1. Introducción

La piel es el órgano más grande y superficial del cuerpo humano y en condiciones de normalidad funciona como una barrera prácticamente infranqueable al paso de sustancias aplicadas tópicamente sobre ella con o sin finalidad terapéutica. Por ello, para aumentar la permeabilidad cutánea se han propuesto diferentes procedimientos, entre los cuales destacan los agentes permeadores, corrientes eléctricas en iontoforesis o electroporación, formación de microporos empleando matrices de agujas o montadas sobre equipos de mano o parches, ondas de presión generadas por ultrasonidos, radiofrecuencia o ablación térmica por distintos tipos de láseres, etc. Todas estas técnicas buscan incrementar el paso de moléculas, especialmente medicamentos, a través de la piel con la principal finalidad de actuar directamente con dosis menores que cuando se usan otras vías (oral, intramuscular, intravascular, etc.). Así se evita el paso previo por el circuito entero-hepático que metaboliza gran parte de la dosis administrada, lo que conllevaría la utilización de dosis más altas, mayor riesgo de iatrogenia y la aparición de efectos secundarios que, en ocasiones, impiden continuar con el tratamiento e incrementan el coste por el uso concomitante de otros fármacos. Por otro lado, las técnicas de inyección están limitadas por la dificultad para la autoadministración por parte del paciente. Pero a pesar de todo son necesarios estudios experimentales *in vivo* y clínicos para establecer con precisión sus potenciales aplicaciones (Lv y Cols., 2006).

El presente trabajo de Tesis Doctoral explora en un modelo animal la eficacia de tres de estos métodos (microagujas, electro-iontoporación e inyección intradérmica), y la combinación de dos de ellos (microagujas más electro-iontoporación), en la absorción transdérmica de una serie de moléculas (procaína, ketoprofeno, cafeína y biotina).

La evidencia científica acumulada demuestra que la utilidad de la **vía intradérmica** (ID) es incluso superior a la vía intramuscular para conseguir, por ejemplo, una inmunidad eficaz (Kulkarni y Cols., 2013). Desde el invento de la jeringuilla y la aguja en el siglo XVIII, esta vía se viene utilizando para aplicar medicamentos en zonas concretas lo más cerca posible al lugar donde radica la patología (p.ej. una inflamación, un dolor local).

Así, diversos autores la han utilizado para administrar anestésicos tópicos buscando el incremento de la permeabilidad cutánea para obtener anestesia local eficaz con menos cantidad de medicamento disminuyendo su potencial tóxico (Shipton, 2012), aunque no se ha determinado la cantidad óptima de medicamento ni el tiempo de duración de sus efectos.

La **electroporación** (EP), por su lado, genera pequeños micro-orificios nanométricos en el estrato córneo cutáneo que permiten el paso de sustancias aplicadas bajo un campo eléctrico, condicionado por factores como el tamaño de la propia molécula que se pretende introducir a través de ellos o su carga eléctrica (Prausnitz y Cols., 2004).

La **electroforesis** (EF), por su parte, se sirve del principio de repulsión de cargas del mismo signo para conseguir que el paso de una sustancia con carga eléctrica pueda atravesar el estrato córneo.

Por último, la utilización de **microagujas** en la zona cutánea previamente a la aplicación de la electroporación o la electroforación parece ser una técnica útil para potenciar aún más la capacidad de absorción transcutánea de sustancias activas sin ocasionar ningún tipo de dolor o con mínimas molestias (Prausnitz, 2004).

Este estudio tiene como finalidad demostrar que la piel puede utilizarse como una vía eficaz de administración de medicamentos cuando se incrementa su permeabilidad utilizando sistemas permeadores como la EP o la formación de microporos (*microneedling*, MN). Además, se pretende confirmar que la vía ID posee una farmacocinética propia que incrementa la actividad terapéutica de los medicamentos al evitar el paso por el circuito entero-hepático (Kaplan, Coutris, 1989; Corbel, 1986); ello determina que las dosis necesarias de algunos medicamentos tengan que reducirse al ser administradas por la vía intradérmica o mediante electroporación disminuyendo también sus posibles efectos colaterales o secundarios.

El modelo animal utilizado, la piel de *Sus scrofa, domestica*, está ampliamente validado aunque este trabajo analiza por primera vez las características ultraestructurales de la zona cutánea sobre la que se han realizado los experimentos.

Estado actual

2. Estado actual.

2.1. La piel

2.1.1. Estructura de la piel

La piel es un órgano complejo que recubre la totalidad de la superficie corporal y se continúa con las mucosas a nivel de los orificios del cuerpo. Se estima que representa el 15% del peso del cuerpo adulto y es el mayor órgano del cuerpo. Está estructurada en tres capas: epidermis y estructuras relacionadas, dermis (separada de la epidermis por la unión dermo-epidérmica) e hipodermis, pero varía según las regiones en cuanto al grosor, la densidad de melanocitos o la presencia de folículos pilosos (piel velluda versus piel glabra). Desde un punto de vista embrionario la epidermis y apéndices cutáneos tienen origen ectodérmico mientras que la dermis se origina del mesodermo (Murphy, 1997; Cribier, Grosshans, 2002; Kanitakis, 2002; Kanitakis, 1998).

2.1.1.1 Epidermis y estructuras asociadas

Es un epitelio estratificado que se renueva continuamente y está formado por varios tipos de células, con predominio de los queratinocitos (90-95%) que sufren un proceso específico de diferenciación que lleva a la producción de células aplanadas y anucleadas que terminan separándose de la superficie cutánea. Además de los queratinocitos la epidermis contiene células de Langerhans, melanocitos y células de Merkel.

Citoarquitectónicamente, en la mayoría de los vertebrados, las células de la epidermis se disponen en capas continuas que de profundidad a superficie forman los estratos basal (una capa), espinoso (5-10 capas; subdividido en *stratum compactum* y *stratum disjunctum*), granular y cornificado; entre estos dos últimos en alguna regiones se interpone el *stratum lucidum*). (Figura 2-1).

La epidermis contiene, además, dos unidades estructurales diferenciadas: las partes superficiales de las glándulas sudoríparas ecrinas (acrosyringium) y de los folículos pilosos (acrotrichium), que aunque son también células epiteliales tienen propiedades biológicas propias en cuanto a su renovación y diferenciación.

Los **queratinocitos epidérmicos** proceden de divisiones mitóticas de células troncales situadas en la capa basal que emigran a través de la epidermis a la vez que experimentan transformaciones morfológicas y bioquímicas (queratinización) y se desprenden a los 30 días, aproximadamente.

La morfología de los queratinocitos varía de unos estratos epidérmicos a otros. Los de la capa basal son columnares o cúbicos, con citoplasma basófilo y un núcleo relativamente grande. Se disponen de forma perpendicular a la membrana basal a la que se unen mediante hemidesmosomas. Contienen melanosomas, fascículos de tonofilamentos y de filamentos intermedios (tonofibrillas) formados por polipéptidos de queratina. Estos se adhieren a las placas de unión de los hemidesmosomas y contribuyen a la formación del citoesqueleto. Los queratinocitos basales se pegan en a las células adyacentes mediante una serie de uniones intercelulares (de tipo gap y adherens) de las que las más características son los desmosomas. Dadas sus propiedades proliferativas expresan antígenos de proliferación celular (Ki67 y PCNA).

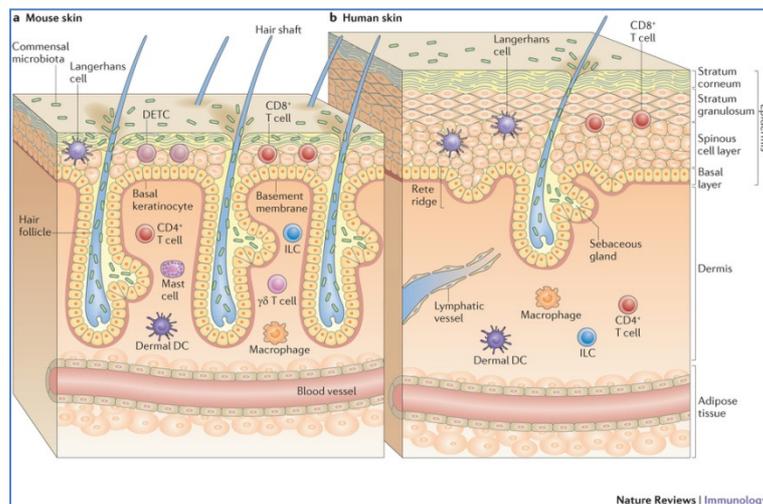


Figura 2-1.- Estructura de la piel humana y de ratón, en la que se observa la diferencia en la disposición de los espacios interfoliculares. Tomada de M. Pasparakis, I. Haase y F. O. Nestle (2014).

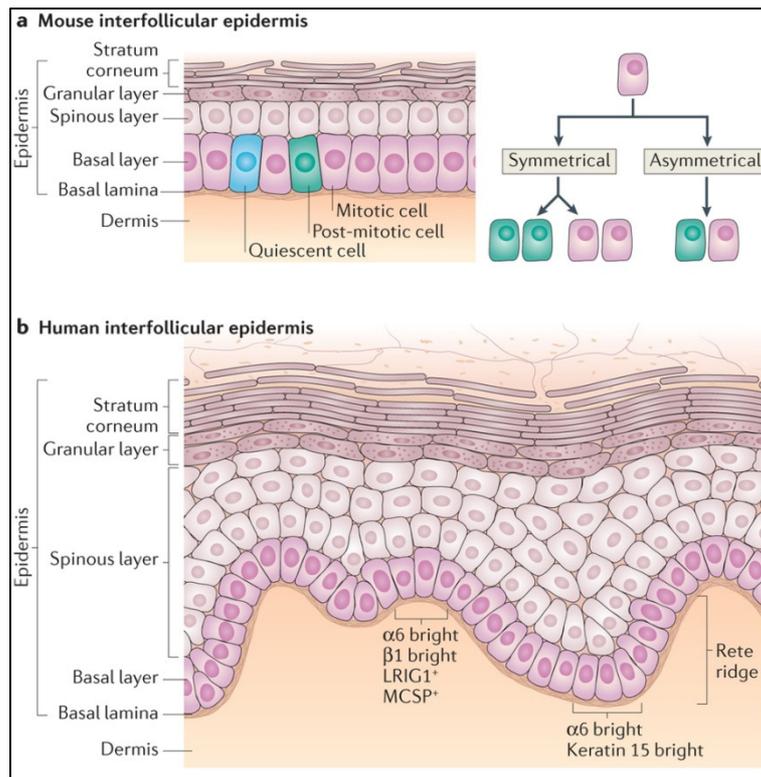


Figura 2-2.- Estructura de epidermis. Tomada de G. Solanas y S. Aznar-Benitah (2013).

En cuanto a los queratinocitos del estrato espinoso, se caracterizan por un citoplasma eosinofílico, un núcleo vesicular y uno o dos nucléolos evidentes, y contienen abundantes tonofilamentos. Por su lado, las células del estrato granular son aplanadas, se disponen paralelas a la superficie y presentan gránulos de queratohialina, altamente basófilos, formados por el ensamblaje de proteínas ricas en histidina (sobre todo profilagrina) y queratina. Además, los queratinocitos de estas dos últimas capas pueden contener cuerpos lamelares (conocidos como queratosomas o cuerpos de Odland) que están implicados en los procesos de descamación y en la formación de la capa lipídica pericelular que actúa como barrera de penetración contra sustancias extrañas hidrofílicas. Finalmente, el estrato córneo está constituido por corneocitos, muy aplanados, eosinofílicos, que se desprenden de la superficie cutánea. Carecen de núcleo y de organelas citoplasmáticas y están formados por una densa matriz de filamentos de queratina y una cubierta cornea por debajo de la membrana celular formada por involucrina, loricrina, SPRRs, elafina y cristatina A.

El citoesqueleto de los queratinocitos está formado por queratinas, proteínas fibrosas de la familia de los filamentos intermedios y de las que se han caracterizado al menos

20 tipos diferentes. Cada tipo de queratinocito expresa una citoqueratina con peso molecular diferente: los basales queratinas K5 y K14/K15, los suprabasales queratinas K1 y K10, y los de la capa granular K2e y K11 (Ishida-Yamamoto y Iizuka, 1998).

Por lo que se refiere a las **células de Langerhans**, se trata de elementos móviles, de morfología dendrítica, presentadoras de antígenos y presentes en todas las capas de la epidermis. Se originan de células precursoras hematopoyéticas CD34+ de la médula ósea. Representan aproximadamente el 3-6% de todas las células epidérmicas y se las considera inmaduras hasta que entran en contacto con el antígeno (Girolomoni y Cols., 2002). Tienen un soma de morfología redondeada con expansiones dendríticas que se expanden entre las células adyacentes a las que se adhieren mediante moléculas de E-cadherina. Carecen de tonofilamentos y melanosomas y muestran un núcleo indentado, pero contienen un marcador citoplasmático específico, el gránulo de Birbeck originado a partir de la membrana celular mediante un proceso de endocitosis. Tiene forma de disco de estructura interna trilaminar. Las células de Langerhans pueden ser identificadas por la expresión de algunos antígenos como CD1a, CD207/langerina (Valladeau y Cols., 1999), Lag (Fujita y Cols., 1990) o proteína S100 y la vimentina (Kanitakis, 1998).

Los **melanocitos** proceden de la cresta neural, migran a la epidermis y son los responsables de la producción de melanina. Se localizan a nivel de la capa basal y sus distribución varía mucho dependiendo de la región. Sus citoplasmas contienen melanosomas y pocos filamentos intermedios de vimentina (Kanitakis, 1998).

Las **células de Merkel** comparten propiedades neuroendocrinas y epiteliales, y su origen aun es controvertido, aunque los estudios de los últimos años abogan por una filiación epitelial (Maksimovic y Cols., 2014; Xiao y Cols., 2014). Se sitúan en la capa basa de la epidermis y en la capa epitelial de los folículos pilosos, con amplias variaciones regionales. Son fáciles de diferenciar por la presencia de gránulos neurosecretorios en el citoplasma. Ocasionalmente su membrana presenta desmosomas para unirse a los queratinocitos adyacentes. Mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha observado que las células de Merkel expresan K20, enolasa

neuronal específica, cromogranina, sinaptofisina, N-CAM, proteína PGP 9.5 y diferentes polipéptidos relacionados con la neurotransmisión.

Además de todos estos tipos celulares en la epidermis se encuentran linfocitos, sobre todo T-memoria (CD3+, CD4+ CD8- CD45RO+, Fas+, aeb7 integrina) en proporciones muy bajas y variables (Spetz y Cols., 1996).

Los apéndices epidérmicos los forman las uñas, las glándulas sudoríparas y los folículos pilosos.

Las **uñas** cubren la cara dorsal de la falange distal de los dedos de la mano y el pie. Están formadas por la raíz, la placa ungueal y el borde libre, que cubre el *hyponychium*, una epidermis engrosada. Se apoya sobre el lecho ungueal, un tejido conecto ricamente vascularizado que contiene numerosas desviaciones arteriovenosas. La parte proximal del lecho ungueal se continua con la matriz ungueal, responsable del crecimiento de uñas.

Las **glándulas sudoríparas** son glándulas exocrinas tubulares formadas por acinos y conductos excretores y que son de dos tipos principales: eccrinas y apoccrinas. Las glándulas sudoríparas eccrinas desempeñan un papel esencial en la termorregulación y están presentes en toda la piel, con densidades máximas en la palma de las manos, planta de los pies y piel de la axila. Están formadas por acinos de células secretoras que liberan su secreción a los canalículos intercelulares. Las células secretoras están rodeadas por una capa discontinua de células mioepiteliales. Los conductos excretores, por su lado, penetran en la epidermis (*acrosyringium*) y se abren a la superficie por el poro (Nanitalis y Cols., 1987). Las glándulas sudoríparas apoccrinas, por su lado, se encuentran asociadas a los folículos pilosos. En la piel humana se localizan en la axila, región anogenital y pezón. Tienen una porción secretora en la dermis profunda, formada por células columnares, rodeada de células mioepiteliales y muestran las características propias de epitelio apocrino (secreción por decapitación). Las células que forman las glándulas sudoríparas expresan antígenos específicos que consienten su identificación inmunohistoquímica. Son el antígeno carcinoembrionario,

el antígeno epitelial de membrana, K8, K18 y K19, una subpoblación de los conductos de las glándulas eccrinas son proteína S100 positivas, y las células mioepiteliales K17.

En cuanto a los **folículos pilosebáceos** (Figura 2-3) se extienden entre la epidermis y la hipodermis. Se distribuyen por toda la piel, excepto por la piel glabra, y su tamaño y morfología son variables (terminal, vellus, lanugo pelo intermedio). Su crecimiento es cíclico por medio de tres etapas (anagen, catagen, telogen). Cada folículo está formado por varios segmentos: la porción intraepidérmica (acrotrichium), el infundíbulo, el istmo y el bulbo (responsable del crecimiento del pelo con melanocitos que determinan su pigmentación). Los folículos pilosos están muy vascularizados e inervados. Tanto el *acrotrichium* como el *infundibulum* sufren diferenciación de tipo epidérmico y su morfología varía poco con el tiempo; por el contrario las estructuras más profundas sufren amplias modificaciones con el ciclo capilar. Esta parte consta de una cubierta epitelial formada por varias láminas concéntricas: la membrana radicular externa (o *trichilemma*), la membrana radicular interna (constituída por tres capas concéntricas: Henle, Huxley y cutícula). El canal piloso contiene el eje del pelo, producto de la queratinización terminal del folículo piloso. En los cortes transversales del pelo se observa que está formado por tres capas concéntricas: la cutícula, la corteza (formando la mayor parte del eje del pelo) y la médula (presente sólo en pelo terminal).

Las **glándula sebáceas** son glándulas holocrinas multilobuladas asociadas a los folículos pilosos, situadas en el espacio delimitado entre superficie de la piel, el músculo erector del pelo y el propio folículo piloso. Están formadas por una capa externa de células basales y de diferentes capas de células maduras que contienen gran cantidad de lípidos en su citoplasma (sebocitos). Estas se desintegran en la parte central de la glándula para formar el sebo, la secreción, que termina en el conducto pilífero por medio de un corto conducto. Los sebocitos basales expresan citoqueratinas y antígeno epitelial de membrana.

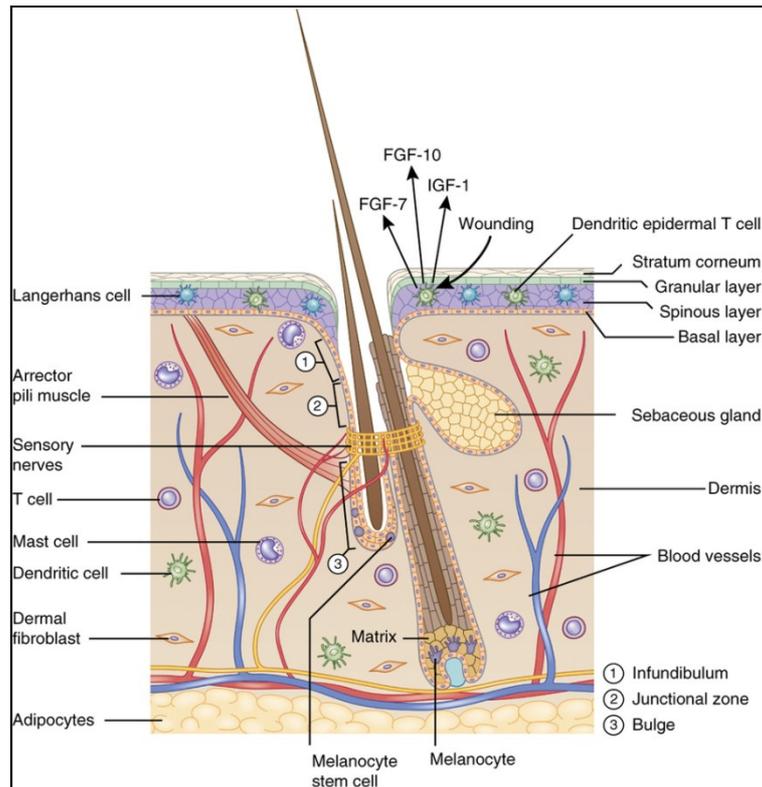


Figura 2-3.- Esquema de la estructura de un folículo piloso. Tomado de Hsu Y-C, L. Li y E. Fuchs.

En la transición entre las capas superficial y media de la piel se encuentra la **unión dermo-epidérmica**. Es un complejo de membrana basal secretado por los queratinocitos basales y los fibroblastos de la dermis, que desempeña un papel esencial como apoyo mecánico y regula el intercambio de productos metabólicos entre dermis y epidermis. Es, además, la que sirve de soporte a los queratinocitos durante el proceso de emigración en la curación de las heridas y la atraviesan distintos tipos celulares (células de Langerhans, linfocitos) durante los procesos inflamatorios. Está constituida por varias capas que de superficie a profundidad son: la membrana celular de los queratinocitos basales y sus hemidesmosomas a los que se enganchan los filamentos del citoesqueleto (queratina y plectina), la lámina lucida, la lámina osmofílica densa y la zona filamentosa situada por debajo de membrana basal. La composición antigénica de la unión dermo-epidérmica es muy compleja habiéndose caracterizado en ella más de veinte moléculas como las plaquinas, plectina, BPAG1, diferentes formas de lamininas, colágeno IV, ancorina, etc...

2.1.1.2. La dermis o corion.

Es un tejido conectivo de soporte que protege la epidermis y sus anexos, y los plexos vascular y nervioso que se encuentran dentro de ella. Está formada por células, proteínas fibrosas y sustancia amorfa. Se encuentra en un proceso de renovación permanente regulado por mecanismos que controlan la síntesis y degradación de sus componentes proteicos. El espesor de la dermis varía según su localización y su estructura también es diferente en relación a la profundidad, diferenciándose una parte superficial o dermis papilar y otra profunda o reticular.

La **dermis papilar** forma proyecciones entre la red de crestas epidérmicas denominada papilas dérmicas. Contiene fibroblastos dendrocitos dérmicos y mastocitos, además de vasos y nervios. Su matriz extracelular está formada por fibras de colágeno poco compactas y fibras elásticas finas. En la **dermis reticular** los haces de fibras de colágenos son más gruesos y compactos, así como la red de fibras elásticas; en ella asientan las partes más profundas de los anexos epidérmicos y los plexos nervioso y vascular profundos.

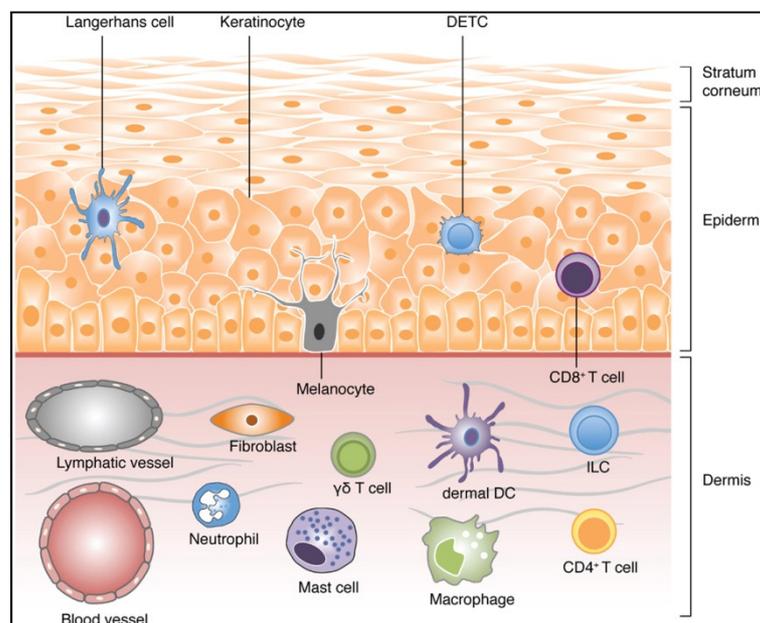


Figura 2-4.- Representación esquemática de los diferentes tipos de células presentes en la piel.
Tomado de S.Z. Chong, M. Evrard y L.G. Ng (2013).

Las células principales de la dermis (Figura 2-4) son los fibroblastos, capaces de sintetizar todos los componentes, fibrilares y no fibrilares, de la matriz extracelular. Tienen formas fusiformes o estrelladas y pueden ser reconocidos por antígenos propios de las células mesenquimales como la vimentina (Saalbach y Cols., 1996). Existen también variaciones morfofuncionales de los fibroblastos como los fibrocitos, fibroclastos y miofibroblastos.

La dermis contiene también dendrocitos dérmicos que representan una población heterogénea de células dendríticas mesenquimales. En la piel humana se distinguen al menos dos subtipos de estas células: las de tipo I que expresan el factor XIIIa de coagulación y se localizan alrededor de los capilares de las papilas dérmicas y en los septos de tejido conectivo de la hipodermis, y los de tipo II situados en la dermis media y profunda alrededor las glándula ecrinas y los folículos pilosos.

Finalmente, la dermis posee una población residente de mastocitos, células mononucleares de origen medular distribuidas por la dermis perivascular y perianexal. Es posible que todos estos tipos celulares dérmicos deriven de precursores comunes y adquieran propiedades específicas y heterogenicidad morfológica dependiendo de su localización y función (Driskell y Watt, 2015).

La gran mayoría de las fibras de la dermis están formadas por colágeno (en torno al 90-95%) de los tipos I y III, responsables de la resistencia mecánica de la piel; las fibras elásticas, por su parte, son las responsables de las propiedades retráctiles de la piel. La denominada sustancia amorfa está formada por macromoléculas de proteoglicanos (ácido hialurónico, dermatan sulfato, condroitín sulfato, fibronectina, tenascina, epimorfina) que interaccionan tanto con las células como los elementos fibrilares de la matriz extracelular.

2.1.1.3 Hipodermis

Está constituida por un tejido graso y representa la parte más profunda de la piel y la separa de las aponeurosis o del periostio. Desempeña un papel importante en la termorregulación y en la protección contra agresiones mecánicas. Las células de la

hipodermis son adipocitos, organizados en lóbulos primarios y secundarios, con acúmulos de grandes cantidades de lípidos en su citoplasma. Por fuera de ellos expresan vimentina y proteína S100 (Kanitakis, 1998). Los grupos de adipocitos están separados entre ellos por tabiques de tejido conectivo (que contienen fibroblastos y mastocitos), las glándulas sudoríparas, vasos y nervios.

2.1.2. Vascularización e inervación de la piel

Salvo la epidermis, que es avascular, la piel posee una rica red vascular que excede con mucho los requerimientos nutricionales, implicada en la termorregulación, reparación tisular tras las heridas, las reacciones inmunológicas y el control de la presión sanguínea. Son vasos arteriales, venosos y linfáticos dispuestos en dos plexos comunicados entre ellos. El plexo profundo se sitúa en las proximidades de la unión dermo-hipodérmica y proporciona vascularización a glándulas sudoríparas y folículos capilares. El plexo superficial discurre en la interfase entre la dermis papilar y reticular y da a cada papilla dérmica un asa ascendente vertical formada por una arteriola precapilar, capilares arteriales y venosos y una vénula postcapilar (Braverman, 2000). Arteriolas y vénulas comunican entre ellas por *shunts* arteriovenosos, los cuerpos glómicos neuromioarteriales que funcionan como estructuras esfintéricas. Las arterias dérmicas y las arteriolas están formadas por tres capas: la íntima, constituida por células endoteliales apoyadas sobre una lámina elástica interna, la media, formada por dos capas de células musculares lisas, y la adventicia de tejido conectivo que ocasionalmente tiene una lámina elástica externa. Las venas y vénulas tienen una estructura similar si bien la capa muscular es más fina y ocasionalmente poseen válvulas.

Las arteriolas y vénulas de la dermis profunda son mayores que las del plexo superficial. Los capilares dérmicos están formados por células endoteliales fenestradas y una capa discontinua de pericitos, rodeados por una membrana basal simple. Las vénulas postcapilares tienen una estructura similar pero tiene un calibre ligeramente mayor, están rodeados por más del pericitos y su membrana basal consta de varias capas. Las células del endotelio capilar expresan vimentina, factor Willebrand, CD34,

CD31; las células de la capa media también son vimentina positivas y las membranas basales capilares son inmunorreactivas para el colágeno IV y la laminina.

La piel posee una rica y compleja inervación, tanto aferente como eferente vegetativa. Normalmente los nervios se disponen en un plexo superficial y otro profundo y las fibras que los constituyen pueden ponerse de manifiesto mediante marcadores axónicos (neurofilamentos, enolasa neuronal específicas, periferina, proteína PGP 9.5), de las células de Schwann (proteína S100 y vimentina) y los fibroblastos perineurales (antígeno epitelial de membrana y vimentina). Los diferentes morfotipos de mecanorreceptores vinculados a los plexos comparten con las fibras nerviosas sus características inmunohistoquímicas.

2.1.3. Estructura de la piel del modelo animal utilizado

Los estudios realizados *in vivo* en distintos modelos animales sobre la permeabilidad cutánea han puesto de manifiesto que la piel de cerdo es comparable, en la mayoría de sus aspectos, a la piel humana (Bartek y Cols., 1972; Godin y Touitou, 2007), coincidencias que han sido descritas también a niveles histológico e inmunohistoquímico.

La piel de cerdo, como modelo y sustituto de la piel humana para la realización de determinados tipos de estudios (de farmacología, trasplantes y análisis de los procesos biológicos que intervienen en la curación de las heridas), se viene utilizando desde hace tiempo con notables ventajas sobre la piel de animales más pequeños, especialmente de roedores.

Tanto la piel humana como la suina están formadas por tres estratos (epidermis, dermis e hipodermis) y presentan notables similitudes estructurales, ultraestructurales e inmunohistoquímicas entre ellas (Mawafy y Cassens, 1975; Meyer y Cols., 1978; Wollina y Cols., 1992; Liu y Cols., 2010; Debeer y Cols., 2013). Además, los tiempos de renovación completa de ambas son parecidos: 30 días en el cerdo y 27-28 días en humanos (Weinstein, 1965).

No obstante, algunos autores han puesto en entredicho que los resultados obtenidos en investigaciones sobre piel del cerdo común puedan ser extrapolados a humanos debidos a las grandes diferencias interindividuales que existen por la gran variedad de razas existentes y el *background* genético complejo. Este problema se puede obviar con la utilización de cerdos enanos, entre los que los de la raza Bama se consideran los ideales, los cuales ya han sido utilizados satisfactoriamente en estudios de liberación de fármacos y toxicología dérmica y de reparación tisular (Ferri y Cols., 1995; Qvist y Cols., 2000; Sullivan y Cols., 2001). Los trabajos de Liu y Cols. (2008, 2010) sobre esta raza de animales han puesto de relieve que el grosor de su piel no es muy diferente del de la piel humana y que morfológicamente son muy semejantes. Estructuralmente ambas tienen 5 estratos epidérmicos bien diferenciados (córneo, lucido, granuloso, esponjoso y basal), la dermis se diferencia en una porción papilar y otra reticular, y la unión dermo-epidérmica es irregular. Además, el desarrollo del sistema vascular superficial (plexos venosos y arteriales) y la composición de la matriz extracelular son bastante parecidos. Por otro lado, las densidades y características de los fibroblastos, células de Langerhans y mastocitos son semejantes a las halladas en la piel humana. No obstante, observaron diferencias notables en cuanto al espesor edad-dependiente de la piel, el número de células pigmentadas y de fibras elásticas (menor en la piel suina), y sobre todo en los tipos de glándulas: mientras que la piel del cerdo sólo tiene glándulas apocrinas, las de la piel humana son eccrinas, y las glándulas sebáceas son más pequeñas en el cerdo que en el hombre. A nivel ultraestructural observaron que los queratinocitos presentan haces de filamentos de citoqueratina, uniones intercelulares de tipo desmosoma, gránulos de adhesión a la membrana y de queratohialinos en el estrato cornificado. Al analizar el perfil inmunohistoquímico obtuvieron marcaje para colágenos I, III y IV, queratinas, laminina, fibronectina y filagrina con patrones muy semejantes en la piel humana y la suina; pero CD34, ICAM1, y S100, que marcan poblaciones específicas en la piel humana no se detectaron en la piel del cerdo Bama.

Pero dado el elevado coste de estos animales y que cada vez aumenta más la utilización del modelo de piel porcina en experimentos translacionales a humanos recientemente han aparecido algunos estudios que analizan la piel de razas de cerdos

comunes. Así, Debeer y Cols. (2013) estudiaron la distribución de la inmunorreacción para 93 antígenos, utilizando anticuerpos mono y policlonales, en la piel de cerdos domésticos híbridos Seghers, cuando pesaban entre 20 y 30 kg. Estos autores encontraron que muchos anticuerpos tienen un patrón de inmunomarcaje parecido en ambas especies, mientras otros que normalmente se utilizan en la detección de antígenos humanos no son reactivos en el cerdo. De los antígenos investigados en nuestro trabajo resultaron de utilidad la vimentina y el colágeno IV, mientras que no fue efectiva la proteína S100 para la demostración de las células dendríticas.

2.2. La piel como vía de administración de fármacos: vías transcutáneas

Como ya se expuso en párrafos anteriores la piel es el mayor órgano del cuerpo humano y tiene una superficie de unos 2 metros cuadrados (Godin y Touitou, 2007). Desempeña una función protectora frente a las agresiones físicas, químicas o biológicas del entorno. Pero también es una fuente muy importante de estímulos sensoriales externos que contribuyen a la “socialización” de la especie humana. Por otro lado, es fácilmente accesible y ha sido utilizada desde tiempos inmemoriales para la aplicación de remedios terapéuticos de forma tópica mediante diferentes presentaciones galénicas (cremas, pomadas, ungüentos, linimentos, emplastes, etc.) que se adaptan, en mayor o menor medida, al principio activo del que se busca su acción. Su capacidad de barrera depende básicamente de su estructura histológica (ver epígrafe anterior).

El hecho de que ciertos venenos sean letales cuando se administran por vía oral pero no cuando se aplican sobre la piel intacta llevó a la creencia de su impermeabilidad absoluta a cualquier tipo de sustancia que se aplique sobre ella. Sin embargo, ahora se conoce que posee cierto grado de permeabilidad. Diversos autores han estudiado desde principios del siglo XX las circunstancias que determinan el paso transdérmico de sustancias, lo que ha llevado al desarrollo de parches de principios activos como la escopolamina, la nitroglicerina o la nicotina, asegurando una dosificación precisa y la

ausencia de fenómenos irritativos en la zona cutánea donde se aplican (Langer R 2004).

Actualmente, pues, se considera que la piel es una membrana con permeabilidad selectiva para elementos químicos, que ofrece potenciales ventajas respecto a otras vías más utilizadas como son evitar el primer paso metabólico hepático, no estar sometida a restricciones asociadas a la vía oral, ser de fácil utilización y simplificar el seguimiento de los tratamientos por parte de los pacientes. Sin embargo, solamente drogas lipofílicas potentes y de pequeño tamaño logran alcanzar niveles terapéuticos al ser administradas por difusión pasiva a través de la capa córnea (Naik y Cols., 2000). No obstante, la permeación cutánea a moléculas es un fenómeno multifactorial en el que intervienen factores químicos, físicos y biológicos y es prácticamente imposible desarrollar modelos matemáticos que puedan predecir la cantidad absorbida de medicamento (Godin y Touitou, 2007). Higuchi ideó la relación para determinar la velocidad de penetración de un medicamento a través de la piel:

$$V = \frac{P \times D \times S \times C}{h}$$

donde D es el coeficiente de difusión del fármaco en la zona barrera, C es la concentración del medicamento, P el coeficiente de reparto del medicamento entre el vehículo y la piel sobre la que se aplica, S la superficie total de la zona de aplicación y h el espesor medio de la piel en esa zona.

Aparte de los factores específicos de las moléculas, la propia piel condiciona la permeabilidad. Además de factores individuales como son la edad, sexo y la zona anatómica, los principales determinantes biológicos a tener en cuenta en la velocidad de penetración son el estado de la piel y el grado de hidratación de la misma. Es un hecho bien conocido que sobre la piel descamada la penetración de fármacos es mucho más rápida por la ausencia o escasez de capa córnea. Por lo que respecta a la hidratación, aunque depende de factores intrínsecos, puede mejorarse por la aplicación de humectantes, que son compuestos capaces de penetrar en el estrato córneo en solución acuosa y aportar agua endógena a la queratina, consiguiendo una ligera hidratación durante un tiempo limitado.

Las propiedades físico-químicas de las moléculas también deben de ser tenidas en consideración; unas dependen de los fármacos y otras de los excipientes. Entre ellas, están las siguientes:

peso molecular: el tamaño de un fármaco condiciona su difusión en el estrato córneo y en la dermis. Viene definido por el coeficiente de difusión D de la fórmula de Higuchi, que es sensiblemente proporcional a la inversa del peso molecular radicado $1/\sqrt{M}$;

lipofilia o coeficiente de reparto: es el factor de penetración más importante en el estrato córneo, pero no en la dermis, debido a las diferencias existentes entre las dos capas de la piel: la epidermis es un sustrato altamente lipófilo muy rico en lípidos, incluso cuando está hidratada, mientras que la dermis es un parénquima fundamentalmente hidrófilo y no representa ninguna barrera para la difusión de ningún fármaco. La permeabilidad en el estrato córneo aumenta con la lipofilia, pero en la dermis la permeabilidad es superior para los compuestos con lipofilia baja y tiende a estabilizarse a medida que la lipofilia aumenta;

excipientes: el vehículo o excipiente no es un mero soporte del fármaco, si no un sistema de cesión del mismo que lo dirige hacia su biofase o lugar de acción. Por tanto, el vehículo es una parte fundamental de la medicación: es el encargado de llevar el fármaco al lugar adecuado, hacerlo a la velocidad correcta y en las condiciones óptimas para su actuación. La afinidad relativa del fármaco entre el excipiente y los correspondientes tejidos o biofases (coeficiente de reparto) debe balancearse adecuadamente para alcanzar el objetivo propuesto. El excipiente actúa como un depósito con el fin de liberar continuamente el fármaco y así prolongar la duración del efecto; y,

capacidad de penetración: en general, los vehículos habituales no son capaces de penetrar por sí mismos en el estrato córneo; lo que hacen es ceder el fármaco que transportan a la superficie de la piel y, una vez disuelto éste, su penetración dependerá del coeficiente de reparto estrato córneo/agua superficial.

El éxito de un sistema terapéutico transdérmico depende de la capacidad de la sustancia para difundirse a través de la piel en cantidades suficientes para lograr el

efecto terapéutico deseado. Existen diferentes opciones para aumentar la permeabilidad cutánea, ya sea de tipo químico como de tipo físico.

Entre las opciones químicas se encuentran los denominados genéricamente **agentes permeadores**, compuestos capaces de penetrar la piel disminuyen su resistencia difusional y facilitar el transportar a las capas más internas donde interesa que actúe la molécula aplicada.

Estos coayuvantes de la permeación tienen varios mecanismos de actuación (Thong y Cols., 2007): incrementando la fluidez de los lípidos del estrato córneo, reduciendo la resistencia a la difusión, aumentando la actividad termodinámica, aumentando el coeficiente de reparto del compuesto para el estrato córneo, o extrayendo los lípidos intercelulares aumentando el espacio entre las células cornificadas y el paso percutáneo de sustancias polares.

Otros, son agentes promotores de la permeación para moléculas lipofílicas, denominados **disolventes**, como son los terpenoides, el d-limoneno, el miristato de isopropilo y el laurocapram, entre otros. Se plantea que estos promotores localizados en el estrato córneo retienen los principios activos lipofílicos en los tejidos. Otros lo son para moléculas ionizadas, caso de las **sustancias superficialmente activas** o **tensioactivos**, que actúan con el soluto, la membrana o con ambos, e influyen de esta forma en la permeabilidad de un soluto a través de membranas biológicas; el ejemplo más típico es el cloruro de benzalconio. La interacción de estas sustancias con el estrato córneo parece estar determinada por la hidrofilia de la sustancia superficialmente activa. La mayoría de los surfactantes hidrofílicos interactúan de forma muy marcada con la queratina y alteran el transporte de moléculas polares; sin embargo, los surfactantes hidrofóbicos interactúan débilmente con la queratina y no favorecen a las moléculas polares.

Algunos de estos agentes permeadores pueden ocasionar irritación por su naturaleza oclusiva, que lleva a la acumulación de sudor y al incremento del crecimiento microbiano.

Entre las manipulaciones físicas útiles para promover la permeación de principios activos, se encuentran la **sonoforesis** y la **iontoforesis**. En la primera, los ultrasonidos causan cambios estructurales en el estrato córneo y pueden inducir el transporte por convección a través de los folículos pilosos y los conductos sudoríparos de la piel. En la segunda, se potencia y controla la permeación de productos activos iónicos mediante tres mecanismos que son: la electrorrepulsión, la electroósmosis y la perturbación física de la barrera que ofrece la piel al paso de la corriente.

Se ha demostrado recientemente que las capas epidérmicas vivas, de un espesor de 50 a 1500 μm y avasculares, también contribuyen a limitar la permeabilidad cutánea (Andrews y Cols., 2013). En base a su composición química rica en ceramidas (50%), colesterol (25%) y otros ácidos grasos libres en menores proporciones, el estrato córneo cutáneo constituye una barrera lipofílica y un límite para la absorción transcutánea de medicamentos que permite la difusión pasiva de pequeñas moléculas lipofílicas. También impide la salida excesiva de agua desde el interior del cuerpo. Por su parte, la queratina dificulta el paso de todo tipo de moléculas, tanto hidro como liposolubles, y la sustancia intercelular formada por lípidos hidrófobos es impermeable a las sustancias hidrofílicas. El paso transdérmico pasivo de una sustancia está limitado por: una solubilidad acuosa mayor de 1 mg por ml, un peso molecular menor de 500 Da, un punto de fusión menor de 200° C, un pH entre 5 y 9 y una lipofilia relativamente alta, pero no excesiva, para que no quede retenida entre las capas del estrato córneo (Denet y Cols., 2004; Bos y Meinardi, 2000).

Situada por debajo de la epidermis, la dermis, con un espesor variable entre 0,3 y 3 mm, está ricamente vascularizada (Becker, 2012). Cuando se produce una agresión, los queratinocitos vivos son capaces de segregar citoquinas y quimiocinas que reclutan células dendríticas y estimulan la función inmunitaria. Simultáneamente se inicia el proceso cicatricial por migración de queratinocitos a la zona agredida (Schoellhammer y Cols., 2014).

Como se apuntó en la Introducción, la vía transdérmica es una vía alternativa potencial a la administración oral o inyectiva de fármacos (Prausnitz y Langer, 2008) con

notables ventajas sobre ellas, sobre todo por evitar el primer paso metabólico (asociado a la administración oral, y la ausencia de dolor (asociado a técnicas inyectivas; Schoellhammer y Cols., 2014). Eludir la epidermis y llegar directamente a la dermis, permite utilizar sustancias con pesos moleculares mayores de 500 dalton (Al-Qallaf y Cols., 2007). Sin embargo, no todos los métodos de permeabilización de la epidermis son apropiados para todas las aplicaciones. Es necesario un conocimiento detallado de cada uno de ellos y de las características físicas y químicas de los principios activos a utilizar para garantizar la integridad de la piel (Liu y Cols., 2014).

Como el paso transdérmico está muy limitado, se han ideado diversas estrategias para contrarrestar, en la medida de lo posible, su función de barrera (Tuan-Mahmood y Cols., 2013). En la tabla 2-1 se recogen las más importantes y utilizadas. Las que aparecen en la mitad derecha de la tabla en negrita son las empleadas en el presente estudio.

Tabla 2-1. Estrategias para vencer la función de barrera del estrato córneo (modificado de Tuan-Mahmood y Cols., 2013)	
Optimizando la formulación	Uso de agentes permeadores. Uso de fórmulas galénicas encapsuladas tipo lipo o nanosomas. Uso de parches transdérmicos.
Alterando la función de barrera del estrato córneo	Microperforación. Iontoforesis. Electroporación. Inyección intradérmica. Sonoforesis. Ondas de presión.
Removiendo el estrato córneo	Ablación: radiofrecuencia, láser, térmica... Microdermoabrasión. Agentes exfoliantes.

La electro-ionto-poración (EP) es un método físico usado para incrementar de forma controlada la permeabilidad de las membranas celulares permitiendo el paso al citoplasma celular de moléculas extracelulares de un tamaño determinado que, en condiciones homeostásicas, no podrían pasar. Junto con la técnica de perforación con microagujas (microneedling, MN) forman parte de lo que se ha dado en llamar **“sistemas transdérmicos de tercera generación”** (Prausnitz y Langer, 2008) que aumentan la permeabilidad del estrato córneo haciendo más efectivos los sistemas de liberación transcutánea de medicamentos; posibilitan el uso de macromoléculas de

hasta 40 kDa (Escobar-Chávez y Cols., 2009) y minimizan la importancia de su carga eléctrica con menores efectos irritantes que los que se asocian al uso de determinados agentes permeadores.

Recientemente se ha demostrado *in vitro* sobre piel porcina la ventaja de la utilización conjunta de varios métodos físicos permeadores para facilitar el paso transdérmico de macromoléculas hidrofílicas sin producir daños cutáneos. El mismo estudio también puso de manifiesto la importancia de la fuerza de penetración que hay que ejercer sobre las microagujas así como la del voltaje empleado en la EP (Petchsangai y Cols., 2014).

La escopolamina fue la primera droga aprobada por la FDA, en 1979, para ser utilizada en forma de parche transdérmico en el tratamiento de la cinetosis. A pesar de la facilidad de aplicación, actualmente los parches dérmicos apenas se comercializan con una veintena de principios activos; entre ellos se incluyen la nitroglicerina, clonidina, nicotina, testosterona y otras hormonas empleadas para el tratamiento de síntomas de la menopausia o como contraceptivos, anestésicos como lidocaína y tetracaína, analgésicos y fármacos con acción central utilizados en desórdenes mentales (Prausnitz y Langer, 2008).

Por otra parte se ha descrito que el estrato córneo actúa como reservorio de ciertos medicamentos que se van liberando de forma progresiva al torrente sanguíneo (Binaglia y Cols., 1981a; Binaglia y Cols., 1981b; Pitzurray Cols., 1982).

2.2.1. Vía percutánea

La aplicación tópica de productos con fines terapéuticos o cosméticos ha sido empleada desde tiempos inmemoriales. En cosmética, la piel es el propio órgano final de actuación del producto por lo que no se precisa la absorción transcutánea del principio activo. Para conseguir efectos terapéuticos generales, las sustancias aplicadas tópicamente tienen que salvar una serie de barreras que dificultan su paso al torrente circulatorio, aunque si consiguen atravesarlas podrán llevar a cabo su función obviando el paso por el hígado (Förster y Cols., 2009). Por ello la industria farmacéutica

y la industria cosmética diseñan continuamente nuevas estrategias con el fin de aumentar la penetración transcutánea de sustancias activas sin provocar daños en la piel. Pero encuentran muchas dificultades para conseguirlo.

La piel es una membrana heterogénea que tiene propiedades lipofílicas en superficie e hidrofílicas en capas profundas. El estrato córneo cumple una función de barrera ya que su estructura contribuye a frenar la pérdida de agua del interior y a proteger de las agresiones que se producen desde el exterior. Lo forman unas 15 a 20 capas de células muertas unidas por una fase lipídica intersticial continua. Este estrato es lipofílico y su contenido en agua es de un 13% aproximadamente. La epidermis viable, representada por los estratos granuloso, espinoso y germinativo (de superficie a profundidad) tiene propiedades hidrofílicas significativamente más altas y un contenido en agua que sobrepasa el 50%; en la dermis el contenido acuoso supera el 70%, lo cual facilita el paso de sustancias hidrofílicas. En base a lo anterior, sustancias muy lipofílicas se acumularán en el estrato córneo, las muy hidrofílicas permanecerán en la superficie de la piel y las anfifílicas (tipo micelas) podrán atravesar la epidermis, en función de su peso molecular y el volumen del agente activo administrado.

La difusión pasiva de cualquier sustancia aplicada tópicamente sobre la piel puede seguir las dos vías: la intracelular, que obliga a múltiples entradas y salidas de las células atravesando sus membranas celulares, para lo cual tiene que difundir a través de las fases inter e intracelular; o la intercelular que evita el paso transmembranoso siguiendo a través de la fase lipídica. Una tercera vía, la transapendicular, a través de los poros de las glándulas sudoríparas y sebáceas, tiene poca significancia (Pons y Parra, 1995). Los folículos pilosos representan la vía de paso más importante por flujo electrosmótico (Kanikkannan, 2002) (Figura 2-5). La importancia relativa de cada vía de penetración depende de factores como el peso molecular, solubilidad y el pKa, entre otros.

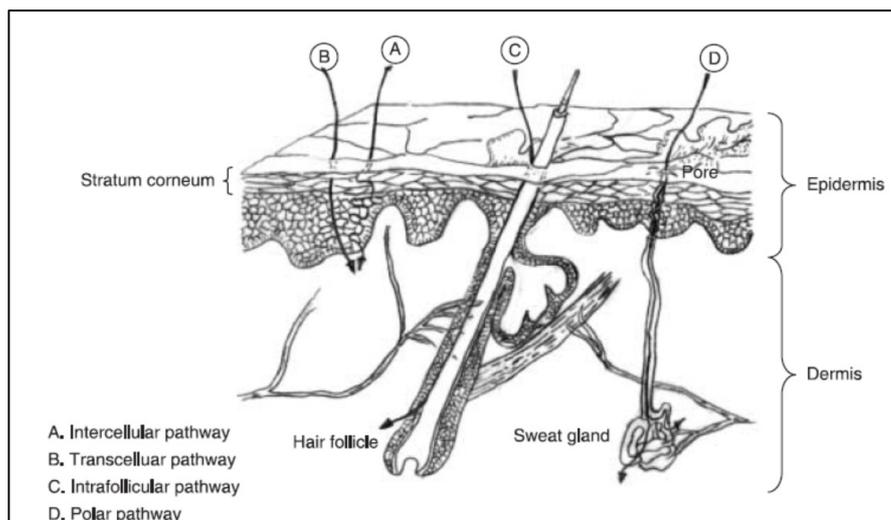


Figura 2-5. Visión esquemática de las posibles vías de paso transdérmico de moléculas. Tomado de Pouillot y Cols (2008).

En el estrato córneo se diferencian 2 componentes: uno rico en proteínas, constituido por elementos celulares muertos (queratina) y otro, el componente intercelular, rico en lípidos. Las proteínas representan entre el 75% y el 80% del extracto seco de la capa córnea y los lípidos entre el 5% y el 15% (el porcentaje restante hasta completar el 100% sigue aún sin caracterizar). Entre los lípidos, destacan las ceramidas y el colesterol. Se disponen formando una estructura laminar continua de lípidos y regiones acuosas, lo que dificulta la difusión tanto de sustancias polares como no polares.

Por otro lado, en el estrato córneo coexisten compuestos escasamente hidrófilos en la fase intracelular de los corneocitos con fracciones mayoritariamente hidrófobas constituidas por los lípidos que se encuentran en la fase extracelular y de modo significativo en la envoltura que rodea a los corneocitos (Pons y Parra, 1995). Las proporciones de ambas fases y el grosor del estrato córneo determinarán la resistencia al paso transcutáneo de sustancias aplicadas tópicamente en la superficie de la piel. Ello dará origen a importantes diferencias de absorción que dependiendo, por ejemplo, de la zona de piel donde se aplique el producto; así se establece un criterio de penetración que sigue un orden decreciente: genitales > cabeza > tronco > extremidades.

Existen distintos factores químicos y bioquímicos implicados en la absorción percutánea, como son: el propio principio activo, el vehículo empleado, las condiciones de exposición, el metabolismo de la piel y los agentes que modifican la absorción percutánea y que pueden ser tanto físicos como químicos. De los primeros, la iontoforesis y la fonoforesis pueden aumentar la absorción percutánea de sustancias aplicadas tópicamente pero están limitadas al uso de moléculas de pequeño tamaño y con carga eléctrica (Bos y Meinardi, 2000). Además, estas técnicas no pueden ser utilizadas por el propio paciente por lo que se consideran poco operativas (Barry, 2001).

La permeación cutánea de moléculas es un fenómeno multifactorial que depende de interacciones físicas, químicas y biológicas, tan impredecibles que hacen prácticamente imposible diseñar un modelo matemático para esta vía de administración (Godin y Touitou, 2007).

Por parte del principio activo, las propiedades físico-químicas que determinan su penetración cutánea son, entre las principales: su masa molecular, su tamaño, el balance hidrofilia-lipofilia, la distribución de las partes polares y no polares dentro de la molécula y su estado de ionización. Estos parámetros juegan un papel importante en su solubilidad y en su coeficiente de partición, de tal forma que aquellas moléculas que tienen un coeficiente de partición intermedio (con valores de logP entre 1 y 3) son suficientemente solubles en los lípidos del estrato córneo para permitir su paso y a su vez son suficientemente hidrófilos para llegar a capas más profundas de la epidermis. Por su parte, la masa molecular y el tamaño de la molécula, afecta al coeficiente de difusión y al punto de fusión (y por tanto a la solubilidad); la óptima permeabilidad se alcanzará empleando moléculas de masa molecular baja (idealmente de menos de 500 Da), lo que limita especialmente el uso de proteínas y péptidos (Förster y Cols., 2009).

2.2.2. Microaguja

En 1848 Baunscheit patentó un equipo de agujas múltiples que denominó "Lebenswecker" o "resuscitador". Estaba dotado de un sistema calibrador de la profundidad de inyección de las agujas en la piel y permitía aplicar sobre ella un aceite revulsivo que replicaba mecánicamente la picadura de un insecto. Según los

conocimientos médicos medievales, pretendía con este procedimiento extraer los malos humores responsables de las enfermedades inflamatorias a través de los microporos creados con el equipo (Figura 2-6).

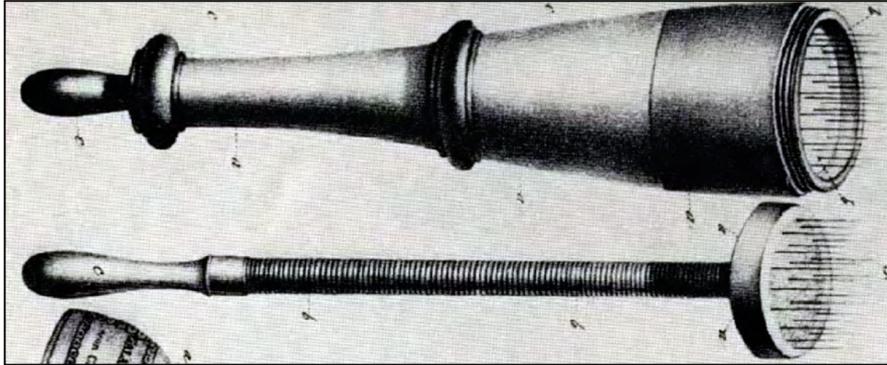


Figura 2-6. Diseño original del “resucitador” de Baunscheit fechado en 1848.
Fotografía tomada de Dirk (2007).

El diseño de este equipo primitivo no se diferencia mucho de los modelos actuales. Incluso su autor alumbra una hipotética teoría eléctrica del efecto de los pinchazos de las agujas y del uso del aceite revulsivo aplicado sobre la piel microperforada ya que recoge en sus escritos (citado por Dirk, 2007) que dicho aceite serviría para mantener la conexión galvánica entre las agujas, un antecedente de la “teoría eléctrica” que será postulada recientemente por Liebl para explicar el mecanismo de acción de las microagujas (Liebl y Kloth, 2012).

Aunque este tipo de dispositivos fueron patentados ya en 1976 (citado por Prausnitz, 2004), 1996 y 1997 (citado por Henry y Cols., 1998) con variaciones de tamaño, forma, material empleado, etc., la técnica actual de perforación cutánea con microagua (MN) fue redescubierta por Henry en 1998 (Henry y Cols., 1998). Estos investigadores emplearon sistemas dotados de microagujas sólidas para realizar pequeños orificios en la superficie cutánea antes de la aplicación tópica de una sustancia, especialmente de macromoléculas, para facilitar su paso a través de las efracciones formadas en el estrato córneo (Escobar-Chávez y Cols., 2011). Combinando este método mecánico con el método eléctrico descrito anteriormente es posible la utilización de moléculas de mayor tamaño (Schoellhammer y Cols., 2014) y se ha descrito una relación directa

entre el número de poros realizados y el incremento de la permeabilidad de la piel (Wu y Cols., 2006).

Cuando estos dispositivos se aplican sobre la superficie de la piel consiguen atravesar el estrato córneo y llegar a la epidermis vital donde se encuentran células vivas, y a la dermis que contiene los nervios y vasos sanguíneos.

Existen tres métodos para provocar microorificios en la superficie de la piel:

1. matrices de microagujas (Figura 2-7-a): dispositivos formados por placas con más o menos agujas de pequeño tamaño y diámetro, fabricadas con diferentes materiales como el acero quirúrgico, siliconas, azúcares reabsorbibles, cristal, cerámicas, etc (Donnelly y Cols., 2010).
2. Rodillos armados con agujas de distintas longitudes y diámetros, cuyo prototipo más conocido es el Dermaroller® (Figura 2-7-b) que el operador aplica sobre la superficie cutánea trazando distintos trayectos a la vez que aplica una presión que determinará la profundidad de los canales creados, por lo que son dispositivos muy poco precisos. El incremento de la permeación conseguida con estos dispositivos rodantes es sensiblemente mayor que el que se obtiene con las matrices de microagujas al realizar orificios de mayor diámetro y profundidad (Li y Cols., 2010).
3. Dispositivos electrónicos de estampación que disponen de un micromotor que moviliza una serie de agujas (de 1 a 12) en movimientos de vaivén sobre la piel, (Figura 2-7-c) más precisos que los anteriores y menos traumáticos. Además permiten calibrar de forma precisa la profundidad de penetración de las agujas y la velocidad del micromotor.

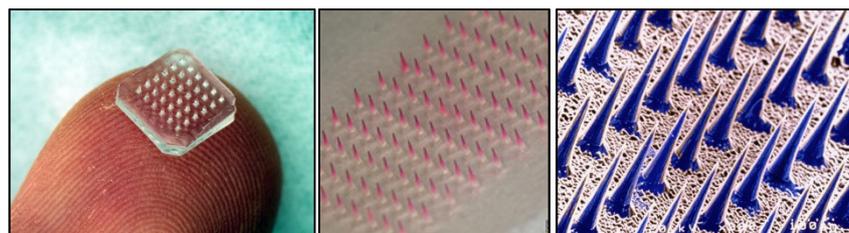


Figura 2-7-a. Matrices de microagujas.

Tomado de: http://drugdelivery.chbe.gatech.edu/gallery_microneedles.html



Figura 2-7-b. Dermaroller®



Figura 2-7-c. Equipo de minocreneedling utilizado en nuestro estudio con detalle de un cabezal y las microagujas

Los primeros estudios de microperforación, utilizando calceina (Henry y Cols., 1998), demostraron que el incremento de la permeabilidad a través de la piel microperforada es el triple que cuando se aplica sobre piel intacta. El incremento de la permeabilidad de la piel perforada se mantiene durante horas en modelos *in vitro*. La eficacia del método en la disrupción del estrato córneo ha sido demostrada por la observación microscópica de poros en la superficie cutánea así como por el incremento de la pérdida de agua transepidérmica (Badran y Cols., 2009).

Existen distintos métodos de empleo conjunto microagujas-medicamento: agujerear primero y aplicar después el producto, humedecer las agujas con el producto que se quiere transportar y aplicarlas sobre la piel, o utilizar agujas huecas a través de las cuales penetra el producto en las capas profundas de la piel (Figura 2-8)

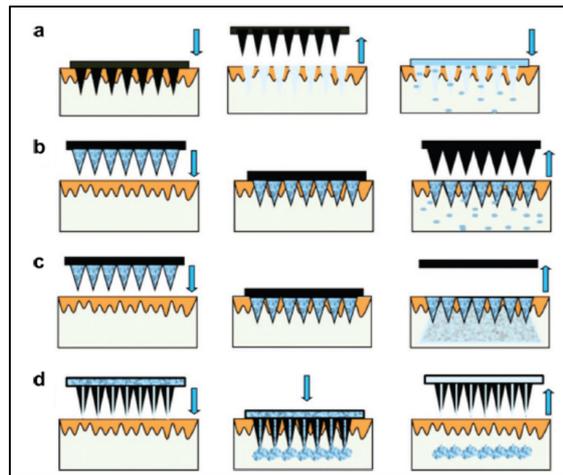


Figura 2-8. Representación esquemática de las cuatro modalidades de aplicación de las MN para facilitar el paso transdérmico de sustancias: a) microagujas sólidas que incrementan la permeabilidad al realizar pequeños orificios en el estrato córneo; b) MN recubiertas del producto que se quiere introducir en la piel; c) agujas biodegradables; d) MN huecas utilizadas para atravesar la piel e inyectar el producto a través de ellas.

Imagen tomada de Tuan-Mahmood y Cols., 2013.

Igualmente, existen diferentes tipos de agujas de acuerdo a su estructura (huecas, sólidas o biodegradables una vez implantadas) o material de fabricación (acero, cristal, silicona, hidrogeles, polímeros o polisacáridos) (Ita, 2015; McCrudden y Cols., 2014)(Figuras 2-9 y 2-10). También puede variar el mecanismo mediante el cual se insertan las microagujas en la piel. Unas veces se introducen de forma manual (con lo que se añade un factor aleatorio en cuanto a la profundidad de penetración que pueden alcanzar las microagujas) y otras veces haciendo uso de dispositivos electrónicos de disparo a una fuerza constante y con posibilidades de calibrar de forma precisa la profundidad de penetración. Hay que considerar que cualquiera de los dispositivos que se empleen para microperforar la piel deben ser lo suficientemente seguros como para garantizar que no se produzcan roturas de las microagujas (Davis y Cols., 2004).

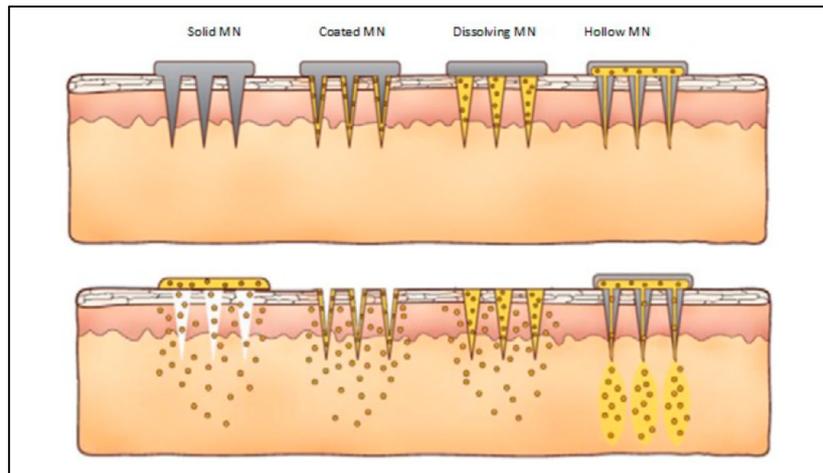


Figura 2-9. Formas y tipos de microagujas. Tomado de Ita (2015)

La longitud de las microagujas varía desde 150 μm hasta 1500 μm y los diámetros oscilan entre 10 a 50 μm . También existen diferencias en cuando a las formas de las microagujas en función del fabricante. El dolor producido por la penetración de microagujas de 150 μm es insignificante en comparación con el que produce la introducción en la piel de una aguja de 26 gauge (Kaushik y Cols., 2001).

Se ha estimado que el tiempo durante el cual los poros formados permanecen abiertos es de unos 15 minutos, al cabo de los cuales se van cerrando de forma progresiva. Sin embargo, métodos como la oclusión de la zona microperforada puede mantenerlos abiertos durante una plazo de 48-72 horas (Bal y Cols., 2010; Kalluri y Banga, 2011).

La técnica de microperforación cutánea sirve para facilitar el paso transdérmico de cantidades relativamente altas (de hasta 1,5 ml) de moléculas de cierto tamaño con una cierta rapidez (de 5 a 20 minutos) y de forma muy eficaz (Burton y Cols., 2011).

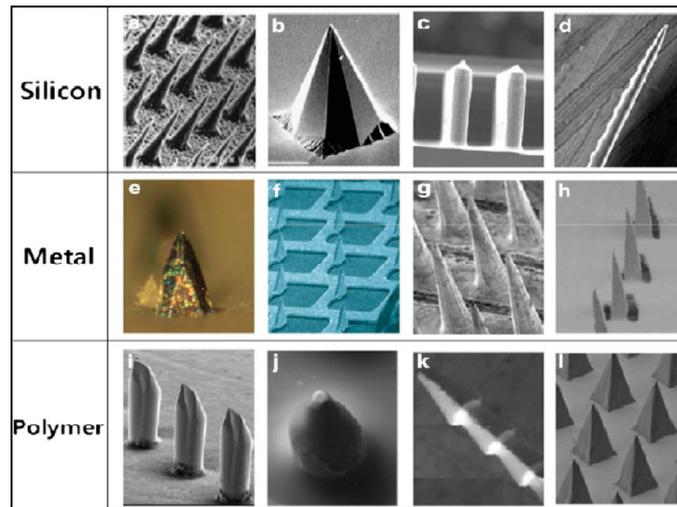


Figura 2-10. Tipos de agujas sólidas fabricadas con distintos materiales mostrando diferentes formas (de Ita, 2015).

2.2.3. Electro-ionto-poración (EIP)

Se basa en dos técnicas eléctricas distintas: por un lado, la electroporación y por otro, la iontoforesis.

La electroporación (EP) consiste en la exposición de las membranas lipídicas del estrato córneo a campos eléctricos intensos (de hasta 500 V) e intervalos de tiempo variables (de 10 μ s a 10 ms) que originan la formación de disrupciones reversibles (poros) de varios cientos de μ m en las estructuras lipídicas de la piel. Esto conlleva la modificación de las propiedades de barrera del estrato corneo y se facilita el paso a su través de sustancias que, de otra forma, no podrían acceder a la dermis y al torrente circulatorio. El campo eléctrico añade además fuerzas electroforéticas que incrementan el paso de las sustancias aplicadas en la piel y permite el uso de macromoléculas, moléculas lipofílicas o hidrofílicas y de moléculas cargadas o neutras desde el punto de vista eléctrico. Es decir, que “empuja”, a través de los poros creados, a las moléculas aplicadas mediante fuerzas de electroforesis (principal fuerza de transporte de moléculas dotadas de carga eléctrica) y, en menor medida, de electroósmosis (Escobar-Chávez y Cols., 2009). Además se produce un incremento de la hidratación de la piel y una disminución de su resistencia, junto con incremento pasajero del flujo sanguíneo cutáneo y eritema.

Las alteraciones estructurales del estrato córneo provocadas por campos eléctricos no son homogéneas y conllevan aumentos de temperatura local por un fenómeno de

resistencia. La conductibilidad eléctrica es el factor que más influye en la permeabilidad de la piel. Pulsos de más de 300 ms causan incrementos de la temperatura de más de 60°C pudiendo provocar lesiones térmicas (Becker, 2012).

El tipo de onda eléctrica aplicada, el voltaje, la anchura del pulso y el número de pulsos son los tres parámetros más importantes de la EP para conseguir incrementar la permeación cutánea. Estudios *in vitro* realizados sobre piel de rata utilizando 20 pulsos por segundo con picos de voltaje de 500V y pulsos de no más de 20 ms, no provocan la liberación de histamina y el consiguiente enrojecimiento cutáneo debido a la vasodilatación que ésta produce, ni daños en la piel. (Yan y Cols., 2010; Petchsangai y Cols., 2014).

La eficacia del transporte depende también de los parámetros eléctricos y de las propiedades físico-químicas de las sustancias utilizadas. Un estudio realizado en ratas comparando dos protocolos de EP confirmaron que la modificación de la función de barrera de la piel y el incremento del flujo sanguíneo es mayor empleando menores voltajes y frecuencias de pulsos (10x335V-5ms vs 10x1000V-100µs) (Dujardin y Cols., 2002). Por otro lado, estudios *in vitro* sobre piel de cerdo, demostraron que los pulsos más largos de bajo voltaje incrementan de forma significativa el paso de calceína, mientras que los pulsos cortos de tensión más alta la incrementan en menor medida. Los autores recomiendan el uso de impulsos de onda cuadrada en lugar de impulsos exponenciales descendentes (Zorec y Cols., 2013). Incluso se ha visto que el total transportado de una solución puede decrecer si se incrementan los pulsos (Becker y Cols., 2014), aunque solo moléculas con carga eléctrica efectúan paso transcutáneo de forma significativa (Schoellhammer y Cols., 2014). Por tanto, las propiedades físico-químicas de las drogas utilizadas deben ser tenidas en cuenta (Charoo y Cols., 2010).

La corriente galvánica es una corriente continua generada por una tensión constante que mantiene su polaridad, intensidad y dirección en el tiempo. Cuando atraviesa una solución electrolítica, que contiene iones con cargas positivas (cationes) y negativas (aniones), éstos se moverán de tal forma que los iones cargados positivamente (cationes), se dirigen hacia el polo negativo (cátodo), mientras que los iones con carga

negativa (aniones) se dirigirán hacia el polo positivo (ánodo). Al alcanzar su polo correspondiente originan lo que se denominan fenómenos polares (recogidos en la tabla 2-2), mientras que a lo largo del territorio orgánico que atraviesan y que se dispone entre los dos electrodos de aplicación se experimentan los denominados fenómenos interpolares (recogidos en la tabla 2-3) (Belloch y Cols., 1972; Domingo, 1991).

Tabla 2-2. Efectos polares de la corriente galvánica	
Polo positivo	Polo negativo
Reacción ácida	Reacción alcalina
Liberación de oxígeno	Liberación de hidrógeno
Quemadura ácida	Quemadura alcalina
Coagulación	Licuefacción
Rechazo de iones positivos	Rechazo de iones negativos
Vasoconstricción	Vasodilatación
Sedación	Excitación

Tabla 2-3. Fenómenos interpolares de la corriente galvánica
Efecto hiperemiante
Aumento de la permeabilidad de las membranas vasculares
Efecto trófico
Efecto térmico
Aumento de las secreciones glandulares
Efecto analgésico-sedante (más marcado en el ánodo)
Efecto tonificante y aumento de la excitación motriz (más marcado en el cátodo).

La iontoforesis o electroforesis (EF) emplea corriente galvánica para incrementar la penetración de moléculas hidrofílicas y dotadas de carga eléctrica a pH fisiológicos a través de la piel. La cantidad total de sustancia liberada es directamente proporcional a la cantidad de carga eléctrica empleada, a la duración de la aplicación y al área cutánea sobre la que se aplica y que está en contacto con el electrodo activo (Kalia y Cols., 2004). El transporte iontoforético se produce, fundamentalmente, por vía intercelular y aprovechando las estructuras apendiculares cutáneas (folículos pilosos y glándulas sudoríparas). La densidad de los poros jugará un papel importante en el transporte, pero también se ha visto que la corriente galvánica incrementa también la permeabilidad de la membrana.

Los equipos de EF están constituidos por una fuente de alimentación y dos electrodos, un ánodo (con carga positiva) y un cátodo (con carga negativa). La droga con carga eléctrica conocida (positiva o negativa), se debe de colocar en el electrodo de su misma carga. El electrodo indiferente se coloca en otra zona de piel, alejado del electrodo activo. El flujo iónico se produce siguiendo la ley de Ohm y cuando se cierra el circuito, la molécula cargada será repelida del electrodo de su misma carga dirigiéndose al electrodo de carga opuesta mediante un fenómeno de electromigración y electroósmosis. Las propiedades físico-químicas de la molécula deben ser tenidas en cuenta (peso molecular, carga, pK_a , hidrofilia, etc.) (Tashiro y Cols., 2001).

A pesar de ser considerada una técnica segura, el uso de corriente eléctrica puede producir ciertas molestias a los pacientes, sensación de dolor quemante, irritación cutánea, formación de ampollas e incluso necrosis por efectos polares en los lugares de aplicación de los electrodos (por reacción ácida en el polo positivo y por reacción alcalina en el polo negativo). Los efectos polares de la corriente galvánica se recogen en la tabla 2-2.

La combinación de EF con EP (lo que se ha dado en llamar electro-ionto-poración EIP) busca aumentar la permeación transcutánea sin incrementar los posibles efectos colaterales de ambas técnicas cuando se emplean individualmente (Batheja y Cols., 2006). Permite también emplear dosis terapéuticas de macromoléculas como péptidos y oligonucleótidos a través de la piel (Kanikkannan, 2002). Un estudio realizado *in vivo* en ratas concluye que la utilización de MN antes que de aplicar iontoferesis produce un aumento significativo de la profundidad de penetración de seroalbúmnina bovina a través de la piel (Bai y Cols., 2014).

Dependiendo de las magnitudes utilizadas (voltaje, duración del impulso, frecuencia) se puede conseguir aumentar el nivel de permeación cutánea pero corriendo el riesgo de que no se produzca la vuelta a la normalidad (Sharma y Cols., 2000b). Para conseguir la formación de poros en el estrato córneo se necesitan pulsos de 1 V por bicapa. Teniendo en cuenta que el estrato córneo está formado por unas 100 bicapas

multilaminares serían precisos unos 100 V o más para obtener un resultado satisfactorio, lo que puede ocasionar alteraciones en la estructura cutánea (Escobar-Chávez y Cols., 2009). Combinando ambos principios (electroporación con iontoforesis) se pueden emplear menores voltajes y con ello disminuir la posibilidad de causar efectos colaterales no deseados. Los resultados experimentales disponibles sugieren que la asociación de los dos sistemas es más eficaz para el paso de macromoléculas a través de la piel que su uso por separado (Gujjar y Banga, 2014; Kolli y Cols., 2012; Yan y Cols., 2010; Wu y Cols., 2007). Por ejemplo, *in vivo* se utiliza en la electroquimioterapia antitumoral, en vacunación, etc. (Corovic y Cols., 2015). La tabla 2-4 recoge algunos de los factores que determinan el paso transdérmico de moléculas mediante asistencia eléctrica.

Tabla 2-4. Factores que influyen en la administración de fármacos mediante asistencia eléctrica. Tomado de Banga y Cols.(1999)

Factor	Iontoforesis	Electroporación
Entrada eléctrica	Corriente constante (bajo voltaje); densidad de corriente <0,5 mA/cm ²	Pulsos de alto voltaje ≥100 V; duración de pulsos (ms-µs); número de pulsos dados (uno-varios); espaciado entre pulsos (todos a la vez o con cierto intervalo).
Material del electrodo	El electrodo no debe producir la electrolisis del agua (ej.: plata-cloruro de plata)	El electrodo debe evitar la electrolisis del agua y resistir la alta corriente instantánea.
Propiedades físico-químicas de la sustancia a administrar	Carga de la sustancia (mejor con alta densidad de carga); tamaño de la sustancia (mejor iones pequeños); estructura de la droga (estructura compacta); lipofilicidad (debe ser soluble en agua); peso molecular (máximo 12000 dalton)	La carga de la sustancia no es tan importante; límite máximo de peso molecular no conocido.
Factores de formulación	Concentración de la droga: el pH debe ajustarse para mantener el fármaco cargado; fuerza iónica	Concentración de la droga
Mecanismo de conducción	Fuerza eléctrica sobre la droga. No formación de nuevas vías (ruta transapendicular)	Fuerza eléctrica sobre la droga y permeabilización de la piel. Formación de nuevas vías de paso. Reversibilidad a pulsos de bajo voltaje
Electroosmosis	Significativo flujo electroosmótico acompañado de iontoforesis	Insignificante

Entre las ventajas del uso de la EIP frente al uso de agentes permeadores cutáneos, destacan el incremento de la penetración transcutánea de ciertas drogas, la

versatilidad (puesto que puede ser empleada en casi todos los tipos de células), la eficacia y el control del tiempo de administración del fármaco. Además, el procedimiento puede llevarse a cabo sobre tejidos intactos y no produce sensibilización inmunológica a la molécula utilizada (Escobar-Chávez y Cols., 2009). Puede añadirse a estas ventajas la fácil accesibilidad de la piel y su magnitud, la evitación del primer paso hepático y la ausencia de restricciones asociadas a la vía oral (Allevato, 2007).

La EIP se ha aplicado en terapia génica para facilitar la introducción de ADN en células tanto *in vitro* como *in vivo* al demostrarse la reversibilidad de la permeabilización obtenida (Mir, 2014). También en la electroquimioterapia basándose en la permeabilización de las células tumorales a determinadas drogas citotóxicas (bleomicina) que de otra forma no las afectarían o tendrían importantes efectos secundarios (Mir y Orłowski, 1999). Este método demostró ser más eficaz en la lucha frente a tumores accesibles a la EIP (como son algunos tipos de cánceres de piel o de próstata) que la quimioterapia convencional.

También se ha estudiado el efecto de la asociación de técnicas de MN con EIP sobre la base del incremento en la absorción de determinados productos a través de la piel microperforada previamente. Se comprobó que el MN previo permite un mayor control del flujo de la droga mediante la modulación de la corriente aplicada así como una disminución en el tiempo necesario para que penetre en la piel. Esta técnica se conoce con el nombre de "*in-skin-electroporation*" y combina las ventajas del MN con las de la EIP (Yan y Cols., 2010): facilita el paso de moléculas hidrofílicas de alto peso molecular a las capas profundas de la piel e incrementa la capacidad de permeabilidad. Por otro lado, permite utilizar voltajes más bajos y anchos de pulsos más cortos que cuando se emplea la EP aislada. Los orificios formados con la combinación de ambas técnicas son más anchos y profundos que los encontrados cuando se usa solo EP.

Aunque por lo general la aplicación *in vivo* de campos eléctricos de alto voltaje es bien tolerada, la parte "tóxica" del procedimiento es la aparición de contracciones musculares (Denet y Cols., 2004) o los posibles daños irreversibles en algunas

membranas celulares que provocan la muerte de la célula (Escobar-Chávez y Cols., 2009).

Desde tiempos inmemoriales se conoce que el cuerpo humano posee corrientes bioeléctricas endógenas que provocan señales que pueden ser recogidas por diferentes procedimientos y tienen una amplia utilización en clínica (electrocardiograma, electroencefalograma, electromiograma, etc.). Un estudio llevado a cabo en 2005, ha puesto de manifiesto que las células de los animales responden a la exposición a campos eléctricos en función de sus propias cargas, en un fenómeno definido como galvanotaxis que hace que se muevan cumpliendo las leyes de la electricidad (repulsión de cargas del mismo signo y atracción de cargas opuestas). Por ejemplo, se conoce que los fibroblastos y los queratinocitos tienen carga positiva y migran hacia el cátodo mientras que los macrófagos tienen carga negativa y migran hacia el ánodo. En este mismo estudio se describe que los campos eléctricos aplicados sobre la superficie cutánea, provocan angiogénesis cuando se aplican en forma de corrientes pulsadas 30 minutos al día durante 38 días (Kloth, 2005).

2.2.4. Inyección intradérmica

La filosofía del uso de la vía intradérmica (ID) o mesoterapia para la administración de medicamentos, es llevarlos a nivel intradérmico en localizaciones próximas al lugar donde radica una patología empleando una aguja hueca. La aplicación de medicamentos *loco dolenti* parece la forma original y lógica de tratamiento de muchas patologías desde hace ya varios siglos. En sus orígenes, el médico o el chaman se servían de diferentes técnicas con la pretensión de aumentar los beneficios del remedio aplicado, tales como las escarificaciones, punciones secas con espinas, empleo de plantas o venenos urticariantes, etc., que podrían equipararse a la terapia de punciones múltiples que caracteriza a la ID actual.

Esta forma de administrar fármacos solo pudo ser posible a partir de la fabricación de una aguja hueca (Rynd, en 1844) que pudiese montarse sobre una jeringa como la descrita en 1841 por Pravaz, y del desarrollo de la técnica inyectiva local por parte de

Wood (1853), principalmente de opiáceos en las articulaciones dolorosas y en el tratamiento de neuralgias (citado por Rubin, 1988). (Figura 2-11)



Figura 2-11.- A la izquierda, una imagen de la primera aguja hueca creada por Rynd en 1844 (obtenida de: http://www.cna-med.com/wordpress1/wp-content/uploads/2015/03/1st_hollow-needle.jpg). A la derecha, imagen de una jeringa de Pravaz (Tomada de <http://tomascabacas.com/wp-content/uploads/2014/08/Jeringa-de-Pravaz1.jpg>).

A partir de este momento, el método experimentó un importante desarrollo puesto que los resultados obtenidos son inmediatos; progresivamente se fue ampliando el arsenal terapéutico y las indicaciones. Sin embargo, el método no dejó de ser controvertido y Hunter defendía que no hay diferencias en cuanto a la localización donde se realicen los pinchazos, y que la forma de aplicación *loco dolenti* ocasiona infecciones con relativa frecuencia. Esta tesis llevó en 1867 a la Real Sociedad de Medicina y Cirugía del Reino Unido a desaconsejar las terapias *in situ* y apoyar el uso de vías parenterales. Fuera de Inglaterra, sin embargo, el método siguió utilizándose para la administración de morfina más de 100 años antes del descubrimiento de los receptores periféricos de la droga (Tammisto y Tammisto, 2000).

Con el método de administración ID y la evitación del paso hepático, el medicamento administrado no se inactiva parcialmente, incrementándose sus efectos terapéuticos con dosis menores que cuando se administra por otras vías parenterales, incluso por la vía subcutánea que en apariencia está próxima a la intradérmica. Al disminuir la cantidad necesaria de medicamento y distanciar el ritmo de administración, disminuyen sus posibles efectos secundarios: es una alopátia microdosificada.

Aunque aún no han sido explicadas las múltiples incógnitas y dudas que plantea el uso intradérmico de una cantidad tan pequeña de medicamento sí se ha demostrado que la dermis es capaz de modular la difusión de una molécula en función de la profundidad de inyección. Seguramente, la clave en la investigación de la vía ID es conocer su farmacocinética con el fin de comprender los mecanismos que la diferencian de otras vías más “convencionales” (Corbel y Corbel, 1989).

En 1872 (Hekimian, 1872) en su tesis doctoral demostró la utilidad de la inyección intradérmica *loco dolenti* de agua pura para conseguir un efecto analgésico, técnica que en la actualidad sigue utilizándose en el tratamiento de los cólicos renales por urolitiasis en mujeres embarazadas (Xue y Cols., 2013), en los dolores del parto (Saxena y Cols., S 2009) (Lee y Cols., S 2013), en los dolores cervicales motivados por el síndrome de hiperextensión postraumático (Byrn y Cols., 1993) o en dolores miofasciales crónicos (Wreje y Bronsson, 1995).

Antes del final del siglo XIX ya se empezaron a utilizar por vía intradérmica otras sustancias además de la morfina. El descubrimiento de la procaína (Einhorn, 1905), desplazó a la morfina y a la heroína en la terapia intradérmica con la consiguiente desaparición de la drogodependencia y el peligro de sobredosis. Esta sustancia se utilizó en inyecciones intradérmicas a nivel metamérico para el tratamiento de algias viscerales (Lemaire, 1924), síndromes dolorosos vesiculares (Hutet, 1929), en reumatología (Weissenbach y Perles, 1931), etc.

Simultáneamente, se describieron los fenómenos reflejos de origen dérmico (Jarricot, 1932) y el papel de la dermis en las algias viscerales (Sicard y Lichwitz, 1929); así, de forma progresiva, la vía intradérmica amplió el espectro de sus indicaciones: tratamiento de gastralgias, dolores anginosos, reumatismos, migrañas, etc.

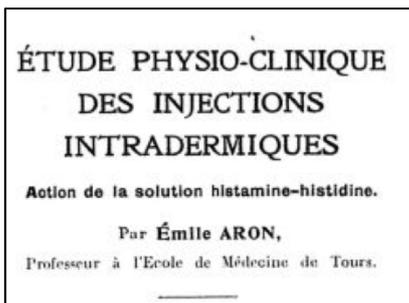
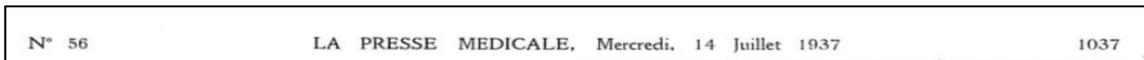


Figura 2-12. Título y referencia bibliográfica de los trabajos de Émile Aron publicados en 1937.

Esta bibliografía fue consultada en la página web <http://194.254.96.52/main.php?key=ZnVsbHwxMDAwMDB4MTkzN3hhcnRvcmlnfHw>



Émile Aron puede ser considerado como el precursor de la intradermoterapia moderna (Aron, 1937). Durante la tercera y cuarta décadas del siglo pasado, empleando una solución de histamina-histidina (el efecto analgésico de la histamina se ve reforzado en intensidad y duración al asociarla con histidina), realizó múltiples inyecciones locales intradérmicas para el tratamiento de reumatismos, técnica que se definió como “revulsión periarticular”. El autor describió dos hechos particulares de la vía de administración intradérmica *loco dolenti*: primero, que cualquier sustancia administrada por esta vía tiene efecto analgésico (incluso el agua pura, como se apuntó anteriormente); y en segundo lugar, que aumenta la velocidad de actuación y de la eficacia de los medicamentos empleados. Estos hallazgos tuvieron gran influencia en la clase médica que se decantó por las terapias locales en la siguiente década y, sin duda, influyeron el desarrollo de dos modalidades de aplicación de medicamentos por vía ID conocidas como Mesoterapia Puntual Sistematizada (Mrejen, 1987) y Mesoterapia Segmentaria Metamérica (Lavignolle y Cols., 2003).

A partir de la segunda mitad del siglo XX se estudiaron los efectos de la procaína administrada por vía intradérmica más allá de su actividad anestésica local. En 1950 tres autores franceses, Oury, Estival y Beau, publicaron un artículo en *La Presse Médicale* donde describieron el empleo de esta sustancia por vía intradérmica en ciertas afecciones cardiológicas al administrarla mediante una especie de “moteado” sobre la piel. Este método provoca un efecto completamente diferente que su administración subcutánea, tal vez debido tanto al efecto anestésico del medicamento como al efecto mecánico de la distensión originada por la administración intradérmica

del mismo, sin descartar la liberación local de mediadores químicos de tipo histamina que provocan vasodilatación (Parienti, 1987).

Bicheron, en 1958 (Bicheron, 1974), utilizó procaína en punciones locales intradérmicas múltiples con formación de pápulas en procesos dolorosos. Por su parte, Pistor, que llevaba ya seis años utilizando la vía intradérmica local para la administración de procaína, publicó en el mismo año un trabajo en el que recoge y describe nuevas aplicaciones de la procaína (1958) en diferentes patologías. Crea el neologismo “mesoterapia” para destacar el efecto que esta forma de administración parenteral de medicamentos produce los tejidos derivados del mesodermo (Figura 2-13). Resume la técnica con un aforismo que se extendió de forma rápida y se repite prácticamente en todos los textos sobre mesoterapia: “*poco, pocas veces y en el lugar adecuado*”. Esta publicación permitió un rápido desarrollo y la modernización de la técnica intradérmica que se popularizó en la medicina veterinaria realizándose en los primeros años múltiples ensayos clínicos en animales con muy buenos resultados, que después se trasladaron a la medicina humana (Manet, 1965) (Bordet, 1982).

Sin embargo, no todos los autores están de acuerdo con el término “mesoterapia” y prefieren seguir empleando la antigua denominación de inyecciones intradérmicas (Corbel, 1986) (Mammurari y Cols., 2011). Para estos críticos, “mesoterapia” es un término que define mal la técnica de administración al no delimitar la profundidad de inyección dentro de la propia palabra, factor que es determinante para la obtención de mayores y más rápidos efectos terapéuticos que se prolongan en el tiempo con dosis mucho menores que las precisas cuando la administración se realiza por otras vías parenterales. Por esto intradermoterapia es un término más conocido y aceptado por la clase médica.

EXPOSÉ SOMMAIRE DES PROPRIÉTÉS NOUVELLES DE LA PROCAINE LOCALE EN PATHOLOGIE HUMAINE

Par Michel PISTOR
[Roy-Lu (S.-et-O.)]

En médecine générale, la pratique régulière de la petite chirurgie et des anesthésies locales, nous a amené à faire diverses observations concernant l'action d'un soluté complexe à base de procaïne dans divers traitements.

Le résultat finalement obtenu nous a semblé dépasser largement l'indication posée au départ, à savoir : supprimer la douleur, au moins temporairement. Dans bon nombre d'états post-traumatiques ou de rhumatismes douloureux, l'utilisation de ce médicament donnait des résultats excellents mais très fugaces.

Il était tentant de rechercher une combinaison qui apportât des résultats aussi spectaculaires et plus durables, un proche avenir montrera combien nos espoirs ont été dépassés par la réalité.

POSOLOGIE ET TOLÉRANCE

Cette posologie est très variable selon l'âge du sujet ou la maladie à traiter; nous l'évoquons en fonction du lieu d'injection.

Malheureusement, l'injection est parfaitement tolérée. Il est souhaitable de mettre le malade préalablement en décubitus dorsal, une sensation ébriée pouvant s'installer quelques instants après l'injection.

Quelques malades allergiques ont eu des réactions passagères après les injections sous-cutanées; il est facile d'y remédier en leur donnant, le jour même et le lendemain, 3 comprimés à 0,50 d'hydrocortisone. On prévient ainsi l'eczéma des paupières que nous avons rencontré avec une fréquence de 2 %, dans les traitements d'ophtalmologie.

Il n'y a pas de contre-indication; nous avons fait des injections à des asthmatiques, à des cachectiques, à des tuberculeux, etc., sans qu'on ait pu trouver une incidence quelconque sur l'évolution du traitement. Chez les lipothymiques et les hypotendus, il est indiqué de diminuer la dose de 30 % et de faire prendre un peu de caféine avant l'injection.

A. — INDICATIONS ACTUELLES

L'action de ce traitement peut être envisagée sous deux angles : traitement curatif de certaines manifestations de l'artériosclérose, traitement préventif de maladies vasculaires, l'expérience ayant montré, depuis six années, que les malades ayant subi le traitement n'ont jamais été atteints de maladies vasculaires cérébrales : lésions, hémiparésie, ramollissement ou hémorragie cérébrale. Ce traitement comporte des injections locales et des injections par voie générale.

Faisons maintenant les deux premières distinctions ayant donné lieu au plus grand nombre d'observations : la Rhumatologie et l'Ophtalmologie.

I. — Rhumatologie.

Nous avons eu des observations remarquables dans les arthrites et notamment la polyarthrite rhumatoïde évolutive avec modification de la vitesse de sédimentation. Les injections doivent être multiples et faites, intradermiques, aux emplacements de la douleur maxima avec une fréquence de, une fois par semaine, une injection de 20 cm³ de soluté.

Certaines arthroses, devenues insensibles à la corticothérapie, ont été sensibilisées par ce traitement local et, l'association s'est révélée efficace. Dans les tumeurs des mains, notamment dans 70 % des cas, on assiste à une véritable fonte; en deux mois, des nodosités d'Heberden, par l'action du seul soluté injecté, disparaissent.

II. — Ophtalmologie.

L'action bien connue du soluté à la procaïne sur le muscle comme décontractant, trouve à deux indications nouvelles : le strabisme (chez le jeune) où le tonus des muscles de l'œil tend vers un équilibre après quelques injections (6 à 10); la presbytie, où le corps ciliaire semble gagner, après le traitement, une grande faculté d'adaptation. Le processus procaïnique se rapproche rapidement en peu de temps du soluté à la procaïne.

Après l'injection (quelques minutes). Avant la mise en œuvre du traitement, il est toujours utile de pratiquer « le test d'utilité » du traitement.

A) **Test d'utilité.** — Ce test consiste à introduire, sous forme de collyre, une ou deux gouttes du soluté dans chaque œil; après quelques secondes, le malade perçoit, d'une façon plus nette et plus contrastée, pouvant même gagner un ou deux décimètres sur l'échelle de lecture. Mais cette action est fugace et, au bout de quelques instants, disparaît; l'acuité visuelle revient à son point de départ.

Ce test, lorsque son résultat est favorable, a toujours été suivi d'un traitement efficace. Inversement, si la réaction a été nulle, le traitement n'apportera pas d'amélioration. Dans quelques rares cas, chez des personnes particulièrement pusillanimes redoutant les injections, l'administration quotidienne de gouttes, sous forme de collyre, a pu donner de bons résultats.

En plus de son intérêt thérapeutique, ce test contient une véritable valeur diagnostique. En effet, la mesure du temps de latence, séparant le moment où l'on met les gouttes du moment où le malade ressent une amélioration de la vue, cette mesure, montre des chiffres variables selon les individus. Ces chiffres, très bas chez le jeune et chez l'enfant, s'élèvent chez l'adulte et, plus encore, chez le vieillard; ils ont bien semblé en rapport avec le degré d'artériosclérose. Il y a à ce sujet de nombreuses recherches ultérieures.

B) **Le traitement.** — Le traitement proprement dit comprend l'injection, après test positif, de 2 cm³ de soluté à la procaïne. On fera lire le malade avant et après l'injection sur le tableau habituel à 5 m, sans toutefois prolonger les exercices. L'injection sera faite sous la paupière, en traversant l'œil de bas en haut, et un peu tangiblement vers la partie supérieure de la voûte orbitaire, à 5 mm au moins du globe oculaire. On aura recommandé au malade de fermer les yeux. Le sujet effectuera, après l'injection, pendant quelques instants, des mouvements divers des globes oculaires, les paupières étant closes.

Deux jours après cette première injection, on en pratiquera une deuxième. La troisième aura lieu sept jours plus tard et la quatrième également. On demande au malade, dès que cela est possible de se stabiliser de part des lunettes.

Dans quelques cas de presbytie, le traitement apporte une amélioration suffisante (plus de 55 ans) pour permettre la suppression des verres; il pourra alors succéder à l'achat de nouveaux verres ou reprendre ceux qu'il utilisait quelques années auparavant et qui seront de nouveau suffisants.

Nous avons expérimenté ce traitement avec de grand succès dans le strabisme des plus de 8 ans et des moins de 25 ans, la presbytie de la cinquantaine (45 à 55 ans), les hauses d'acuité visuelle imputées (fort justement) à l'état général; de bons résultats ont été observés chez les astigmatiques et même parfois chez des myopes ayant de l'astigmatisme. À la date d'aujourd'hui, nous pouvons évoquer le témoignage de plus de 100 personnes qui peuvent se passer de leurs verres depuis le traitement.

Il faudra beaucoup d'observations, en milieu hospitalier spécialisé, pour préciser les indications très nombreuses de cette méthode qui semble jouer un rôle d'attaque directe des processus de vieillissement. En effet, nous retrouvons, au niveau de l'oreille la même action vaso-dilatatrice, mais cette action eutrophique également, sur les terminaisons nerveuses. Là encore, des processus pathologiques ont pu être modifiés qui ne l'étaient guère par les thérapeutiques classiques.

III. — Cardiologie.

D'excellentes indications se voient dans l'angine de poitrine, dans certaines arythmies, dans les séquelles d'infarctus du myocarde où les injections intradermiques précoordonnées faites régulièrement ont donné de bons résultats. Dans un cas précis, ces injections pratiquées chez un malade arythmique, en train de subir un électrocardiogramme, ont amené une normalisation du rythme au bout d'une minute environ, prouvant ainsi l'action du soluté introduit dans le derme, par voie réflexe d'abord, par action vaso-motrice locale ensuite.

IV. — Otite-méningite.

En Otologie. Nous avons trouvé également des indications supplémentaires (Hôpital Beaujon, service de D^r Bourdard, depuis un an environ, nous avons traité 350 malades parallèlement à ceux de notre clientèle privée depuis six ans). L'action peut être remarquable sur certaines formes de bourdonnement d'oreille, en général, chez des malades assez jeunes. Beaucoup de malades remarquent une amélioration subjective de l'audition que l'audiogramme total ne suffit pas toujours à mettre en évidence. Grâce à l'utilisation de la méthode verbo-tonale à l'Hôpital Beaujon, nous espérons expliquer la nature de ces progrès; c'est l'enchaînement des sons complexes qui est mieux perçu par le malade et non l'intensité d'un son pur qui s'accroît. Il y a amélioration qualitative et non quantitative de l'audition.

Les résultats sont importants quant à l'action sur le vertige, dans la maladie de Menière, où nous adjoignons à la technique habituelle, des injections locales, des altérations du ganglion sphéno-palatinaire par le produit. Nous avons eu des observations où les vertiges de Menière ont été améliorés par 6 injections dont 4 à une semaine d'intervalle, une injection de rappel un mois après la quatrième et une dernière trois mois après la cinquième.

Traumatisme. — L'injection comprend, pour un adulte, 15 cm³ de soluté; elle se fait sous le trochanter vers l'angle de la mâchoire; on infiltre le derme sans s'élever la région sous-cutanée. Les boules d'œdème indolument provoquées par le liquide se résorbent bien.

Dans les otites chroniques, les résultats ont été très importants; nous avons assésé des écoulements très anciens (8 observations) sans récidives, d'autres

... objective montrée dans cette énumération thérapeutique : c'est la permanence de l'action au niveau des tissus d'origine mésodermique, qu'il s'agisse des tissus de l'œil (corps ciliaire), des tissus conjonctifs de l'oreille moyenne, des tissus conjonctifs articulaires, tout se passe comme si c'était par l'amélioration des métabolismes au niveau d'un tissu conjonctif que ce traitement porte ses fruits. Il semble qu'à côté de l'action hyperémiante locale prolongée, ce mélange ait une action propre sur les terminaisons nerveuses; il serait intéressant de mesurer, en laboratoire, certaines chronaxies avant et après l'application du liquide au contact du nerf. La stimulation du cortex, soulignée par le D^r Aslan, de Bucarest, semble être également en cause.

Cependant, l'action sur les tissus originaires du mésoderme est tellement importante que ces traitements mériteraient le nom global de « MÉSOTÉRAPIE ».

Figura 2-13. Facsímil del ejemplar de La Presse Medicales del 4 de Junio de 1958 donde se utiliza por primera vez el neologismo "mesoterapia" por parte de Michel Pistor. Fondos bibliográficos del autor.

La vía de administración ID de medicamentos sigue un patrón farmacocinético y farmacodinámico completamente distinto al de otras vías parenterales (Corbel, 1986). Además, se han invocado microsistemas reflexológicos para explicar la potenciación de los resultados obtenidos (Ballesteros, 1983), las peculiaridades microcirculatorias del corion dérmico (Bicheron, 1981), las propiedades histológicas y funcionales del mesodermo (Daloz-Bourguignon, 1987) y la importancia de la circulación intersticial (Multedo, 1985).

Un estudio reciente (Milewski y Cols., 2015) corrobora que la absorción de ciertas macromoléculas es de 2 a 20 veces mayor cuando se administran por vía intradérmica que cuando se dan por vía subcutánea. La causa fundamental de esta aparente contradicción estribaría en las peculiaridades del lecho capilar de la dermis papilar o en la posible absorción linfática desde el espacio intradérmico. Estudios llevados a cabo en pacientes insulino dependientes ponen de relieve el valor de la vía intradérmica para mejorar el tiempo de inicio de la actividad de la insulina en adolescentes con diabetes tipo 1 (Norman y Cols., 2013), mejorar la adherencia de los pacientes a la terapia con insulina y ofrecer un potencial terapéutico significativo en el manejo de la enfermedad (McVey y Cols., 2012; Gupta y Cols., 2011). Para algunos autores, estas peculiaridades farmacocinéticas de la vía ID podrían ser útiles en algunos tratamientos, como el remplazo hormonal o el tratamiento del dolor, donde es beneficiosa una acción rápida, o en los casos en los que se busca la acción linfática directa, como en el tratamiento de algunos tipos de cáncer o en terapias inmunomoduladoras. Las peculiaridades de la estructura sanguínea y linfática del corion dérmico serían las responsables de esta mejor respuesta a los fármacos administrados por la vía ID frente a la vía subcutánea, al lograrse tasas de absorción mayores y por ende, mayor biodisponibilidad y actividad terapéutica (Harvey y Cols., 2011), tal y como se desarrolla en la teoría microcirculatoria postulada por Bicheron 30 años antes (1981).

Estudios de medicina nuclear han confirmado que la profundidad de inyección no es indiferente (Kaplan y Cols., 1988; Kaplan, 1991, 1992) y se define el concepto de interface-meso, según el cual, la acción local de los medicamentos se debe a la

estimulación de los receptores dérmicos (circulatorios, neurológicos, inmunitarios) siendo muy importante obtener la mayor estimulación posible de los mismos para conseguir un efecto terapéutico importante; es decir: para un mismo volumen administrado, cuanto mayor es la fragmentación, más importante es el efecto terapéutico obtenido. De forma indirecta, puede asimilarse este concepto a la superficie de contacto que genera cada microgota del medicamento administrado.

Si se fragmenta de forma progresiva un centímetro cúbico de cualquier sustancia y calculamos los valores del volumen de cada una de las dosis así como la superficie de contacto que genera cada una de las pequeñas esferas formadas, podemos comprobar cómo la suma de las superficies generadas incrementa el valor de la superficie de la dosis única de una forma importante, tal y como se refleja en la tabla 2-5.

nº de dosis por cc.	Volumen por dosis en cc	Superficie por dosis en cm ²	Interface-meso en cm ²
3	0'33	2'30937	6'92811
5	0'2	1'655383	8'269315
10	0'1	1'0418732	10'418732
100	0'01	0'224465	22'4465
150	0'006	0'159680	23'952
200	0'005	0'141403	28'2806

Tabla 2-5. Concepto de interface-meso que demuestra cómo la fragmentación de la dosis incrementa la superficie de contacto del producto activo

El interface-meso se puede calcular aplicando la fórmula (Ordiz, 1996):

$$St = 4\pi\sqrt{(3Vt)^2/(4\pi n)^2}$$

St será el interface-meso; n, el número de dosis administradas; Vt el volumen total administrado.

La aplicación de esta fórmula constata cómo la superficie de contacto aumenta en función de la fragmentación de las dosis administradas.

A una conclusión similar se llegó en un estudio publicado en 2010 en el que se puso de manifiesto que la fragmentación de las dosis de diferentes productos administrados por vía intradérmica mediante el uso de agujas huecas incrementa la cantidad total del principio activo que se libera en la dermis (Wonglertnirant y Cols., 2010).

Por tanto, se puede concluir que *la profundidad y la fragmentación de las dosis administradas son dos conceptos claves para conseguir óptimos resultados mediante la ID.*

La acción de la ID puede explicarse por mecanismos diversos y concomitantes. Se sabe que desencadena respuestas reflexológicas mediante la estimulación repetida de receptores celulares cutáneos de distinta índole: neurológicos, vegetativos, inmunológicos, vasculares y endocrinos. A esto se añade la propia actividad del medicamento empleado que ve modificada su farmacocinética y potenciada su actividad terapéutica con menos dosis que las requeridas por otras vías parenterales de administración.

Hasta el inicio de la década de los 80 del siglo XX, la ID se consideraba una metodología empírica. En esas fechas, Pitzurra, del Instituto de Microbiología de la Facultad de Medicina y Cirugía de la Universidad de Perugia, comenzó a estudiar los efectos de las inyecciones intradérmicas buscando posibles explicaciones a los resultados clínicos obtenidos. En un primer estudio farmacocinético demostró que un AINE (ketoprofeno sódico) adquiere características farmacocinéticas propias cuando se administra ID confirmando las peculiaridades farmacocinéticas de la vía ID: prolongada persistencia del medicamento estudiado en el punto de inyección, lento y progresivo paso a los tejidos vecinos y escasa difusión a la circulación sistémica (Binaglia y Cols., 1981b). Estos hallazgos podrían explicar, al menos en parte, los resultados clínicos obtenidos con la aplicación de medicamentos por vía ID.

Posteriormente se utilizaron medicamentos con una difusión más simple que el ketoprofeno (penicilina G) y confirmaron que la inyección ID de penicilina permite al fármaco desarrollar una acción local más intensa reduciendo al mínimo su difusión al resto del organismo por lo que sugiere que son precisas dosis menores para tener efectos terapéuticos (Binaglia y Cols., 1981a).

Corbel (1986), por su lado, realizó un estudio escintigráfico con trazadores radiactivos sobre las cinéticas locales, regionales y generales comparando la vía ID con la IV. Sus

resultados indican, por una parte, que la difusión del trazador a partir de la piel utiliza las vías microcirculatorias que conducen a la circulación general antes de una difusión tisular; por otra que el efecto terapéutico no está relacionado con la cantidad inicial del medicamento administrado ni con su vida media; finalmente, que la vía ID ralentiza la difusión y la biodistribución del producto inyectado confirmando que la profundidad de inyección condiciona la velocidad de difusión y la actividad del fármaco.

Kaplan (1989) atribuye las peculiaridades farmacocinéticas de la vía ID a la estructura histológica del corion dérmico y de la matriz extracelular, destacando el papel del linfangión, de tal manera que cuanto mayor sea la fragmentación de las dosis administradas, mayor será la modificación de la presión osmótica alrededor de más linfangiones, y mayor la difusión loco-regional del medicamento. Cuando se realiza la inyección superficial (en dermis papilar) las moléculas de pequeño tamaño drenan al linfangión rápidamente mientras que las mayores son parcialmente retenidas en los linfangiones de las cadenas eferentes prolongando el tiempo de contacto. Si la inyección se hace más profunda del corion dérmico, la efracción mecánica de la aguja permite la entrada del fármaco en el sistema linfático pero también en la circulación arteriovenosa, independientemente del tamaño de la molécula. El efecto *retard* de la ID se debe, pues, al nivel de inyección, por lo que *esta debe hacerse a menos de 2 mm de profundidad y lo más fragmentada posible* para activar al máximo los linfangiones y asegurar la permanencia del producto utilizado en el intersticio.

2.3. Moléculas estudiadas

2.3.1. Procaína

Denominación común internacional: 2-Diethylaminoethyl 4-aminobenzoate hydrochloride. Sus propiedades químicas y físicas están recogidas en la página web National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=4914, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4914> (accessed Aug. 26, 2015), y se reflejan en la tabla 2-6.

Farmacocinéticamente la procaína se caracteriza por su escasa absorción a través de la piel o de mucosas intactas por lo que suele utilizarse por vía parenteral. Una vez administrada se hidroliza de forma rápida por una colinesterasa plasmática que la fragmenta en dos metabolitos: ácido para-amino-benzoico y en dietil-amino-etanol. Parte de su metabolización puede llevarse a cabo en el hígado y solo un 6% se une a proteínas plasmáticas. Alrededor del 80% del ácido para-amino-benzoico y el 30% del dietil-amino-etanol se excretan por la orina, y el resto se metaboliza en el hígado.

Binaglia (Binaglia y Cols., 1981) valoraron su difusión por vía intradérmica vs vía intramuscular mediante análisis cromatográfico.

En el presente trabajo se ha utilizado la solución inyectable de nombre comercial Procaína Serra que contiene 20 mg/ml y se presenta en ampollas de 10 ml.

La composición del gel de procaína empleado se recoge en la tabla 4-4.

2.3.2. Ketoprofeno

Denominación común internacional: 2-(3-Benzoylphenyl)propionic acid.

Sus propiedades físicas, obtenidas de la página web National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=3825, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3825> (accessed Aug. 26, 2015) se recogen en la tabla 2-6.

El ketoprofeno (KP) es un ácido débil ($pK_a = 4,5$) con lipofilia alta, que se presenta como un polvo cristalino, blanco e inodoro, prácticamente insoluble en agua y soluble en etanol al 96 %, éter, acetato de etilo, acetona y cloroformo.

Es un potente antiinflamatorio no esteroideo de amplia utilización en el tratamiento de procesos reumatológicos y enfermedades asociadas. Por vía oral provoca alteraciones gástricas entre el 10% y el 30% de los casos, lo que condiciona el abandono del tratamiento hasta en un 15% de los pacientes (Vučen y Cols., 2013). La aplicación transdérmica evita el primer paso hepático que metabolizaría al menos parcialmente la droga a la vez que reduce la incidencia de los efectos adversos de tipo

gástrico que hemos apuntado. También se ha descrito que la vía transdérmica reduce las interacciones medicamentosas con otras drogas y la nefrotoxicidad (Heyneman y Cols., 2000). *Per os*, su absorción es muy rápida, obteniéndose niveles plasmáticos máximos entre 0'5 y 2 horas. Se conjuga al 99% con albúmina. Su metabolización hepática también es muy rápida, mediante la conjugación con ácido glucurónico sin formar metabolitos activos. La vida media de eliminación es de 2 a 4 horas. La administración transcutánea de ketoprofeno es una alternativa a considerar puesto que penetra lentamente a través de las capas cutáneas y ha demostrado su efectividad en el tratamiento de situaciones inflamatorias localizadas (Mazières, 2005).

En el presente estudio se ha investigado si el uso de sistemas potenciadores de la penetración transcutánea como pueden ser las microperforaciones, la electro-iontoporación o la administración intradérmica aumentan su presencia en la piel y durante cuánto tiempo. Un estudio realizado en ratas ha demostrado la utilidad de las microagujas para aumentar el paso transdérmico de Ketoprofeno (So y Cols., 2009), mientras que otro llevado a cabo en el mismo animal de experimentación demostró la efectividad de la iontoforesis en este cometido (Okuno y Cols., 2008). Por vía intradérmica fue utilizado por Binaglia (1981) en conejos.

El uso crónico por vía oral de la gran mayoría de los fármacos antiinflamatorios se relaciona con la aparición de efectos colaterales de tipo digestivo, hepatotoxicidad o fallo renal. La idea de emplear la piel como vía de administración surge de forma cuasi natural ya que la mayor parte de las enfermedades inflamatorias se desarrollan en tejidos próximos a la superficie cutánea. Sin embargo, el hecho de que la piel actúe como una barrera muy eficaz frente a la penetración de macromoléculas no lipofílicas, ha obligado a desarrollar estrategias que faciliten el paso transdérmico de estos medicamentos para que puedan alcanzar dosis terapéuticas en los lugares de actuación, sin sufrir el primer proceso metabólico del paso hepático y sin alterar la mucosa digestiva. Nuestro objetivo es investigar diversas técnicas de permeación cutánea, tales como el uso de microagujas (MN), la electroporación (EP) o la mesoterapia/intradermoterapia (ID) comparándolas entre sí y con la aplicación tópica.

El proceso de absorción cutánea conlleva tres etapas consecutivas: es la *penetración* o paso de la sustancia a la capa córnea; la *permeación* o paso de la sustancia hacia capas más profundas; y, finalmente la *resorción* o entrada de la sustancia aplicada dentro del torrente circulatorio (Bolzinger y Cols., 2012). En el caso del ketoprofeno parece que su lipofilidad es un factor determinante para realizar todos estos pasos de forma correcta (Tashiro y Cols., 2000). Su peso molecular es de 260 Da, el menor de los antiinflamatorios no esteroideos habitualmente empleados por vía transcutánea. También es uno de los de más alta permeabilidad cutánea. La ulcerogenicidad por vía transcutánea es 10 veces menor que cuando se administra por vía oral (Adachi y Cols., 2011). Este fármaco cumple una serie de características que lo hacen especialmente útil para su utilización en formulaciones tópicas, tales como tener un peso molecular relativamente bajo, un bajo punto de fusión y una alta lipofilidad. Los trabajos experimentales han demostrado la inhibición de la prostaglandina E2 después del uso de parches con Ketoprofeno 0'3% tanto en la piel como líquido sinovial de la articulación de la rodilla en modelos animales (Shinkai y Cols., 2008). Aunque el estrato córneo del cerdo es más grueso que el estrato córneo humano, este modelo animal se considera muy útil para estudiar la farmacocinética del ketoprofeno (Horie y Cols., 2009).

El medicamento empleado en este trabajo ha sido Orudis® Laboratorio Sanofi-Aventis. Presentación comercial en ampollas de 2 ml. 100 mg/ampolla
La composición del gel de Orudis se preparó según se recoge en la tabla 4-4.

2.3.3. Biotina

Denominación común internacional: Biotin

Sinónimos: Coenzyme R; Vitamin H

Nombre químico: cis-5-(Hexahydro-2-oxo-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)valeric acid

Sus propiedades químicas y físicas obtenidas de la página web National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=171548, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/171548> (accessed Aug. 26, 2015) se recogen en la tabla 2-6.

Las farmacopeas europea y norteamericana (Ph.Eur. 8.5 y USP 38) describen su presentación en forma de polvo blanco o como cristales transparentes, muy poco soluble en agua y en alcohol y prácticamente insoluble en acetona, que se disuelve fácilmente en soluciones diluidas de hidróxidos alcalinos.

Es una coenzima esencial del metabolismo de las grasas y participa en otras reacciones de carboxilación. Está clasificada como una vitamina del complejo B. Como micronutriente esencial para el crecimiento, desarrollo y función celular normal, su deficiencia provoca alteraciones dermatológicas y manifestaciones neurocutáneas en la piel y anexos, como son descamación y alopecia. Se ha descubierto la existencia de un carrier transportador de biotina en la piel humana que mediaría en su captación y paso transcelular (Grafe y Cols., 2003).

En el presente trabajo se emplearon 4 ml de la preparación comercial Medebiotin fuerte®, de los laboratorios Medea S.A., que se presenta en ampollas inyectables de 1 ml cada una de las cuales contiene 5 mg de biotina sódica que equivalen a 4,6 mg de biotina. El gel de biotina se preparó según se recoge en la tabla 4-4.

2.3.4. Cafeína

Denominación común internacional. Caffeine.

Nombre químico: 1,3,7-Trimethylpurine-2,6(3H,1H)-dione; 1,3,7-Trimethylxanthine; 7-Methyltheophylline

Sus propiedades físicas y químicas, obtenidas de la página web National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=2519, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2519> (accessed Aug. 26, 2015) están reflejadas en la tabla 2-6

La Farmacopea Europea y la Americana la describen como un polvo blanco inodoro cristalino o como cristales blancos con aspecto sedoso y relucientes agujas. Se sublima fácilmente, es muy poco soluble en agua aunque es totalmente soluble en agua hirviendo y ligeramente soluble en alcohol deshidratado. Se disuelve en soluciones concentradas de benzoatos o salicilatos alcalinos.

Esta molécula ha sido utilizada para llevar a cabo un estudio *in vitro* del efecto de la electroporación sobre piel de cerdo (Marra y Cols., 2008). Su uso tópico y transdérmico tiene aplicaciones farmacéuticas y cosméticas y ha sido utilizada como modelo de componente hidrofílico en diferentes trabajos sobre toxicología cutánea, destacándose su inusual solubilidad en disolventes no acuosos y su capacidad para formar agregados en soluciones acuosas (Luo y Lane, 2015). Se ha estudiado tanto *in vitro* como *in vivo* a pesar de que no posea las propiedades de un penetrante ideal de la piel ya que es hidrofílica con un Log P de -0.07. Aunque faltan estudios que confirme su utilidad, se ha destacado que las mayores ventajas que aporta el uso tópico de cafeína con objetivos cosméticos es que, por un lado, previene la acumulación excesiva de grasa a la vez que incrementa el drenaje linfático y es fotoprotector.

En este estudio se empleó la presentación *Reducing caffeine ampoules* comercializada por el laboratorio Mesoesthetic en ampollas de 2 ml conteniendo cafeína al 20% en cada una de ellas.

La composición del gel de cafeína empleado se recoge en la tabla 4-4.

Sustancia	Ketoprofeno	Biotina	Procaína	Cafeína
Fórmula molecular	$C_{16}H_{14}O_3$	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	$C_{13}H_{20}N_2O_2$	$C_8H_{10}N_4O_2$
Peso molecular	254.3 g/mol	244.31 g/mol	272.8 g/mol	194.2 g/mol
pKa	4.45	4.51	8.05	14
Solubilidad en agua	51 mg/L	220 mg/L	9450 mg/L	21600 mg/L
Punto de fusión	94°C	232°C	61°C	238°C
LogP	3.12	0.5	1.92	-0.07
Carga	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva

Objetivos

3. Objetivos.

El **objetivo general** del presente trabajo es contribuir al conocimiento de la piel como vía de administración de moléculas con fines cosméticos o terapéuticos.

Los **objetivos específicos** son:

1. Investigar las posibilidades terapéuticas de las vías transdérmicas de administración de medicamentos.
2. Analizar el efecto de las técnicas transdérmicas de administración de medicamentos sobre los elementos celulares que componen la piel.
3. Estudiar la farmacocinética de las moléculas investigadas (procaína, ketoprofeno, biotina y cafeína) tras su administración cutánea.

Material y técnicas

4. Material y técnicas.

4.1. Material

4.1.1. Animal de experimentación

Para estudiar el grado de penetración o absorción percutánea de sustancias químicas la mejor opción es el estudio *in vivo* en humanos. Esto plantea una serie de problemas éticos que hacen inviable esta posibilidad. En nuestro estudio se ha utilizado el cerdo ya que por las características de su piel se considera buen modelo experimental (Jung y Maibach, 2015; Summerfield y Cols., 2014). Este animal presenta una serie de ventajas sobre otros mamíferos. A saber: su piel es fácil de obtener, la extensión de la misma permite realizar el diseño experimental utilizando menos animales que con otras especies y, en tercer lugar, es un animal manejable y adaptado a las instalaciones del Bioterio de la Universidad de Oviedo.

Además, la piel porcina tiene muchas similitudes con la piel humana que se resumen en la tabla 4-1 y cuyas características se expusieron en detalle en el Estado Actual del Problema.

Tabla 4-1. Similitudes entre la piel de cerdo y la humana
Clara diferenciación entre la epidermis y la dermis
Estructura folicular muy similar
El tiempo de recambio y la queratina son muy similares
El estrato corneo contiene prácticamente las mismas proteínas
La unión dermo-epidérmica también muestra grandes similitudes
La dermis porcina está bien estructurada y es rica en tejido elástico
El número, tamaño, distribución y comunicaciones de los vasos dérmicos son similares en ambas especies
La arquitectura de las fibras colágenas dérmicas, su disposición y espesor también son similares
Comparten grandes similitudes desde el punto de vista inmunohistoquímico y bioquímico
El espesor de las capas de la piel es prácticamente igual en la piel porcina y en la humana

A pesar de todas estas similitudes también hay que destacar ligeras diferencias como son que la vascularización es más rica en humanos que en cerdos y que las glándulas

sudoríparas eccrinas son más abundantes en la piel humana, mientras que las glándulas apocrinas lo son en la piel porcina.

Para la realización del presente trabajo de Tesis se emplearon 6 cerdos de raza cruzada Pietrain x Duroc, 4 hembras y 2 machos castrados, con pesos comprendidos entre 35 y 38 kg. La manipulación de los animales se llevó a cabo cumpliendo los procedimientos recomendados por el *Department of Biomedical Sciences & Biomedical Ethics* de la Universidad de Birmingham (Morton y Cols., 2001). El protocolo de experimentación fue aprobado por la Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos del Gobierno del Principado de Asturias (número de autorización PROAE 09/2014).

Previo a la realización de los procedimientos experimentales que se describen a continuación, los animales fueron premedicados con Azaperona (2 mg/kg, IM) y Ketamina (10 mg/kg) + Xilacina (0,08 mg/kg), IM. Tras la sedación los animales pasaron al prequirófano donde se les colocó un catéter 20 G en la vena auricular y se procedió a la aplicación de Buprenorfina 0.01 mg/kg subcutánea.

La zona de la piel sobre la que se realizaron los experimentos se lavó con una solución jabonosa antiséptica que se secó posteriormente. A continuación, se rasuró el pelo a ambos lados de los lomos con una maquinilla eléctrica garantizando que en el proceso no se produjeran lesiones mecánicas de la epidermis. Posteriormente se aseptizó nuevamente la piel empleando una solución de povidona yodada y se secó cuidadosamente con gasas estériles.

Sobre la superficie cutánea depilada, en cada lado de los animales se dibujaron dos cuadrados de 10x10 centímetros que se subdividieron en cuatro cuadrantes de 5x5 cm cada uno mediante un marcador quirúrgico estéril y desechable de la marca *Devon® Skin Marker*. Sobre los cuadrantes pequeños se identificaron los tiempos de toma de muestra como T0, T15, T30 y T60. En el lado derecho estos tiempos están referidos en sentido antihorario y en el lado izquierdo en sentido horario, tomando como referencia que el cuadrante correspondiente al T0 es siempre el más próximo a la cabeza del animal (Figura 4.1).

En los cuadrantes mayores del lado derecho de los animales se realizaron las técnicas MN e ID, mientras que en los cuadrantes mayores izquierdos se efectuaron las técnicas EP y MN+EP.

Ya en el quirófano se preoxigenaron los animales y se les administró suero a razón de 10ml/kg/h, tras lo cual se les indujo anestesia intravenosa con propofol a dosis de 1 a 4 mg/kg (variables según necesidad del animal a anestesiarse) y se intubaron. El mantenimiento de la anestesia se realizó con isofluorano al 1-2,5%.

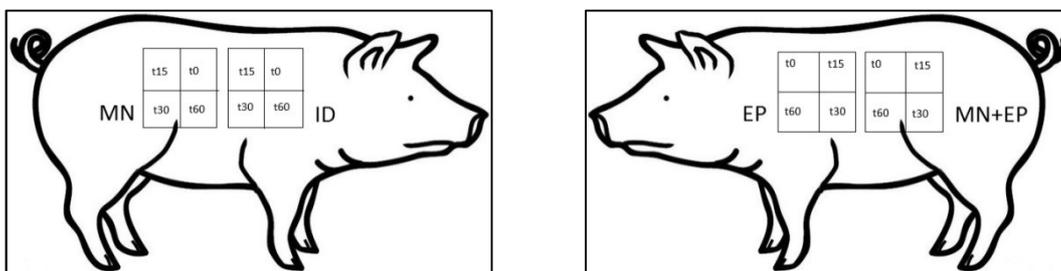


Figura 4-1. Diseño esquemático del protocolo de estudio en los animales de experimentación.



Figura 4-2. Las fotografías superiores muestran el diseño del estudio en vivo. En la fotografía inferior izquierda se ve la toma de muestras mediante punch dérmico y a la derecha la sutura de las heridas después de realizadas las tomas de muestra.

Inmediatamente después se pasó a la aplicación de los diferentes productos y con las distintas técnicas sobre los cuadrantes preestablecidos. Se consideró tiempo 0 (T0) el

momento de finalización de la técnica y el inicio de la toma de las muestras de tejido. La toma de biopsias se repitió a los 15 (T15), 30 (T30) y 60 (T60) minutos. La toma de las muestras se realizó mediante un punch de 8 mm de diámetro (Figura 4.2). De cada cuadrante se recogieron dos muestras, una de las cuales se fijó en formol para ser utilizada en los estudios estructurales y de inmunohistoquímica, y la otra se conservó a -40°C hasta el momento de su utilización en los estudios de HPLC. Finalizado el proceso experimental, las heridas se suturaron con seda 00, se lavaron con una solución antiséptica y se aplicaron tres capas superpuestas de una película acrílica semipermeable (Nobecutan®) para garantizar que la zona estudiada no quedara expuesta a una posible contaminación ambiental a la vez que impide la maceración de las heridas al no ser un apósito oclusivo. Como medida profiláctica se administró penicilina-estreptomicina 20.000 UI /kg en IM/día durante 3 días consecutivos.

Inmediatamente después, los animales fueron devueltos a la granja de procedencia donde fueron vigilados estrechamente para descartar signos de toxicidad y/o sensibilización cutánea, tal como recomienda la *American Association for Laboratory Animal Science* (Turner y Cols., 2011 a y 2011 b). Los animales regresaron al Bioterio de la Universidad de Oviedo a los 7 (D7) y 14 (D14) días para proceder a una nueva toma de biopsias. Finalmente, se procedió sedación con ketamina/xilacina, y posterior eutanasia con pentobarbital sódico 100 mg/kg por vía IV.

De los seis animales programados originalmente para la realización de los experimentos, se pudo obtener material a T0, T15, T30, T60, D7 y D14 de cinco de ellos puesto que el sexto animal falleció antes de completar la toma de muestras correspondientes a los días 7 y 14.

4.1.2. Equipos utilizados

4.1.2.1. TMT®

El equipo de electro-iontoporación (Mesoesthetic Medical Devices, Viladecans, Barcelona), está compuesto por un módulo principal que contiene el alimentador de energía, la unidad de procesamiento central y el circuito necesario para la generación eléctrica del pulso. Consiste en una caja con dos tomas de conexión en el panel frontal para poder conectar 2 salidas de tratamiento. Consta de un generador de onda

rectificada pulsada, modulada por una señal triangular envolvente de 3 segundos de periodo, con una alimentación de 12 V de corriente continua y estabilizada, con conexión a la red de 230 V (Figura 4-3).

El aparato dispone de una pantalla grafica (LCD) que permite visualizar las opciones de los diferentes programas de tratamiento. La introducción de los datos y la selección de los programas se realiza mediante un teclado de membrana serigrafiado con las diferentes opciones: se pueden seleccionar 6 diferentes programas de tratamiento, en los cuales varían los parámetros de tiempo, pulso, frecuencia y amplitud. El rango de los datos es:

Pulso (P): 150 -1280 useg.

Periodo (T): 0,56-5 mseg.

Frecuencia (F): 625-1780 Hz.

Amplitud (Vp; valores de pico – en vacío): 40-50 V.

Componente continua: 10-15 v

Componente alterna: 30-35 v

Está programado para generar una corriente alterna de frecuencia media. Una onda sinusoidal rectificada con pulso y frecuencia variable se superpone sobre el pulso de corriente, y ambos pueden controlarse a través de la pantalla táctil y el teclado. La unidad de procesamiento central almacena los datos programados y regula la salida de energía al aplicador. Se establece el tiempo de aplicación (15 minutos) y la polaridad de la molécula que se investiga, así como el programa a utilizar.



Figura 4-3. Vista del equipo de electroporación utilizado con un detalle del aplicador roll-on.

La molécula a estudiar se introduce en un recipiente de material plástico que se acopla al aplicador *roll-on* de acero inoxidable conectado eléctricamente a la unidad de

procesamiento central mediante los cables conductores. El circuito se cierra mediante una masa que se fijó, en este trabajo, con venda elástica a una de las patas traseras de los animales de experimentación.

La actividad eléctrica del electroporador en “on” está programada con un tren de cuatro pulsos regulares de 30-35 V en un tiempo entre 1-10 ms con un intervalo de 0,5 ms entre cada tres de pulsos durante los 15 minutos de la aplicación.

4.1.2.2. PISTOLA DHN3®

Fabricado en Francia (Techdent) es un equipo médico de asistencia para mesoterapia que permite programar distintas modalidades de inyección intradérmica, desde la inyección continua a fragmentación de dosis (120 dosis/cc, 70 dosis/cc o 40 dosis/cc).



Figura 4-4. Pistola de mesoterapia DHN3® empleada en nuestro trabajo

Asimismo, permite calibrar la profundidad de inyección y dispone de una placa estabilizadora que garantiza que la aguja no se deslice sobre la piel durante la aplicación, cumpliendo con las recomendaciones ya mencionadas de la *American Association for Laboratory Animal Science*. Dispone de un kit compuesto por una jeringa de 10 cc, un dispositivo valvular de corte del flujo, una aguja BD30G ½ y una placa estabilizadora de la piel.

4.1.2.3. REVIVE MN®

Es un equipo de multipunción (MT.DERM GmbH, de Berlin) formado por: un micromotor que puede ser programado a diferentes velocidades y que acciona un cabezal dotado de 6 microagujas de longitud máxima 1,5 mm y un diámetro máximo de 0,2 mm. Entre cada aguja hay una separación de 1,5 mm; y un cabezal de agujas basculantes que se adapta a la superficie de la zona de la piel tratada. Permite hacer

orificios perpendiculares a la barrera cutánea sin producir desgarros o lesiones de la superficie de la piel (Figuras 4-5 y 4-6).



Figura 4-5.Equipo de electroporación empleado en nuestra tesis



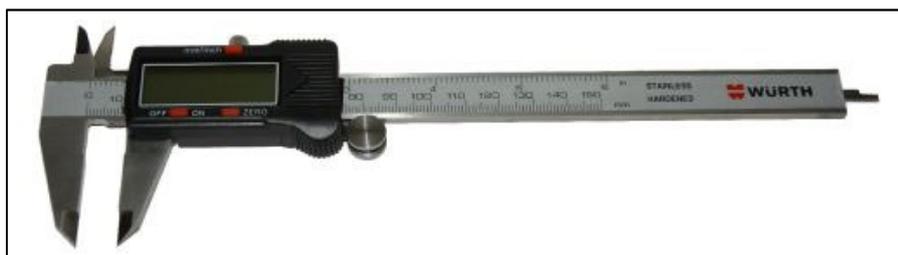
Figura 4-6. Macrofotografía del cabezal de 6 agujas empleado



Se aplicó sobre la piel del animal a una velocidad de 150 revoluciones por minuto y a una profundidad de 0'8 mm durante 10 minutos. En este programa y con este tiempo de aplicación se consigue la formación de un eritema más o menos intenso sobre la piel aplicada que refleja el efecto vasodilatador buscado.

4.1.2.4. Calibre – Pie de rey

Para medir el grosor de la piel y determinar la profundidad de inyección se utilizó un calibre digital marca Würth con un intervalo de medición de 0 a 150 mm, unidades de medida de 0,01 mm y una precisión de 0,03 mm (Figura 4-7).



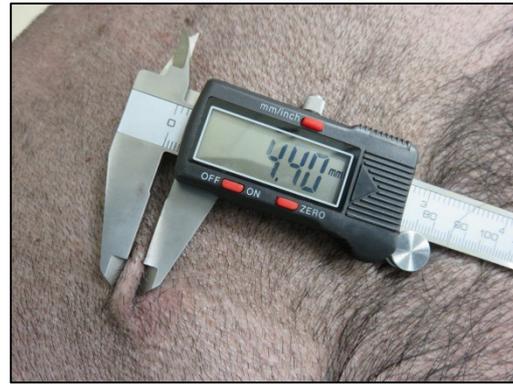


Figura 4-7. Imagen del calibre digital utilizado y de la toma de datos.

El grosor de la piel de los distintos animales utilizados en el estudio queda reflejado en la tabla 4-2.

Tabla 4-2. Grosor del pliegue de la piel de los animales utilizados en la experimentación expresado en milímetros y cálculo de la profundidad de inyección y dosis por punto en función de este parámetro.

Animal nº	Pliegue	Profundidad	Nº de dosis	Dosis por punto
55	2.32	1.16	69	0.058
57	4.05	2.02	40	0.10
58	4.52	2.26	35	0.113
59	4.40	2.20	36	0.11
68	5.40	2.70	30	0.135
69	4.36	2.18	37	0.109

4.1.3 Sustancias estudiadas

Para la realización del presente estudio se han utilizado medicamentos autorizados por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios para uso humano por vía parenteral (Orudis®, Medebiotin fuerte® y Procaína Serra®). La cafeína, fue elaborada por el laboratorio Mesoesthetic siguiendo las pautas establecidas para la elaboración de una solución estéril y apirógena.

Los geles de estos productos empleados con la técnica de electro-ionto-poración fueron elaborados por el laboratorio Mesoesthetic.

4.1.3.1 Ketoprofeno

Se emplearon 4 ml de la presentación comercial Orudis® solución inyectable comercializada por Sanofi. El principio activo es Ketoprofeno 100 mg/2ml y como excipiente contiene alcohol bencílico.

4.1.3.2 Biotina

Se usaron 4 ml de Medebiotin® fuerte solución inyectable, del laboratorio Medea, presentado en ampollas de 5 mg/1 ml. Cada ampolla contiene 5 mg de biotina sódica (equivalente a 4,6 mg de biotina). Los demás componentes son: hidróxido sódico y agua para preparaciones inyectables.

4.1.3.3 Procaína

Se han utilizado 4 ml de Procaína Serra 10 mg/ml comercializada en ampollas de 5 ml (50 mg/5 ml). Como excipientes añade ácido clorhídrico (para ajustar el pH) y agua para preparaciones inyectables.

4.1.3.4. Cafeína

Utilizamos una preparación de cafeína elaborada por el laboratorio Mesoestetic en formulación magistral en condiciones idóneas para su inyección ID. La composición de la preparación estudiada se recoge en la tabla 4-3:

Solución de cafeína inyectable	
Ingrediente	% p/p
Cafeína anhidra	3.00
Sodio benzoato	3.00
Agua milliQ csp 100	94.00

Tabla 4-3. Composición de la solución de cafeína inyectable

4.2. Técnicas de aplicación de los fármacos

4.2.1. Microagujas

Durante el proceso de microperforación se irrigió la superficie de 10x10 cm² con 5 ml de la solución a estudiar, procurando que la formación de los microporos fuera

uniforme en toda la superficie constatando la aparición de eritema y de pequeñas sufusiones sanguíneas.

4.2.2. Electroporación-iontoforación

Las sustancias a estudiar fueron preparadas por el laboratorio Mesoesthetic en forma de gel cuya composición se recoge en la tabla 4-4. El depósito conectado al dispositivo *roll-on* del equipo permite aplicar cada producto sobre la piel, mientras que la masa que cierra el circuito se fija en una de las patas traseras del animal para garantizar un contacto óptimo.

Se respetó la polaridad de cada una de las moléculas para facilitar el fenómeno de electrorrepulsión y se programó el equipo para su funcionamiento durante 15 minutos. En este lapso de tiempo se realizan movimientos circulares sobre el cuadrante de piel correspondiente a la sustancia estudio. El apagado del equipo es automático pasado el tiempo prefijado.

Gel de ketoprofeno		Gel de biotina	
Ingrediente	% p/p	Ingrediente	%p/p
Ketoprofeno	5.00	Biotina	0.50
Methocel E4M	1.60	Methocel E4M	1.60
Kathon CG	0.10	Kathon CG	0.10
Agua p. csp 100	93.30	Agua p. csp 100	97.80

Gel de procaína		Gel de cafeína	
Ingrediente	% p/p	Ingrediente	%p/p
Procaína clorhidrato	2.00	Cafeína anhidra	3.00
Methocel E4M	1.60	Sodio benzoato	3.00
Kathon CG	0.10	Methocel E4M	1.60
Agua p. csp 100	96.30	Kathon CG	0,10
		Agua p. csp 100	92.30

Tabla 4-4. Composición de los distintos geles utilizados en EP en esta tesis

Por los estudios de Murthy (Murthy y Cols., 2003), se conoce la influencia del pH de las moléculas a transportar a través de la piel. Estos autores sugieren que cambios en el pH producen alteraciones en las multicapas lipídicas del estrato córneo, modificando su permeabilidad, y sitúan entre 5 y 7,5 el pH que deben tener las sustancias usadas con electroporación para obtener un máximo de penetración transcutánea. Los geles de las moléculas utilizadas en el presente trabajo se recogen en la tabla 4-5.

Producto	pH medido	Rango
Ketoprofeno (5%)	6,6	6,2 – 7,0
Biotina (0,50%)	6,7	6,3 – 7,1
Procaina HCl (2%)	5,4	5,1 – 5,8
Cafeina (3%)	7,4	7,1 – 7,7

Tabla 4-5. pH de los productos estudiados.

4.2.3. Inyección intradérmica

Se ha realizado según el procedimiento propuesto por Chos (1993) que considera que la profundidad máxima de las inyecciones intradérmicas viene determinada por la ecuación:

$$PI_{\text{máx}} = PC_{\text{mm}}/2$$

$PI_{\text{máx}}$ es la profundidad máxima de inyección expresada en milímetros y PC_{mm} el valor del pliegue cutáneo de la zona a pinchar expresada también en milímetros y medida con la ayuda del calibre digital (ver tabla 4-2). Dicha fórmula garantiza que la inyección de los productos utilizados se realice a nivel intradérmico (George, 2014) (Morton y Cols., 2001).

En cuanto a la cantidad de medicamento a administrar por punto, se determinó según la ecuación:

$$QI_{\text{ml}} = PI_{\text{mm}}/20$$

en la que QI_{ml} es la cantidad de producto administrado por unidad de inyección expresada en mililitros y PI es la profundidad de inyección expresada en milímetros (ver tabla 4-2). Las dosis administradas cumplen con los volúmenes recomendados por la *American Association for Laboratory Animal Science* (Turner y Cols., 2011).

El producto a estudio se distribuye en el dorso del animal a ambos lados de su columna vertebral, en un cuadrante de piel de 100 cm² inyectando las dosis por cuadrante de manera uniforme. El total de dosis utilizada fue de 4 ml repartidos en los cuadrantes correspondientes.

Para la inyección se utilizaron jeringas de 10 ml de tres cuerpos y cono central que montaban agujas Beckton-Dikinson 30G y 13 mm de longitud, oportunamente limitada

su profundidad en el equipo de inyección de acuerdo con el espesor de la piel del animal correspondiente (Tabla 4-2).

4.3. Técnicas de estudio de las muestras

4.3.1. Técnicas estructurales

De las 157 muestras obtenidas se eligieron 12 por ser las más representativas en base a los datos previos obtenidos mediante HPLC, correspondientes a cada una de las técnicas a estudio y en los tiempos T60, D7 y D14 por ser éstos los más adecuados para valorar una respuesta histológica de tipo inmediato (T60) y retardado a corto y medio plazo (D7 y D14 respectivamente), tal y como se relacionan en la tabla 4-6.

Muestra	Producto	Tiempo	Técnica
1	Ninguno: control	T0	Ninguna
37	BIOTINA	T60	MN+EP
83	CAFEÍNA	T60	EP
102	CAFEÍNA	D7	MN+EP
104	CAFEÍNA	D7	MN
106	PROCAINA	D7	EP
138	BIOTINA	T60	MN
141	KETOPROFENO	T60	ID
145	BIOTINA	D7	ID
147	PROCAINA	D14	MN
151	CAFEINA	D14	EP
155	BIOTINA	D14	MN+EP
157	BIOTINA	D14	ID

Tabla 4-6 Relación de las muestras utilizadas para los estudios morfológicos y de inmunohistoquímica.

Las piezas de piel se procesaron de rutina para su inclusión en parafina y de la parte central de los bloques se obtuvieron cortes seriados a un grosor de 10 μ . Tras un secado en estufa a 37°C, las secciones de los bloques correspondientes a los experimentos seleccionados se desparafinizaron mediante dos baños en xilol y paso por una batería de etanoles de gradación decreciente, para terminar con hidratación

de los cortes con agua corriente. El estudio estructural se llevó a cabo mediante las técnicas de hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson.

La técnica de la hematoxilina-eosina se realizó de manera rutinaria en un procesador automático. Para la realización de la técnica del tricrómico de Masson las secciones hidratadas se pasan por hematoxilina de Weigert (5 min), después se lavan con agua corriente (10 min), seguido de tinción en fucsina de Ponceau (5 min), ácido fosfomolibdico (5 min) y verde luz (5-7 min). Mediante esta técnica el tejido conectivo aparece de color verde, el tejido epitelial del color rojo y el muscular pardo.

4.3.2. Técnicas de microscopía electrónica de transmisión y de barrido.

Este estudio se realizó sobre muestras de piel de un animal de 4 meses de edad y 16 kg de peso obtenidas en un plazo máximo de 2 horas después de su sacrificio en el matadero municipal de Messina (Italia). Dichas muestras se procesaron para su inclusión en resina Durcapan (Fluka) siguiendo el siguiente procedimiento: lavado repetido en PBS 0.1 M (pH 7.4) durante dos días, y posterior deshidratación en acetona de gradaciones crecientes (50%, 70%, 90% y acetona anhidra). A continuación las piezas se pasaron por mezclas de acetona anhidra y resina de concentraciones crecientes (3:1, 1:1, 1:3) y finalmente en resina. Cada paso tuvo una duración de una hora y se realizó en estufa a 60° C. Tras la confección de los bloques se realizaron cortes semifinos que se tiñeron con azul de metileno. Sobre los campos seleccionados se procedió a la realización de cortes ultrafinos que se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Finalmente las rejillas se observaron y fotografiaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL-JEM-T8 (Dipartimento de Scienze Veterinarie, Università di Messina, Italia).

Para realizar el estudio de microscopía electrónica de barrido las muestras de piel se lavaron en tampón fosfato Sørensen pH 7.2 0.1 M, deshidratadas en etanol de gradaciones crecientes, sometidos a secado de punto crítico en CO₂, bañados con una película de oro y examinados en un microscopio electrónico de campo de emisión de barrido Jeol JSM 6301F (Dipartimento de Scienze Veterinarie, Università di Messina, Italia).

4.3.3. Técnica de inmunohistoquímica PAP indirecta

Para la realización del estudio inmunohistoquímico se utilizó el método de la peroxidasa-antiperoxidasa indirecta. Secciones de un espesor de 10 µm y se montaron en portas gelatinizados. Tras la desparafinización y rehidratación de los cortes, se procedió a un lavado durante 15 mn en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4) que contiene un 1% de Triton-X 100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, United States). A continuación se procedió al bloqueo de la actividad peroxidasa endógena (agua oxigenada al 3% durante 10 mn) y tras un lavado de 10 mn en el mismo tampón, se previnieron las uniones inespecíficas con suero bovino fetal al 10% durante 15 min; y sin lavar se procedió a la incubación de los cortes con los anticuerpos primarios, en cámara húmeda a 4° C durante unas 12 horas (*over night*). Para el estudio de algunos antígenos se utilizó el EnVision Antibody Complex Kit (Dako, Copenhagen, Denmark) siguiendo el protocolo de la casa comercial. Los anticuerpos primarios utilizados, la dilución de trabajo y la fuente de los mismos, así como el laboratorio de adquisición, se recogen en la tabla 4-7

Antígeno	Origen	Dilución	Fuente
Anti-PS100	Conejo	1:500	Dako ¹
Anti-VIM	Ratón	1:100	Boehringer-Mannheim ²

¹Glostrup, Denmark

²Mannheim, Germany; ³ Flanders, NJ, USA

Tabla 4-7. Anticuerpos primarios utilizados en el estudio indicando el origen, la dilución de trabajo y la fuente.

Tras la incubación, las preparaciones se lavaron con el tampón antes descrito y a continuación se incubaron durante 2 h, a temperatura ambiente y en cámara húmeda, con los anticuerpos secundarios correspondientes: IgG de cabra anti-conejo diluido 1:100 o IgG de conejo anti-ratón diluido 1:100 (Amersham, Buckinghamshire, UK). Finalmente se procedió al revelado de la inmunorreacción utilizando 3'-5' diaminobencidina como cromógeno. Las secciones se deshidrataron en una batería de etanoles de gradación creciente, se diafanizaron en xilol, y se montaron con Entellan®. La observación y fotografiado de las secciones se realizó utilizando un microscopio

fotónico Olympus BX-61 con luz transmitida. Se usó un objetivo 4x, con apertura numérica 0.6. El tipo de objetivo es un UPlanSApo. La cámara digital del equipo es una Olympus DP-70 con una resolución de 4080 x 3072 pixels, (12 Mpixels) máximo y se adquirieron las imágenes con una resolución de 1360x1024.

Se realizó un mosaico de imágenes para construir una super-imagen utilizando el programa CAST versión 2, Copyright Visiopharm 2004.

4.3.4. Análisis morfométrico de la piel en las diferentes condiciones experimentales

4.3.4.1. Cálculo del grosor de la piel

El análisis del grosor de la piel se realizó sobre secciones de biopsias de 3 animales (marcados con los crotales identificativos 58, 59 y 68) correspondientes a las técnicas MN y MN+EP. No se tuvo en consideración el producto utilizado ya que las variaciones en el espesor cutáneo deben estar más en relación con la técnica utilizada en la aplicación de las moléculas que en la propia molécula. Partiendo de la situación basal de T0, se valoraron las secciones teñidas mediante la técnica de tricrómico de Masson referidas a los tiempos T60, D7 y D14 (Tabla 4.8).

Para la observación y captura de las imágenes se utilizó un microscopio fotónico Olympus BX-61 con luz transmitida. Se usó un objetivo 4x, con apertura numérica 0.6. El tipo de objetivo es un UPlanSApo. La cámara digital del equipo es una Olympus DP-70 con una resolución de 4080 x 3072 pixels, (12 Mpixels) máximo, adquiriéndose las imágenes con una resolución de 1360x1024.

La determinación de los espesores de la epidermis y la dermis en las secciones seleccionadas se realizaron siguiendo los criterios y algoritmos propuestos por Hildebrand y Rüesgsegger (1997) y Saito y Toriwaki (1994), realizando un mosaico de imágenes para construir una super-imagen utilizando el programa CAST versión 2, Copyright Visiopharm 2004. El estudio se llevó a cabo en el departamento de análisis de imágenes de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo. (Figura 4-8).

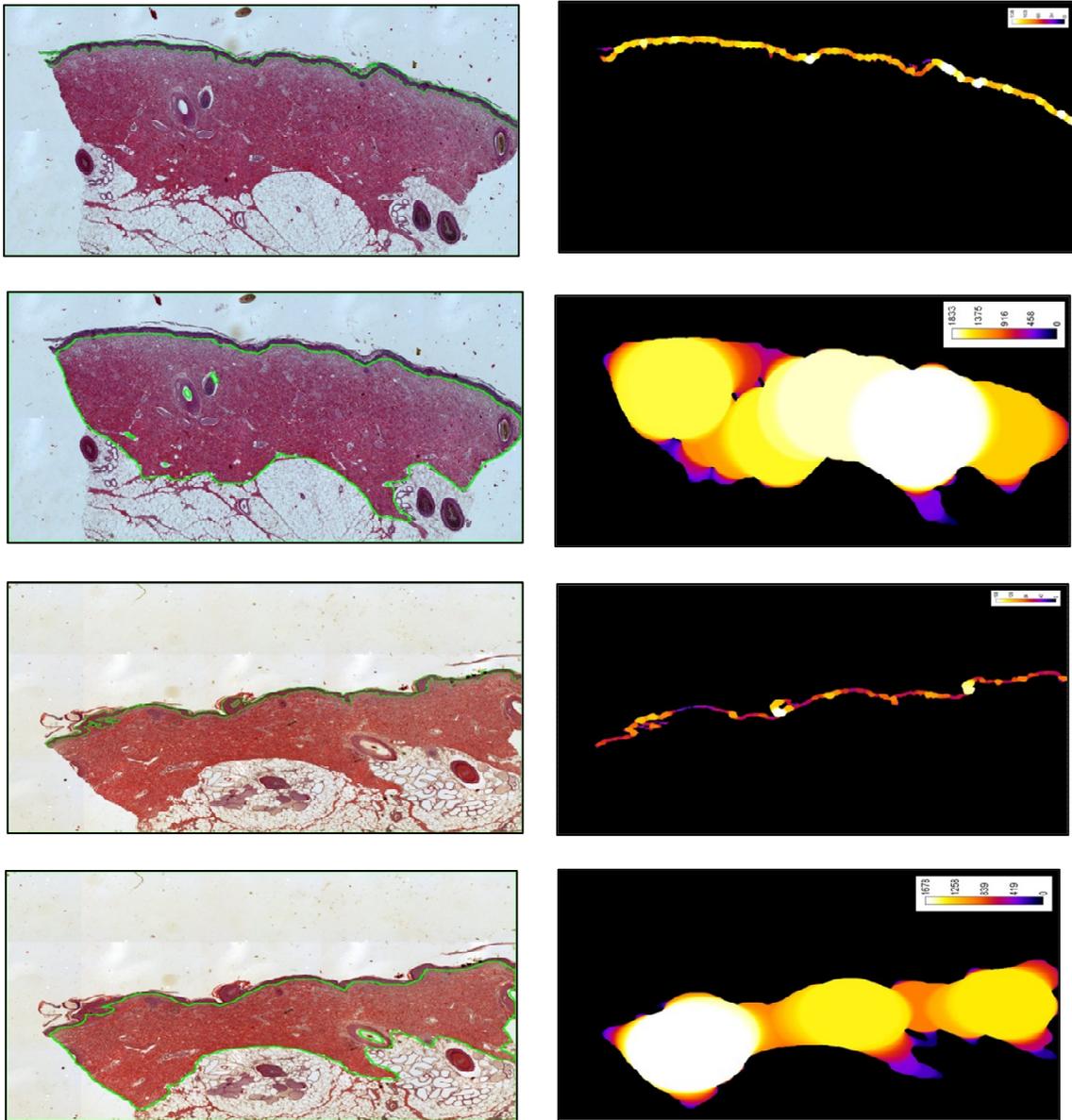


Figura 4-8. Ejemplos del procedimiento utilizado para la valoración del grosor de la epidermis y la dermis.

Crotal	Muestra	Técnica	Tiempo	Producto
58	86	MN	T0	PROCAINA
58	99	MN	T60	PROCAINA
58	108	MN	D7	PROCAINA
58	147	MN	D14	PROCAINA
59	87	MN	T0	CAFEINA
59	98	MN	T60	CAFEINA

59	104	MN	D7	CAFEINA
59	152	MN	D14	CAFEINA
68	126	MN	T0	BIOTINA
68	138	MN	T60	BIOTINA
68	144	MN	D7	BIOTINA
68	156	MN	D14	BIOTINA
58	74	MN+EP	T0	PROCAINA
58	84	MN+EP	T60	PROCAINA
58	107	MN+EP	D7	PROCAINA
58	149	MN+EP	D14	PROCAINA
59	75	MN+EP	T0	CAFEINA
59	85	MN+EP	T60	CAFEINA
59	102	MN+EP	D7	CAFEINA
59	150	MN+EP	D14	CAFEINA
68	114	MN+EP	T0	BIOTINA
68	124	MN+EP	T60	BIOTINA
68	143	MN+EP	D7	BIOTINA
68	155	MN+EP	D14	BIOTINA
Tabla 4-8.- Relación de las muestras empleadas para el cálculo del grosor de la piel.				

4.3.4.2. Cálculo de la densidad de vasos sanguíneos y fibroblastos dérmicos

El cálculo de la densidad de vasos en la dermis superficial se realizó contando sobre capturas de pantalla con un objetivo 20x el número de círculos identificables como capilares a una profundidad máxima de 1 mm por debajo de la unión dermo-epidérmica. El estudio se realizó de manera independiente por dos investigadores y los valores obtenidos para cada animal se expresan como valores de la media \pm la desviación estándar.

4.3.4.3. Cálculo de la densidad de células dendríticas de la epidermis

Para valorar de forma la densidad de células dendríticas epidérmicas (identificadas como células de Langerhans) se valoraron directamente bajo el microscopio 10 campos

de epidermis, independientes entre sí, procesados para la detección de la vimentina, utilizando un objetivo 20x. El estudio se realizó de manera independiente por dos investigadores y los valores obtenidos para cada animal se expresan como valores de la media \pm la desviación estándar.

4.3.5. HPLC (high pressure liquid chromatography)

Las muestras de piel fueron homogeneizadas en 4 cc de suero fisiológico con un equipo Ultra-Turrax T8 (Ika Labor Technik Staufen) durante 1 minuto a 20.000 rpm, hasta conseguir una mezcla uniforme.

El estudio se realizó en las instalaciones de los Servicio Técnicos de la Universidad de Oviedo. El equipo utilizado para los análisis fue UPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific) acoplado a espectrometro de masas de cuádruplo con tiempo de vuelo Impact II (Bruker), con fuente de electrospray. El método cromatográfico para la separación de los compuestos es el siguiente:

Fase móvil A: 0.1% de ácido fórmico en agua

Fase móvil B: 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo

Flujo: 0.25 ml/min

Temperatura: 30 grados

Volumen de inyección: 5 microlitros

Gradiente:

5% B (1 min)

de 5 a 55% B en 5 min

de 55 a 95% B en 1 min

95% B 1 min

La detección se realizó entre 100 y 800 Dalton en modo positivo para biotina, procaína y cafeína, y en modo negativo para ketoprofeno.

Los parámetros de la fuente de electrospray fueron los siguientes: Voltaje del capilar: 4500V; flujo de nebulización: 35.0 psi; gas de secado: 6 L/min; temperatura: 250 grados.

Para la extracción de los compuestos en los casos de la biotina y el ketoprofeno se tomaron 50 microlitros de muestra, diluyendo hasta 1 mL con agua. Se adicionaron 20

microlitros de amoníaco al 33%. A continuación se añadieron 300 μ l de diclorometano y se extrajo en vortex durante un minuto. Se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min y el extracto acuoso resultante se diluyó 1:10 y se inyectó en el equipo.

Para la procaína se tomaron 50 μ l de muestra, diluyendo hasta 1 mL con agua acidificada a pH 2.5 con ácido fórmico. Se añadieron 300 μ L de diclorometano y se agitó en vortex durante un minuto. La muestra se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min y el extracto acuoso se inyectó directamente en el equipo sin dilución.

Finalmente, para la cafeína, a 50 μ l de muestra se adicionaron 950 μ l de agua/metanol en proporción 1:1. La disolución se agitó en vortex durante 1 min, y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se diluyó 1:20 en agua y se inyectó en el equipo.

Las rectas patrón se prepararon en los siguientes intervalos de calibración: procaína: 5-1000 ng/ml; cafeína: 1/1000 ng/ml; biotina: 5-2000 ng/ml; y ketoprofeno: 5-5000 ng/ml.

Resultados

5. Resultados.

Con el fin de exponer de forma clara y detallada los resultados obtenidos en el estudio, se analizará en primer lugar la estructura y ultraestructura de la piel del dorso del cerdo. Además se introducirán algunos resultados de inmunohistoquímica sobre la piel de los animales controles con el fin de caracterizar algunas poblaciones celulares objeto del trabajo. A continuación se expondrán los resultados obtenidos mediante la técnica de HPLC para determinar las concentraciones tisulares de las diferentes moléculas en consideración en función de la técnica empleada y del tiempo. Inmediatamente después se relacionarán los hallazgos en el espesor, la estructura e inmunohistoquímica cutáneas producidos por las moléculas y las técnicas utilizadas para su administración transcutánea. Finalmente se comentará en detalle los cambios que las técnicas (no las moléculas) inducen en las poblaciones de las células dendríticas inmunocompetentes de la piel.

5.1. Estructura y ultraestructura de la piel del dorso del tronco del cerdo

La piel del dorso del tronco de cerdo, utilizada en este trabajo como modelo, presenta la estructura típica de la piel vellosa de los mamíferos, con variaciones individuales en cuanto a la densidad de folículos pilosos-pelos. Mediante la técnica del tricrómico de Masson, que permite obtener imágenes polícromas de los tejidos, se aprecian con claridad los tres estratos de la piel: epidermis, dermis e hipodermis (Fig. 5.1).

La epidermis está formada por un número variable de estratos de queratinocitos, las crestas epidérmicas son poco profundas, y entre los queratinocitos basales se aprecian células de citoplasmas claros que podrían corresponder con células de Merkel. Los folículos pilosos se pueden observar en diferentes fases del ciclo del pelo y no ofrecen ninguna particularidad especial respecto a los pelos de otros vertebrados (Fig. 5.2). En las dermis se observan glándulas eccrinas y apocrinas, con predominio de las primeras.

Las dos porciones de la dermis, papilar y reticular, se continúan entre ellas sin zonas nítidas que indiquen la transición. La primera se caracteriza por la existencia de un

plexo vascular muy desarrollado que disminuye de densidad a medida que se profundiza en la dermis reticular. En esta, la densidad de las fibras de colágeno es mayor, si bien puede variar de unas zonas a otras (Figs. 5.1 y 5.2).

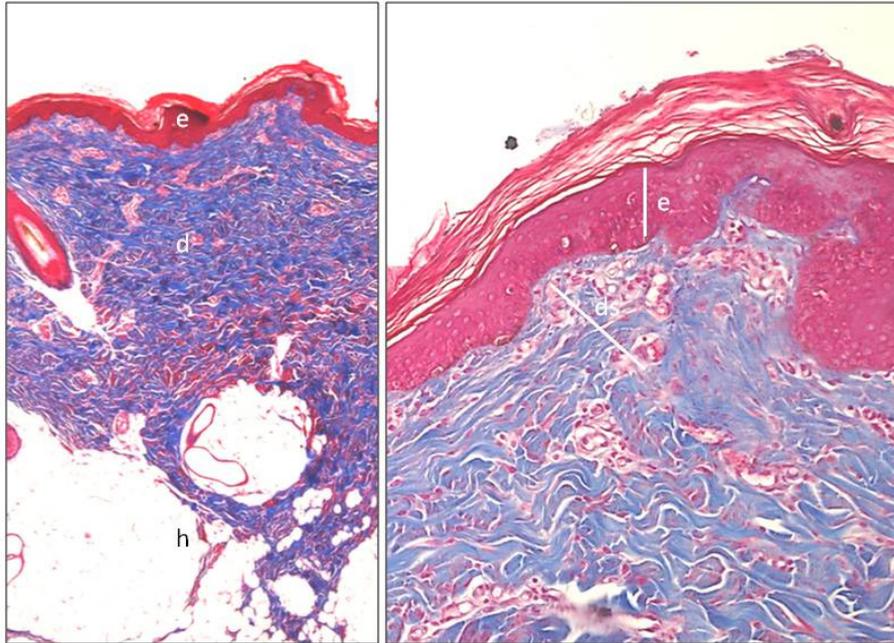


Figura 5.1.- Estructura de la piel del dorso del tronco del cerdo. e: epidermis, d: dermis, h: hipodermis. Tricrómico de Masson.

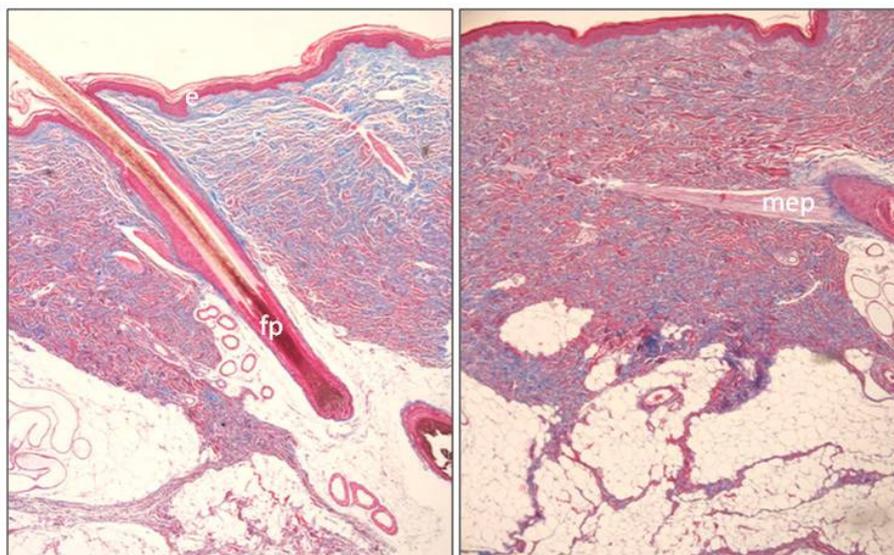


Figura 5.2.- Estructura de la piel del dorso del tronco del cerdo, mostrando la organización de los folículos pilosos (fp) y de los músculos erector pili (mep) e: epidermis. Tricrómico de Masson. Además de los queratinocitos de la epidermis y anexos, y de los fibroblastos de la dermis, la piel contiene otras poblaciones celulares, difíciles de identificar mediante técnicas histológicas estructurales, pero fácilmente localizables en base a sus propiedades inmunohistoquímicas. De especial interés son las células dendríticas

dérmicas. Se localizan a nivel de la unión dermo-epidérmica, entre los queratinocitos basales y en los estratos suprabasales de la epidermis y expresan inmunorreacción para la vimentina y la proteína S100 (Fig. 5.3).

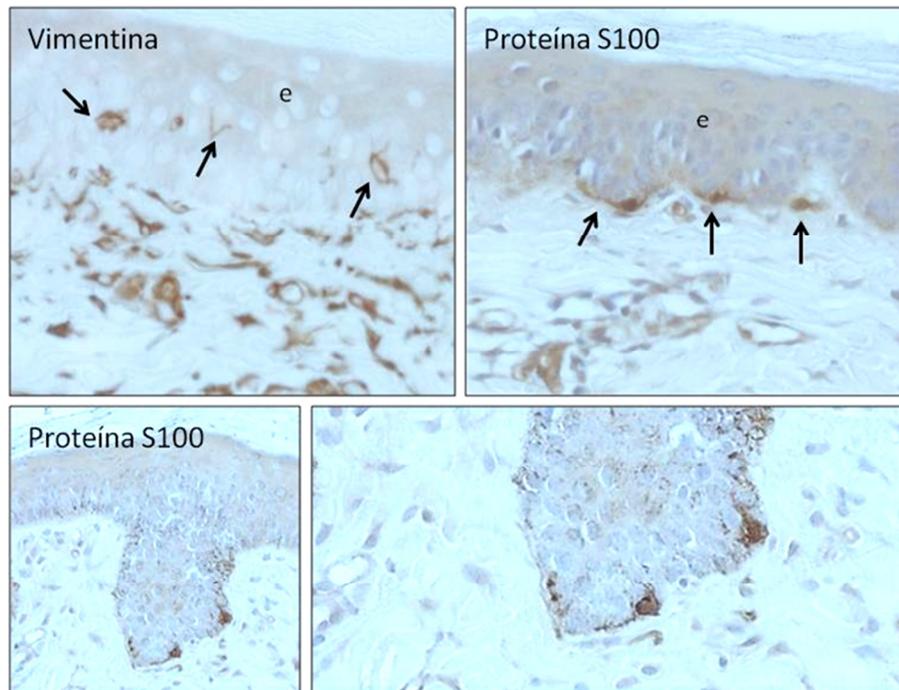


Figura 5.3.- Localización inmunohistoquímica de la vimentina y la proteína S100 en las células dendríticas de la epidermis (flechas). e: epidermis.

Las células epidérmicas vimentina positivas se localizan entre los estratos de la epidermis, a una altura variable, y se identifican como células de Langerhans. Las células dendríticas proteína S100 positivas tienen los somas siempre por fuera de la epidermis aunque sus prolongaciones se introducen entre los queratinocitos basales y suprabasales y se las identifica con melanocitos.

Por las características de las técnicas de permeación de la piel utilizadas, la diana fundamental de los compuestos administrados, además de las propias células de la piel son los capilares del estrato papilar de la dermis que forman un plexo más o menos denso. Este plexo es perfectamente identificable mediante la técnica del tricrómico de Masson, pero se identifica aún mejor mediante la inmunorreacción para la vimentina, ya que esta es el filamento intermedio del citoesqueleto de las células endoteliales (Fig. 5.4). Aunque según nuestros datos nunca se ha descrito la presencia de

inmunorreacción para la proteína S100 en las paredes de los capilares, con el anticuerpo utilizado se marca una subpoblación de capilares con esta proteína (Fig. 5.4). No obstante, los estudios de cuantificación se efectuarán sobre las secciones procesadas para la detección de vimentina.

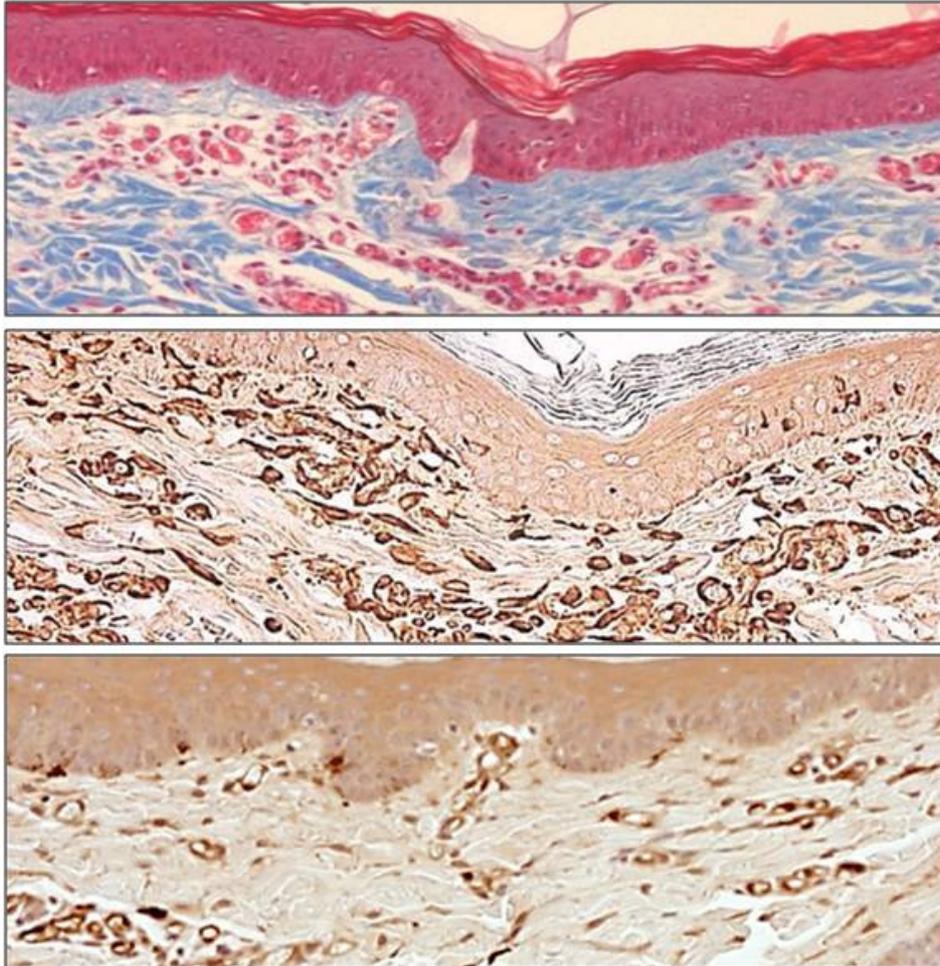


Figura 5.4.- El plexo capilar de la dermis papilar o superficial se identifica claramente mediante la técnica de tricrómico de Masson (superior), vimentina (centro) y proteína S100 (inferior).

Por lo que respecta a la ultraestructura, se realizó sobre muestras de piel que incluyen únicamente el espesor de la epidermis. Esta elección se realizó porque al no poder perfundir los animales por vía transcardiaca cualquier análisis de estructuras dérmicas no profundas resultarían en la observación de artefactos. Los detalles más destacados de los estudios de microscopía electrónica realizados se recogen en las figuras 5.5, 5.6 y 5.7.

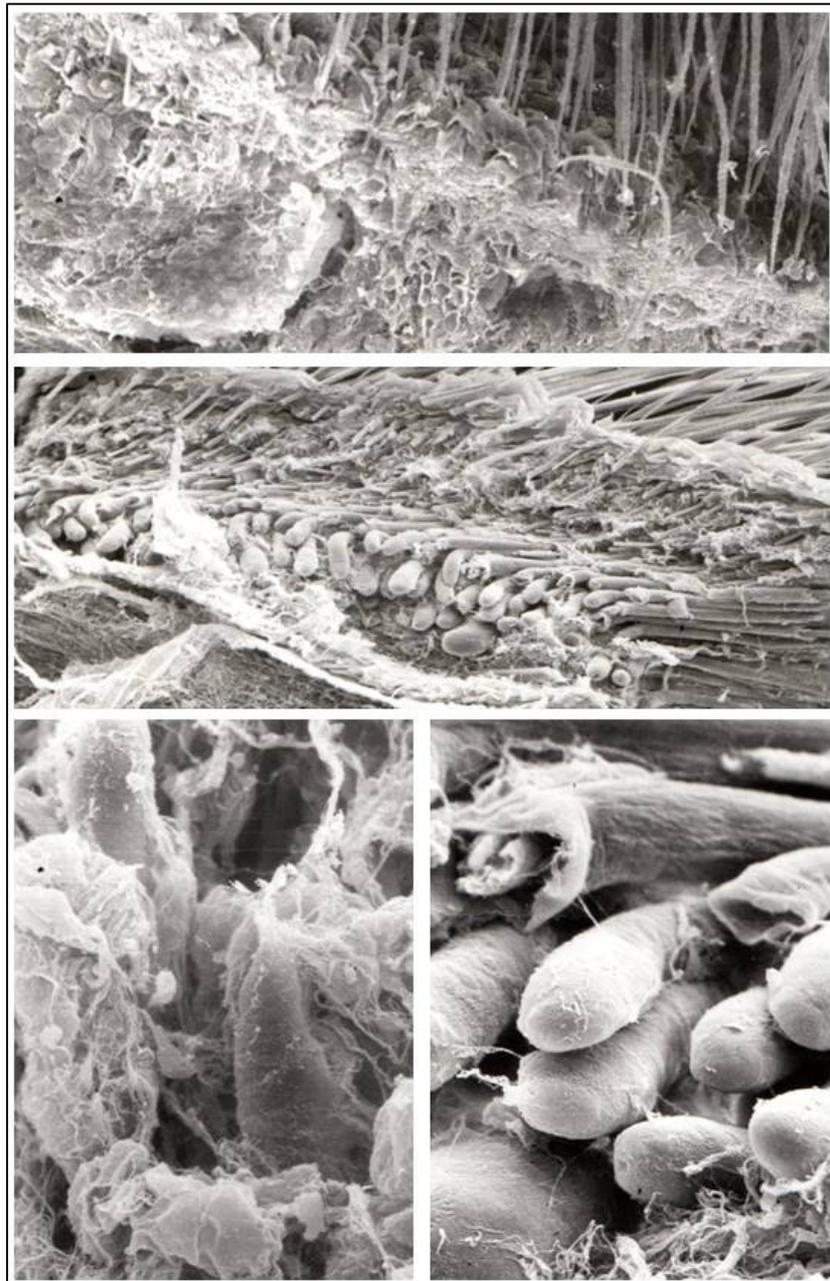


Figura 5.5.- Unión dermo-epidérmica y bulbos de los folículos pilosos de la piel del dorso del tronco del cerdo. Microscopía electrónica de barrido.

Los hallazgos con el microscopio electrónico de barrido ofrecen un aspecto laxo de la dermis papilar y un elevado número de pelos, aparentemente superior que en las imágenes de estructura. Ello puede deberse a diferencias individuales entre los animales estudiados (Fig. 5.5).

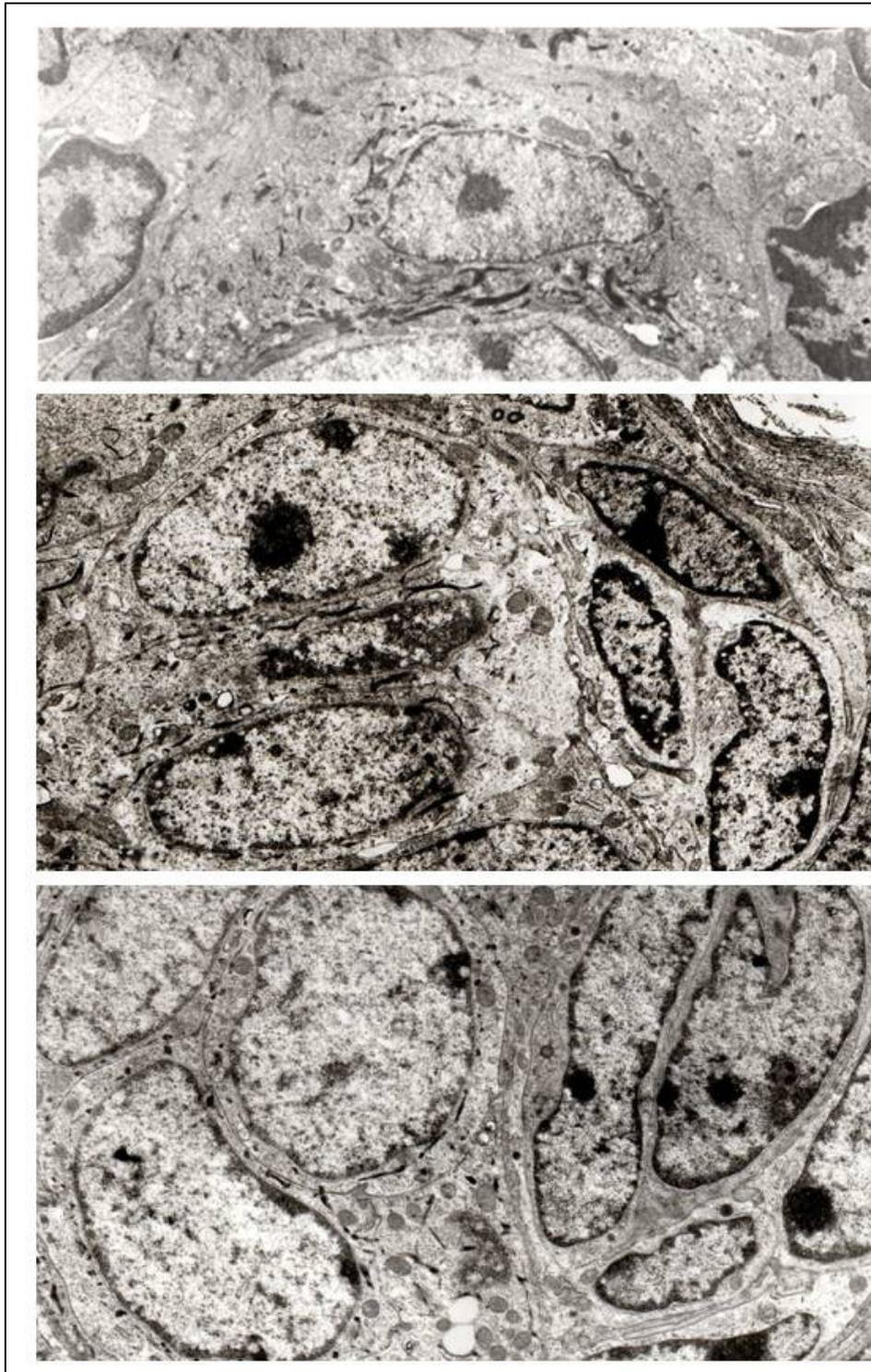


Figura 5.6.- Ultrastestructura de la epidermis de la piel del dorso del tronco del cerdo. Microscopía electrónica de transmisión.

Los queratinocitos epidérmicos presentan densidades electrónicas variables según el estrato. Pero a los fines del presente estudio los detalles más importantes a analizar son las citoqueratinas presentes en el interior de los citoplasmas, la densidad de uniones intercelulares y el grado de separación de los queratinocitos entre sí. En

nuestras preparaciones no se han observado imágenes claras de desmosomas, pero en todos los citoplasmas se aprecian cantidades variables de citoqueratina y de cuerpos densos intracitoplasmáticos (Fig. 5.6).

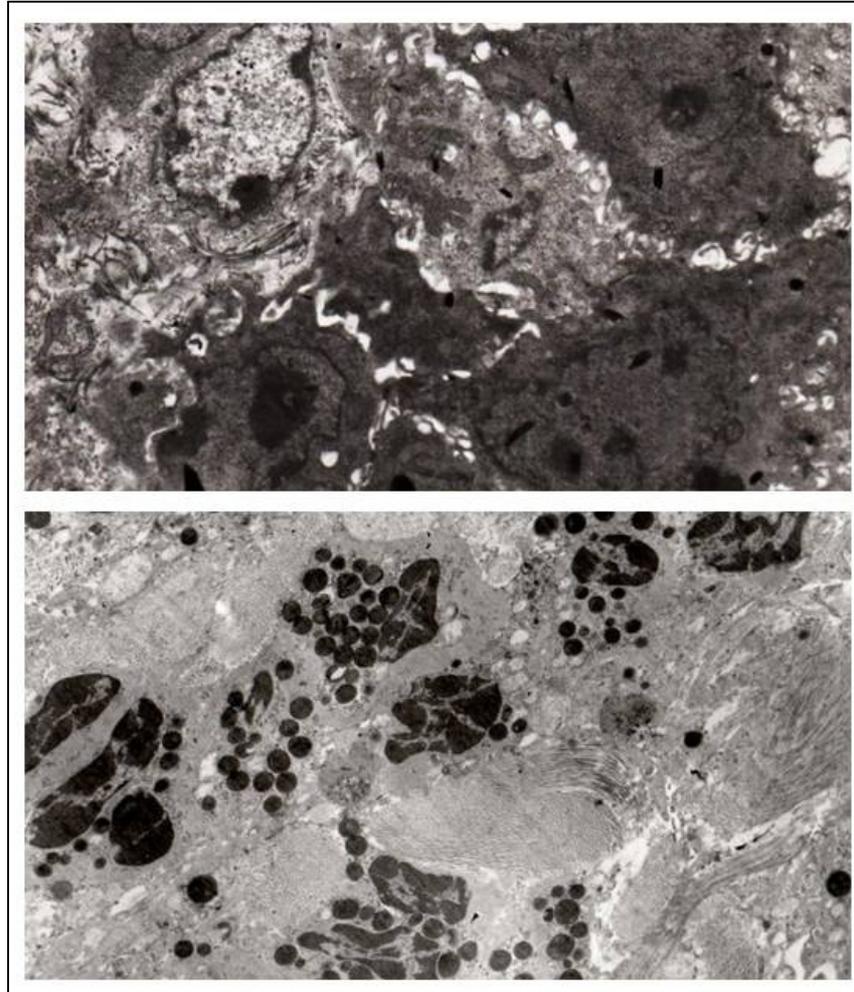


Figura 5.7.- Ultraestructura de la epidermis de la piel del dorso del tronco del cerdo. Microscopía electrónica de transmisión.

En los estratos más superficiales de la epidermis las uniones intercelulares son más laxas y se deposita material electrolúcido entre ellas; ocasionalmente se han observado prolongaciones citoplasmáticas de melanocitos con abundantes cuerpos electrodensos de melanina (Fig. 5.7).

5.2. Concentración cutánea de las moléculas estudiadas en función de la técnica empleada y el tiempo transcurrido: HPLC.

5.2.1 Procaína

Los resultados obtenidos a partir de las muestras de piel del animal tratado con procaína (animal 58), en función de los tiempos y las formas de administración fueron (Tabla 5.1):

	MN	MN+EP	EP	ID
T0	2,8	2,50	4,3	2,2
T15	2,3	4	4,2	4,8
T30	2,0	5,4	2,9	2,5
T60	0,02	4,2	3,6	0,05
D7	0,09	0,07	0,16	0,07
D14	0,06	0,05	0,10	0,04

Tabla 5.1.- Concentraciones cutáneas medias de procaína (expresados en $\mu\text{g/}$ en función de la técnica y el tiempo tras la administración. La representación gráfica se expresa en las Gráficas 5.1 y 5.2.

Los valores individuales de cada una de las muestras se recogen en el Anexo 1 (Tabla A5.1). Las concentraciones tisulares más altas se encontraron en los primeros 60 minutos, alcanzándose los valores más elevados con la técnica MN+EP a los 30 minutos. A la semana y dos semanas de la terminación de los experimentos la molécula sigue detectándose en piel pero a niveles residuales (Gráficas 5.1. y 5.2.).

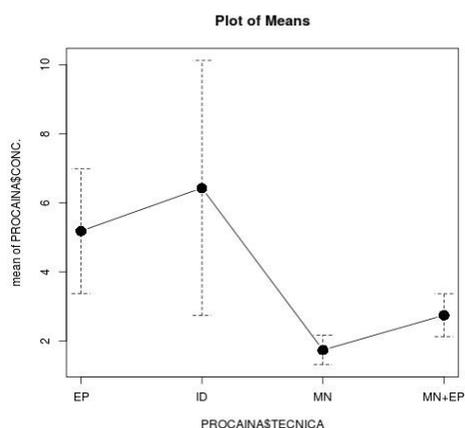
Las medias muestrales según la técnica y el periodo de tiempo para la procaína se recogen en la tabla 5.2.

Tiempo	Técnica			
	EP	ID	MN	MN+EP
T0	4,30	2,20	2,80	2,60
T15	8,85	10,05	3,15	4,65
T30	10,00	2,15	1,90	3,75
T60	4,55	18,525	1,41	3,35
D7	0,30	0,29	0,79	0,63
D14	0,10	0,04	0,06	0,05

Tabla 5.2.- Valores medios de la concentración de procaína en función de la técnica y el tiempo.

Se puede comprobar que no hay diferencias significativas entre las cuatro técnicas utilizadas en los tiempos descritos en nuestro estudio. La media más alta se ha dado para ID, seguido de EP, pero los intervalos no conducen a poder asegurar que existen diferencias significativas (no debidas al azar) entre las técnicas.

El intervalo de confianza a 95% refleja la gráfica 5.3.



Gráfica 5.3.- Intervalo de confianza al 95% para la procaína

5.2.2. Ketoprofeno

	MN	MN+EP	EP	ID
T0	22	12,90	31,8	22
T15	15,00	8,4	23,6	95,1
T30	11,8	2,7	23,9	81,0
T60	5,5	3,7	21,9	40,7

Tabla 5.3.- Concentraciones cutáneas medias de ketoprofeno (expresados en $\mu\text{g/}$ en función de la técnica y el tiempo tras la administración. La representación gráfica se expresa en las Gráficas 5.4 y 5.5.

Los resultados de detección mediante HPLC del ketoprofeno se limitan a la primera hora por fallecimiento del animal (animal 69). Los valores más altos se obtuvieron mediante la técnica ID y son los que más se mantienen en el tiempo, si bien a los 60 minutos se reducen a más de la mitad respecto a los 15 min.

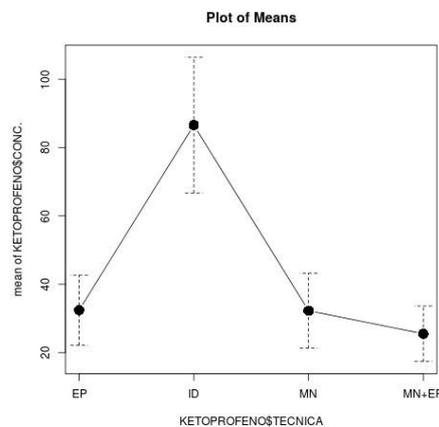
En el caso del ketoprofeno se observan diferencias significativas en cuanto a la técnica utilizada para su administración, es decir, no todas las técnicas tienen el mismo comportamiento.

Las medias de las distintas técnicas en los distintos periodos de tiempo que se han obtenido en estas muestras se recogen en la tabla 5.4.

Tiempo	Técnica			
	EP	ID	MN	MN+EP
T0	31,80	38,55	23,05	17,90
T15	28,35	149,05	52,70	23,50
T30	56,80	78,95	41,80	27,85
T60	12,40	79,75	11,40	32,70

Tabla 5.4.- Valores medios de la concentración del ketoprofeno en función de la técnica y el tiempo.

Se observa que la media de la técnica ID es siempre la más alta de las cuatro, en cualquiera de los periodo de tiempo analizados. Gráficamente, si obtenemos el intervalo de confianza a 95% para cada técnica, podemos sacar las mismas conclusiones (Gráfica 5.6).



Gráfica 5.6.- Intervalo de confianza al 95% para el ketoprofeno

Estos análisis ponen de manifiesto no solo que con ID la concentración es significativamente más alta que con cualquiera de las otras tres técnicas, sino que, además entre las otras tres (MN, MN+EP y EP) no hay diferencias significativas, pudiendo considerarse las tres iguales desde el punto de vista de diferencias estadísticamente significativas en cuanto al nivel de concentración.

5.2.3. Biotina

	MN	MN+EP	EP	ID
T0	32,6	11,2	19,00	149,5
T15	38,5	7,7	20,6	280,2
T30	23,2	8,8	18,4	232,8
T60	37,7	7,00	18,2	30,6
D7	0,5	0,5	1	0,4
D14	0,5	0,5	0,6	0,4

Tabla 5.5.- Concentraciones cutáneas medias de biotina (expresados en µg/ en función de la técnica y el tiempo tras la administración. La representación gráfica se expresa en las Gráficas 5.7 y 5.8.

Las concentraciones cutáneas de biotina determinadas mediante HPLC a diferentes tiempos y en función de la técnica (del animal 68) se reflejan en la tabla 5.5. Las mayores concentraciones se lograron con la técnica ID a los 15 y 30 minutos tras la administración. Mediante electroporación asociada microagujas se obtuvieron las concentraciones más bajas.

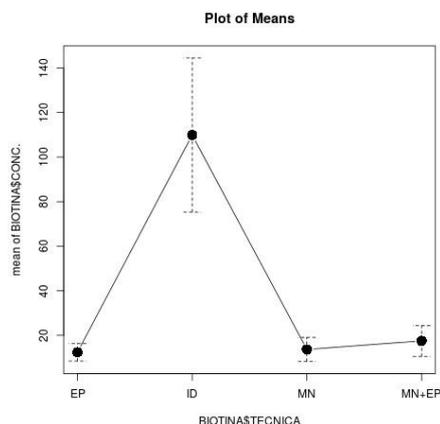
Los resultados del estudio HPLC ponen de manifiesto que no todas las técnicas se comportan uniformemente en cuanto a la concentración. Para valorar cuál de ellas es la mejor analizamos las medias de todas las muestras por técnica y tiempo. Estos datos están recogidos en la tabla 5.6.

Tiempo	Técnica			
	EP	ID	MN	MN+EP
T0	19,00	124,90	16,65	11,20
T15	10,65	263,05	20,10	36,50
T30	25,20	128,70	11,75	21,05
T60	9,65	32,55	19,35	15,15
D7	1,00	0,40	0,50	0,50
D14	0,60	0,40	0,50	0,50

Tabla 5.6.- Valores medios de la concentración del ketoprofeno en función de la técnica y el tiempo

Como se puede observar en la tabla anterior, para cualquiera de los periodos de tiempo analizados, la media de concentración para la técnica ID es considerablemente superior que para el resto de las técnicas.

Gráficamente (grafica 5.9), si se calculan los intervalos de confianza al 95% de la concentración para cada técnica, se obtiene:



Gráfica 5.9.- Intervalo de confianza al 95% para la biotina

De hecho, si se hace un estudio comparativo teniendo en cuenta simplemente la técnica, nos sale que ID es claramente superior a las otras tres, no pudiendo probarse diferencias significativas entre EP, MN y MN+EP.

5.2.4. Cafeína

	MN	MN+EP	EP	ID
T0	8,64	3,99	4,40	19,08
T15	5,63	3,41	6,32	4,10
T30	6,85	6,27	6,34	3,91
T60	0,15	5,93	2,02	0,07
D7	0,11	0,10	0,07	0,02
D14	0,04	0,07	0,04	0,03

Tabla 5.7.- Concentraciones cutáneas medias de cafeína (expresados en µg/ en función de la técnica y el tiempo tras la administración. La representación gráfica se expresa en las Gráficas 5.10. y 5.11.

Los valores medios de la HPLC para las muestras obtenidas en el animal al que se le suministró cafeína por vía transcutánea (animal 59), en función de los tiempos y las formas de administración, se resumen en la tabla 5.7. Las mayores concentraciones se obtuvieron por vía intradérmica en el momento de la administración de la molécula;

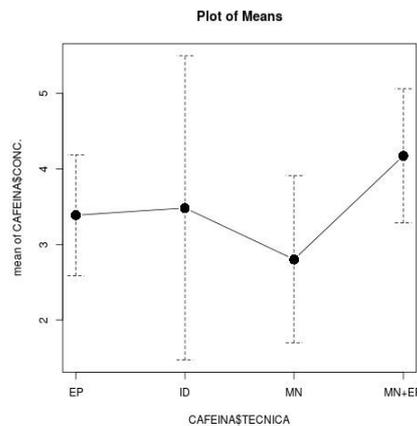
sin embargo a los 60 minutos las concentraciones fueron las más bajas, casi la mitad, cuando se utilizó esta técnica que cuando se utilizaron cualquiera de las otras tres.

En el caso de la cafeína no se obtienen diferencias significativas en cuando a la técnica utilizada. Esto se confirma al observar las medias muestrales (Tabla 5.8)

Tiempo	Técnica			
	EP	ID	MN	MN+EP
T0	4.40	19,08	8,64	3,99
T15	4,05	2,80	3,81	3,25
T30	5,74	2,61	3,89	6,54
T60	3,01	0,62	0,53	6,68
D7	0,431,00	0,16	0,07	0,56
D14	0,04	0,03	0,04	0,07

Tabla 5.8.- Valores medios de la concentración de la cafeína en función de la técnica y el tiempo

Lo mismo se obtiene de los intervalos de confianza al 95% para la media de cada técnica (Gráfica 5.12)

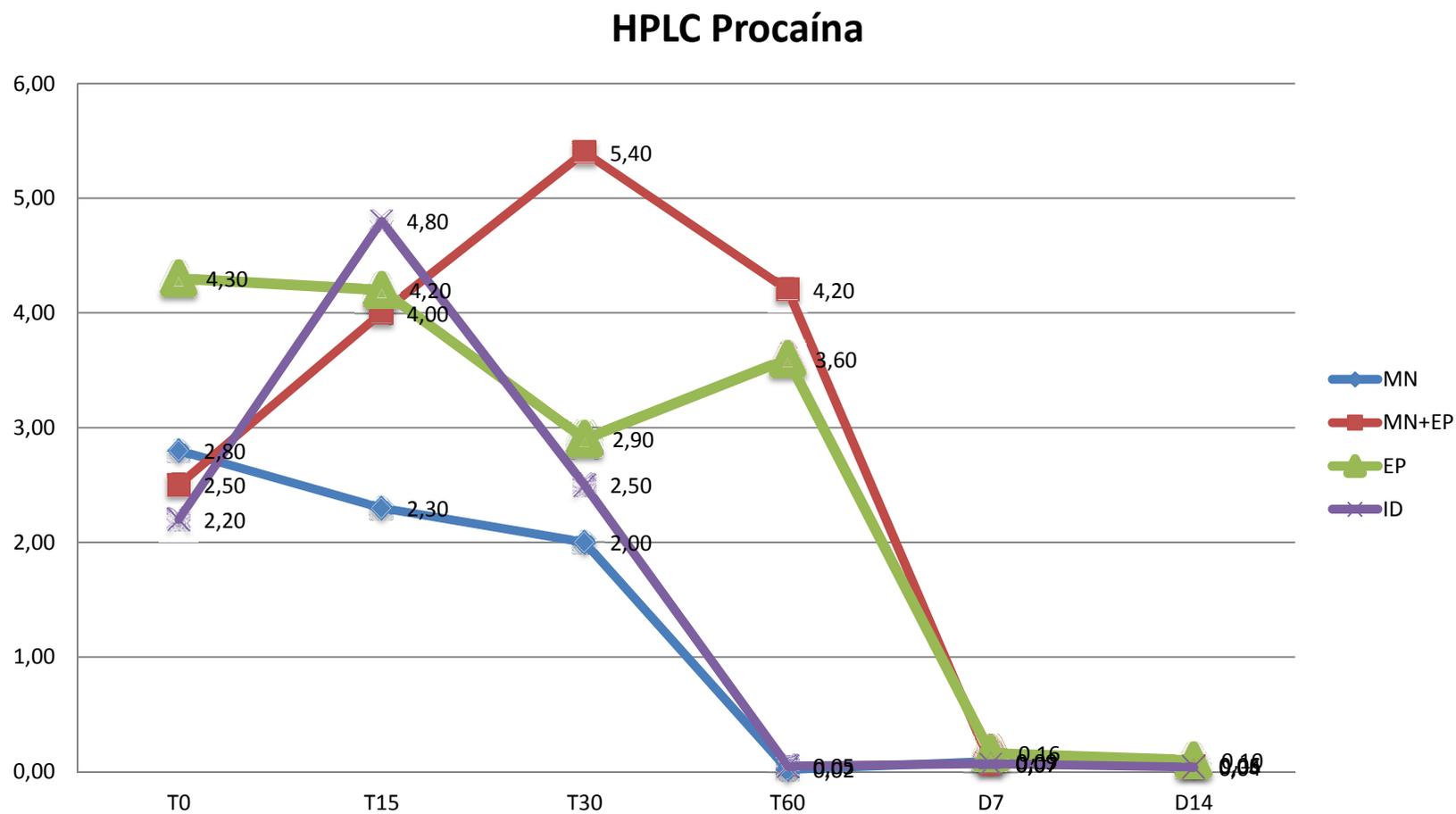


Gráfica 5.12.- Intervalo de confianza al 95% para la biotina

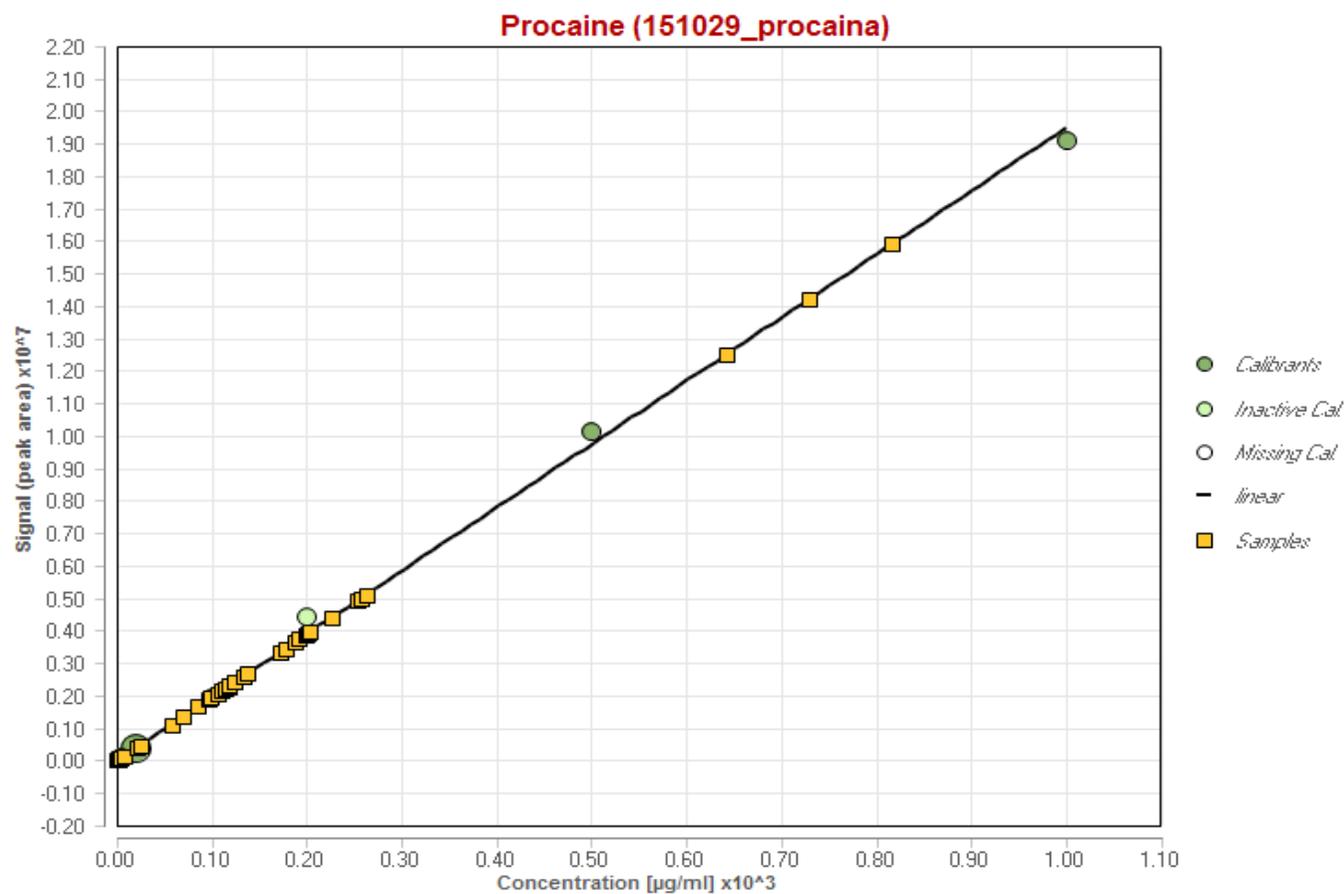
Como se observa, no hay diferencias significativas entre las cuatro técnicas, con lo que para la cafeína no parece haber resultados concluyentes.

Los resultados para cada técnica en función de los tiempos se recogen, igualmente en las gráficas 5.13 a 5.16.

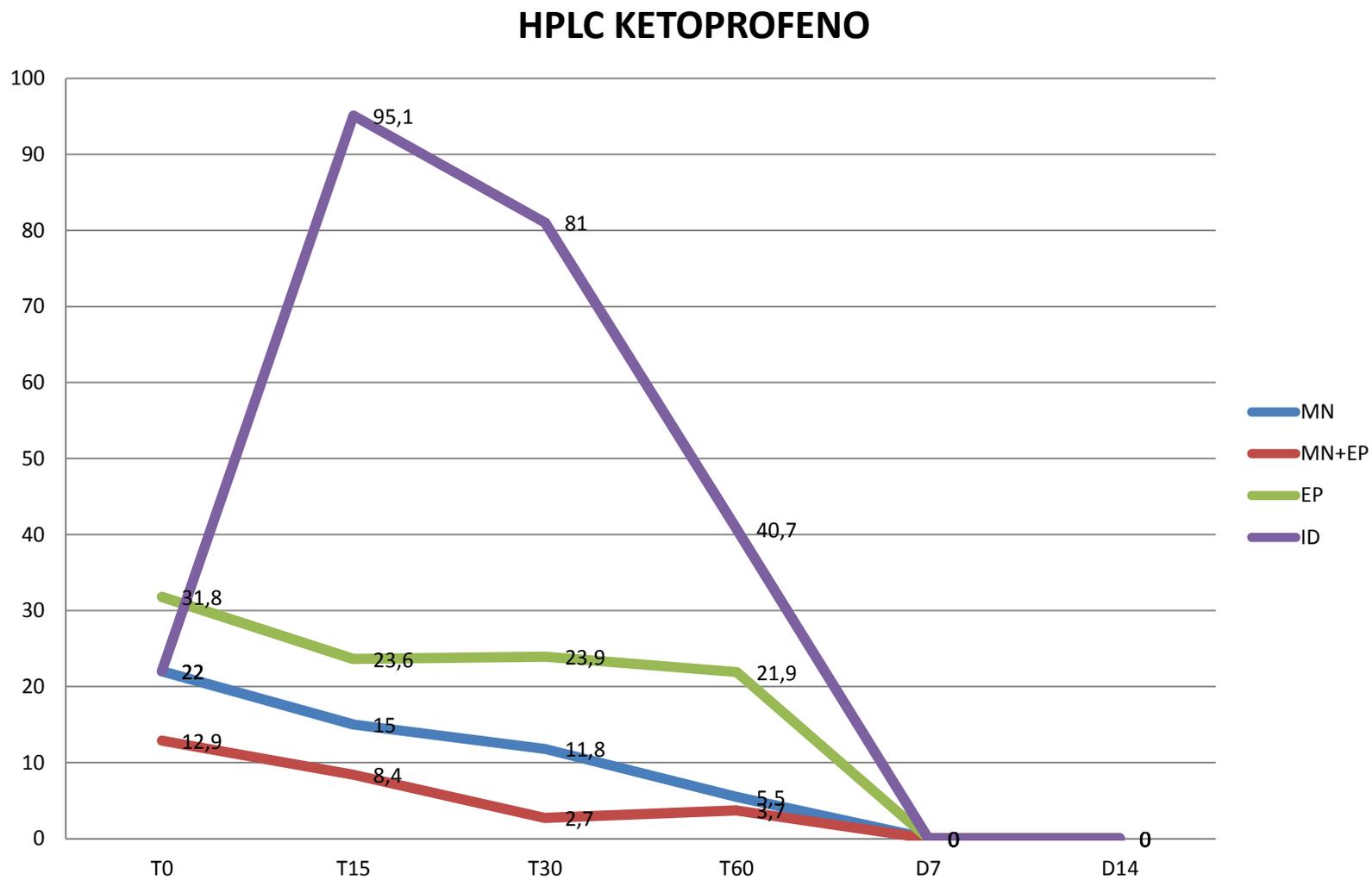
Gráfica 5.1.- Concentraciones cutáneas de procaína según vía de administración y tiempos



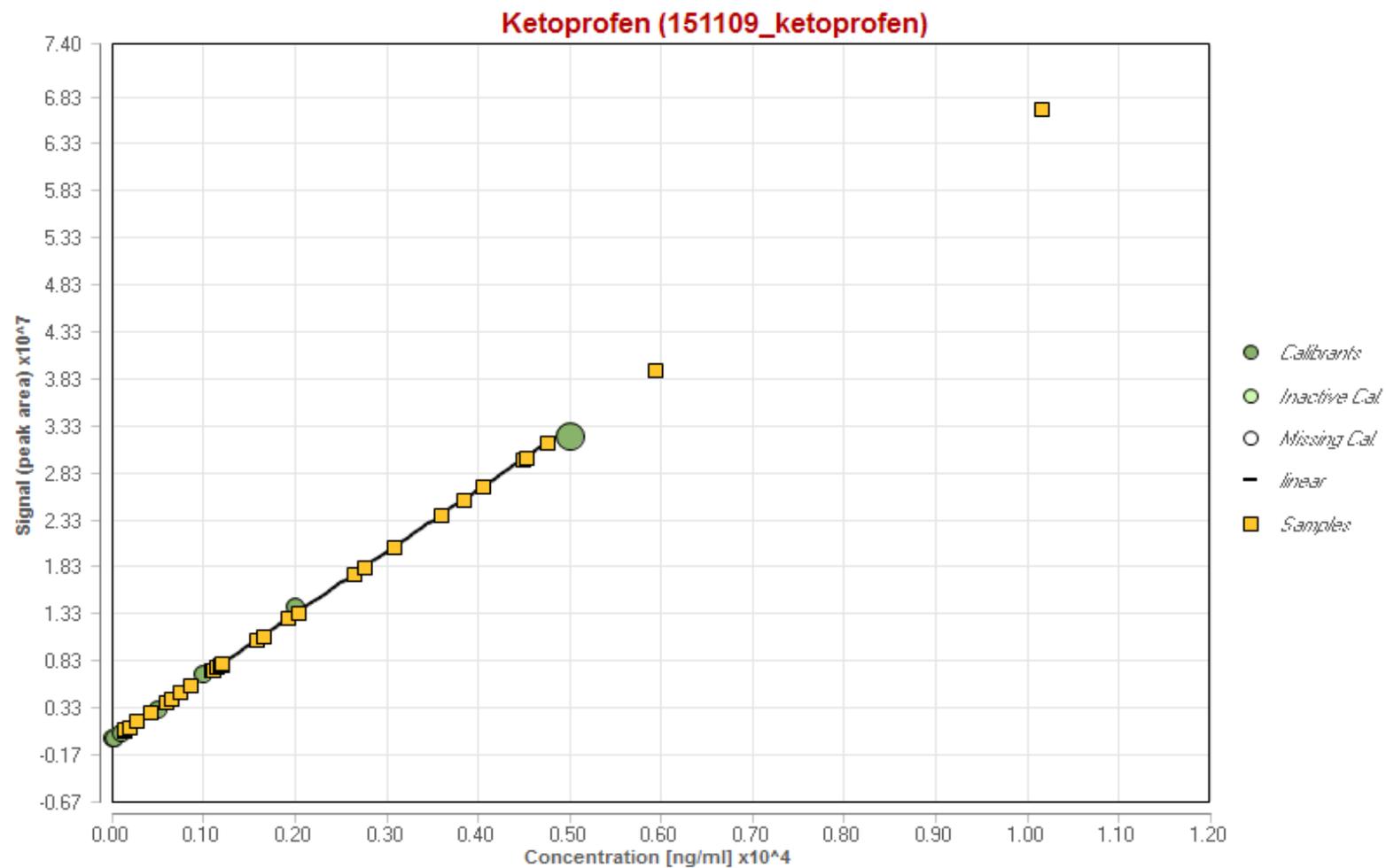
Gráfica 5.2.- Calibración HPLC para la detección de la procaína



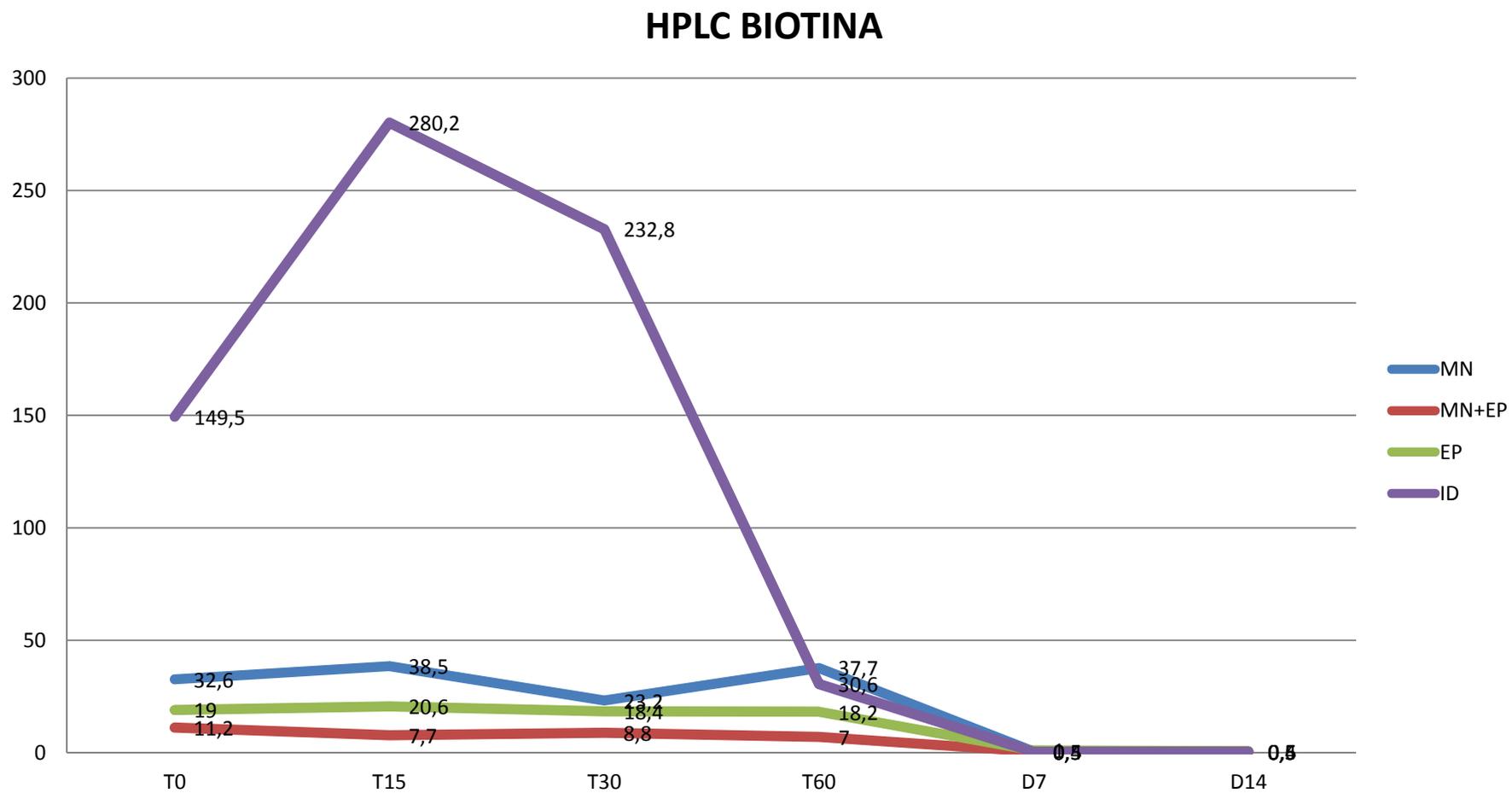
Gráfica 5.4.- Concentraciones cutáneas de ketoprofeno según vía de administración y tiempos.



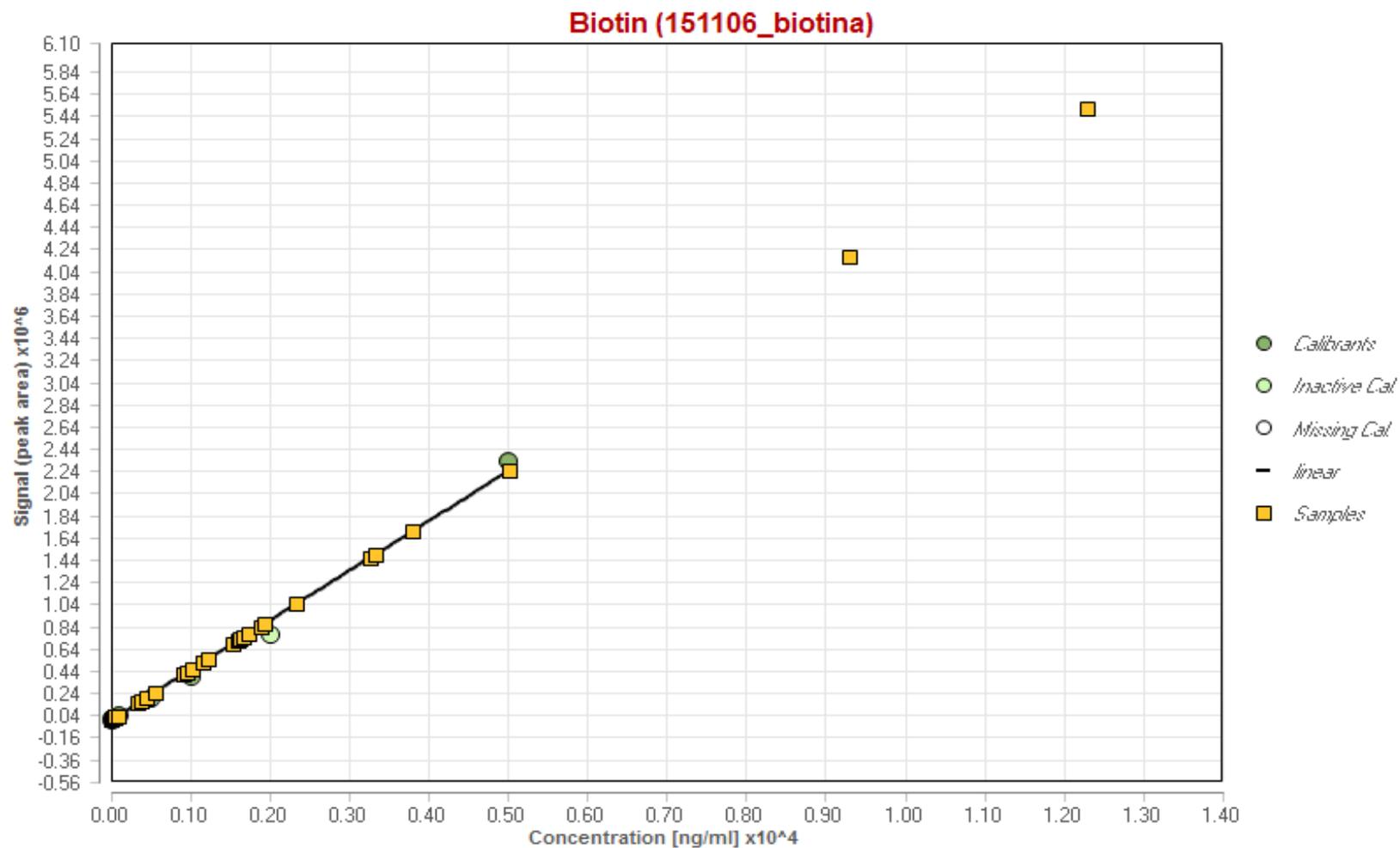
Gráfica 5.5.- Calibración HPLC para la detección del ketoprofeno.



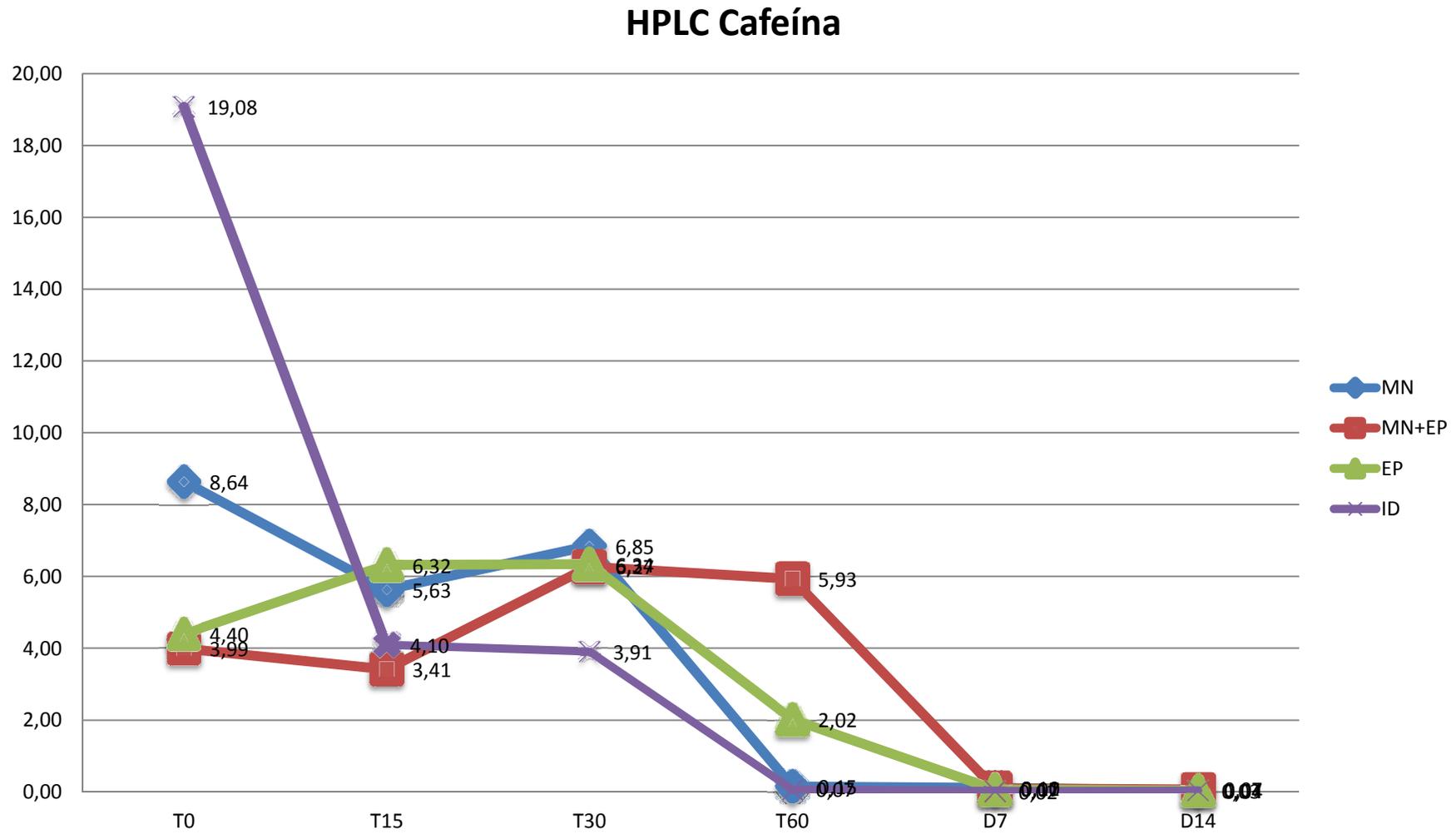
Gráfica 5.7.- Concentraciones cutáneas de biotina según vía de administración y tiempos.



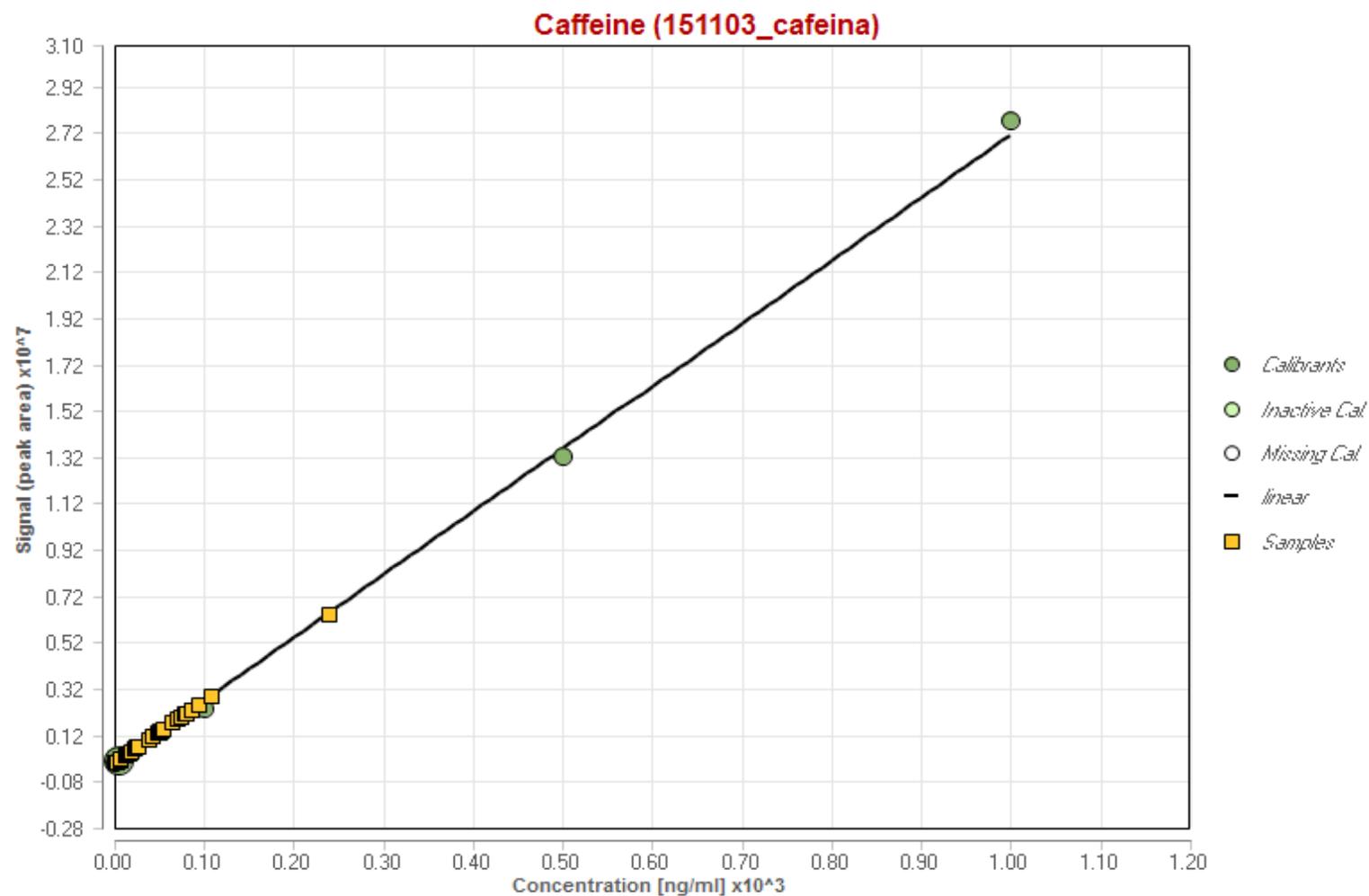
Gráfica 5.8.- Calibración HPLC para la detección de la biotina.

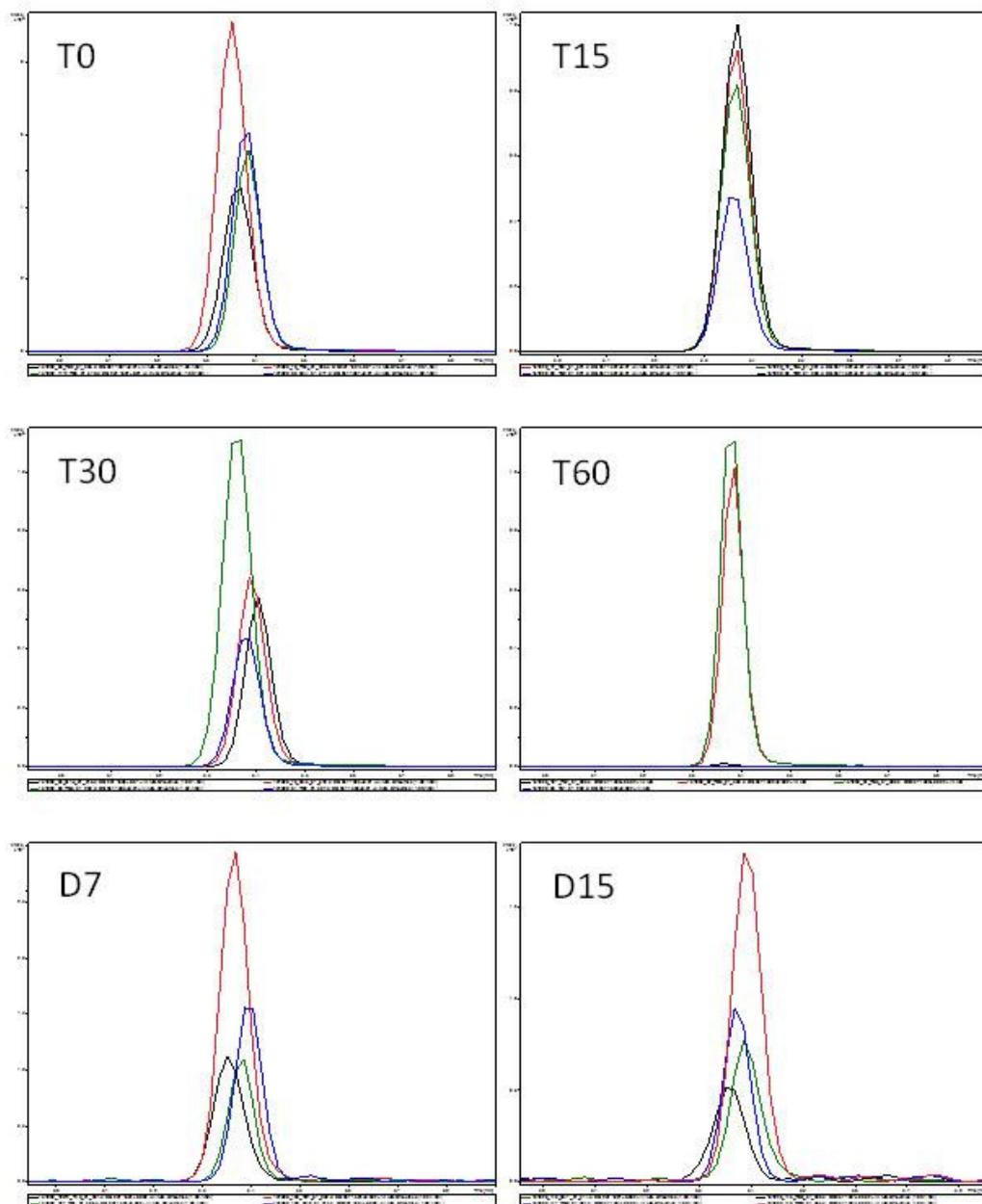


Gráfica 5.10.- Concentraciones cutáneas de cafeína según vía de administración y tiempos.



Gráfica 5.11.- Calibración HPLC para la detección de la cafeína.

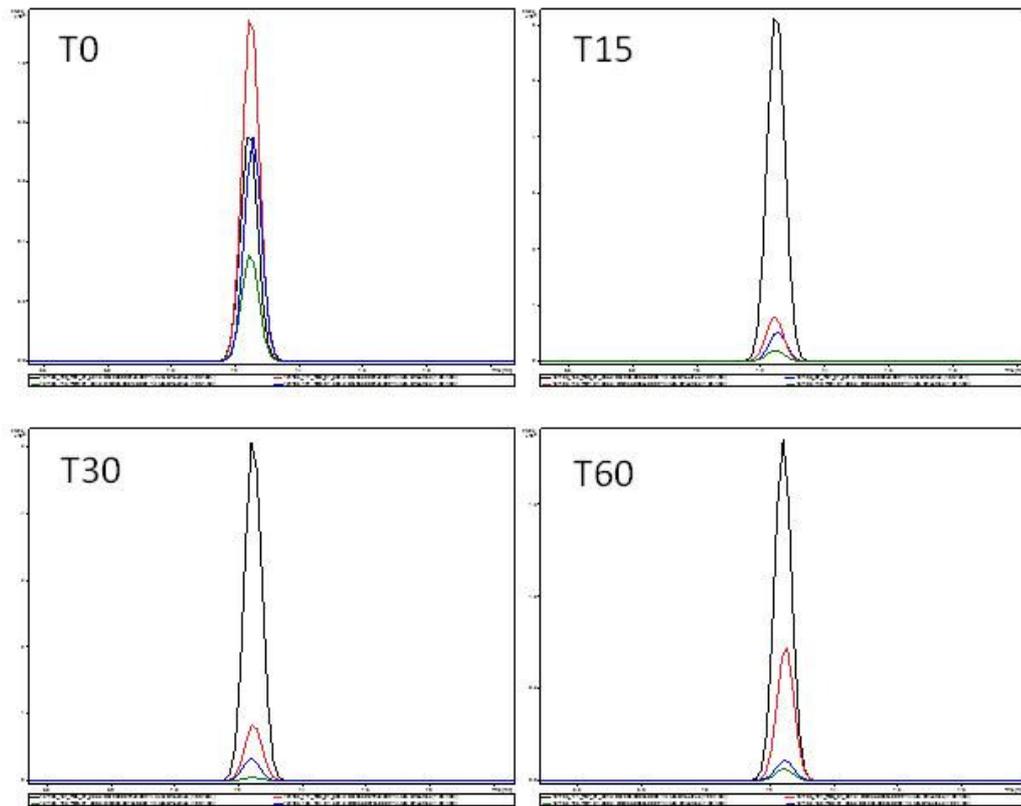




Procaína

En color negro, ID; en verde, MN+EP; en azul, MN; en rojo, EP.

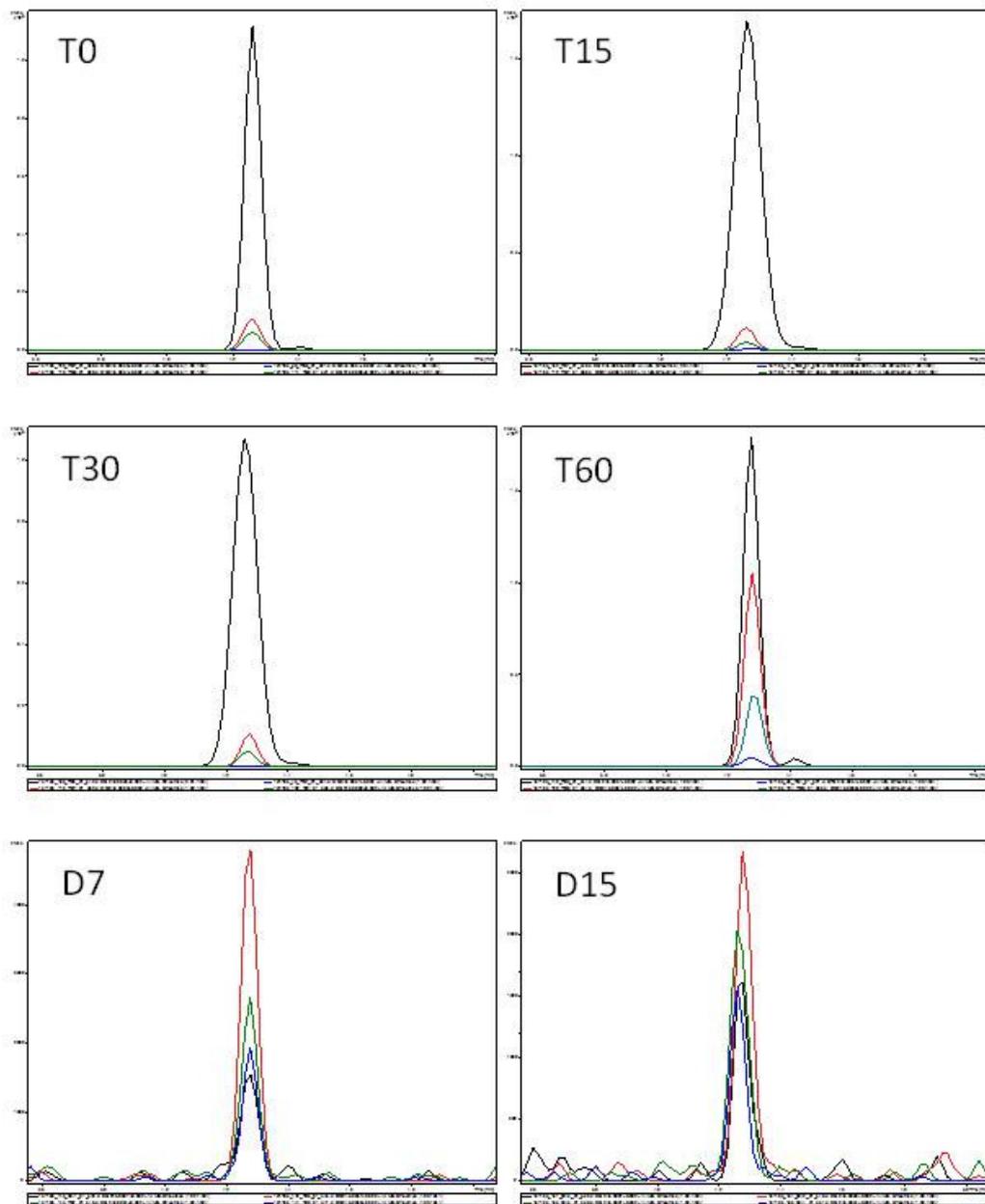
Gráfica 5.13.- Concentraciones cutáneas de procaína según vía de administración y tiempos.



Ketoprofeno

En color negro, ID; en verde, MN+EP; en azul, MN; en rojo, EP.

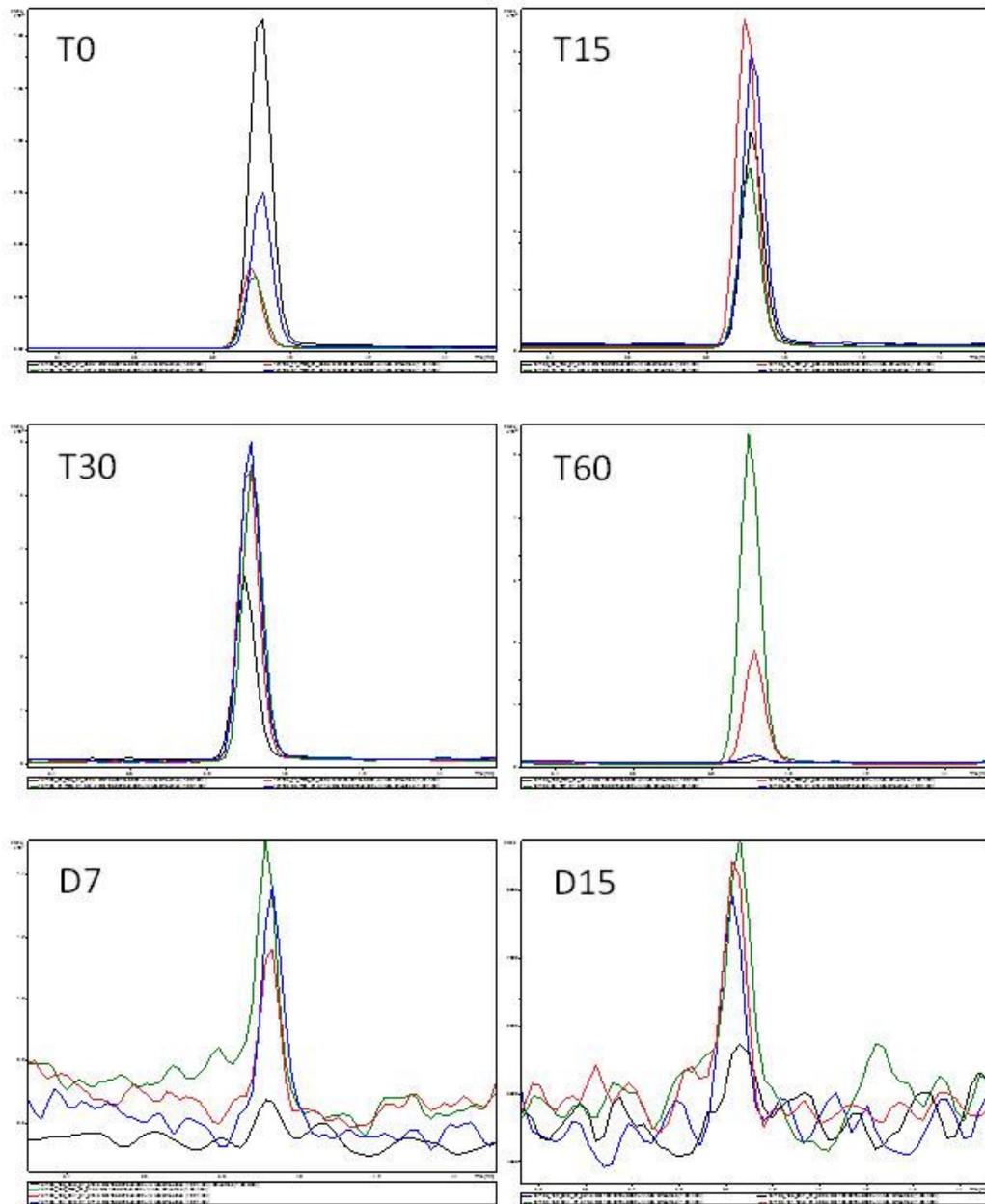
Gráfica 5.14.- Concentraciones cutáneas de ketoprofeno según vía de administración y tiempos.



Biotina

En color negro, ID; en verde, MN+EP; en azul, MN; en rojo, EP.

Gráfica 5.15.- Concentraciones cutáneas de biotina según vía de administración y tiempos.



Cafeina

En color negro, ID; en verde, MN+EP; en azul, MN; en rojo, EP.

Gráfica 5.16.- Concentraciones cutáneas de cafeína según vía de administración y tiempos.

Si se compara la concentración máxima obtenida de cada una de las moléculas estudiadas en función de las técnicas y los tiempos, los resultados varían ampliamente (Tabla 5.9).

Técnica	Producto	[C] _{máx}	% T ₆₀	% D7	%D14
ID	Biotina	T ₁₅	10,9	0,14	0,14
ID	Cafeína	T ₀	0,35	0,10	0,15
ID	Ketoprofeno	T ₁₅	42,79	-	-
ID	Procaína	T ₁₅	1,04	1,45	0,83
MN	Biotina	T ₁₅	97,9	1,29	1,29
MN	Cafeína	T ₀	2,25	1,27	0,46
MN	Ketoprofeno	T ₁₅	36,6	-	-
MN	Procaína	T ₀	0,71	3,21	2,14
EP	Biotina	T ₁₅	88,34	4,85	2,91
EP	Cafeína	T ₃₀	31,86	1,1	0,63
EP	Ketoprofeno	T ₀	68,86	-	-
EP	Procaína	T ₀	83,72	3,72	2,32
MN+EP	Biotina	T ₀	62,5	4,46	4,46
MN+EP	Cafeína	T ₃₀	94,57	1,59	1,11
MN+EP	Ketoprofeno	T ₀	28,68	-	-
MN+EP	Procaína	T ₃₀	77,77	1,29	0,92

Tabla 5.9.- Porcentaje de concentración de las moléculas a T60, D7 y D14 respecto a la concentración máxima alcanzada.

5.3. Variaciones en el grosor de la piel inducidas por las moléculas y técnicas utilizadas

Para valorar el espesor de la epidermis y la dermis en las distintas situaciones experimentales se han empleado los algoritmos propuestos por Hildebrand y Rüesgsegger (1997) y Saito y Toriwaki (1994), utilizando el software descrito en Material y Técnicas (Figs. 5.8 y 5.9). Esta parte del estudio se ha realizado exclusivamente en los experimentos de una y dos semanas ya que no es posible la aparición de cambios en periodos de tiempo más cortos, y cuando se utilizaron las técnicas de MN y MN + EP que son las pueden producir mayor agresión y reacción.

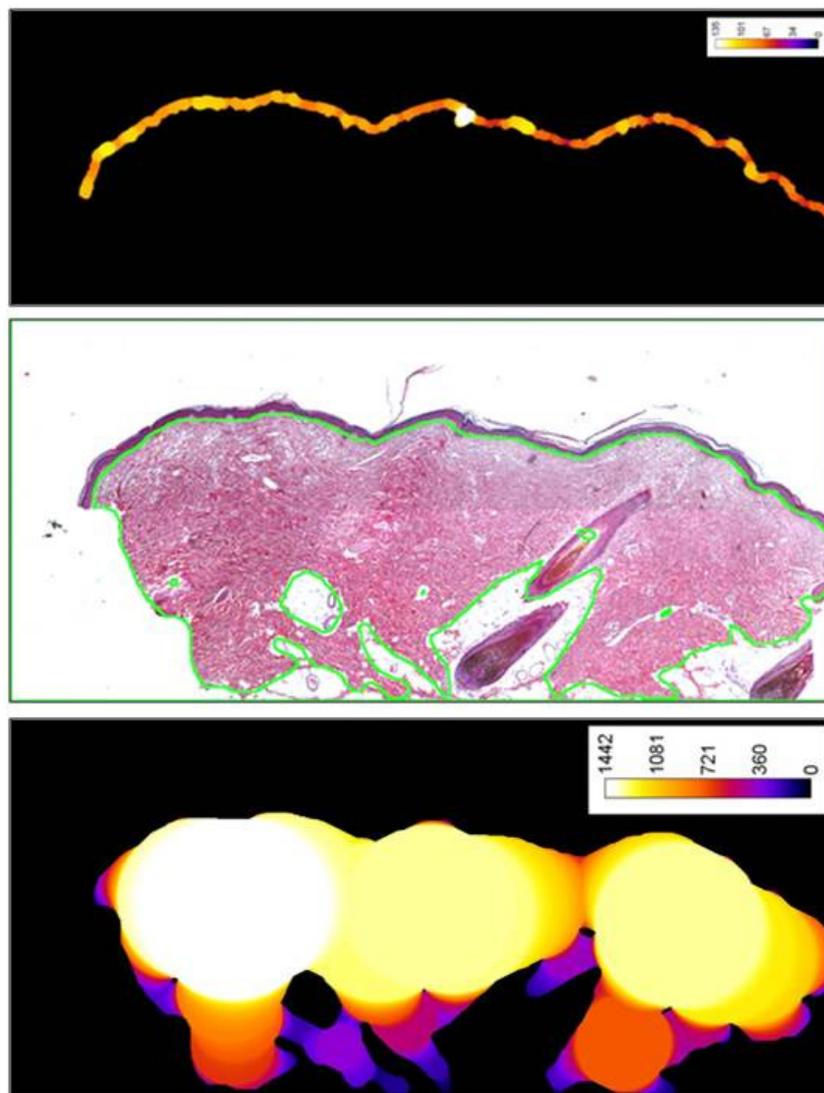


Figura 5.8.- Ejemplo de la metodología utilizada para la determinación del espesor y superficie de la dermis y epidermis.

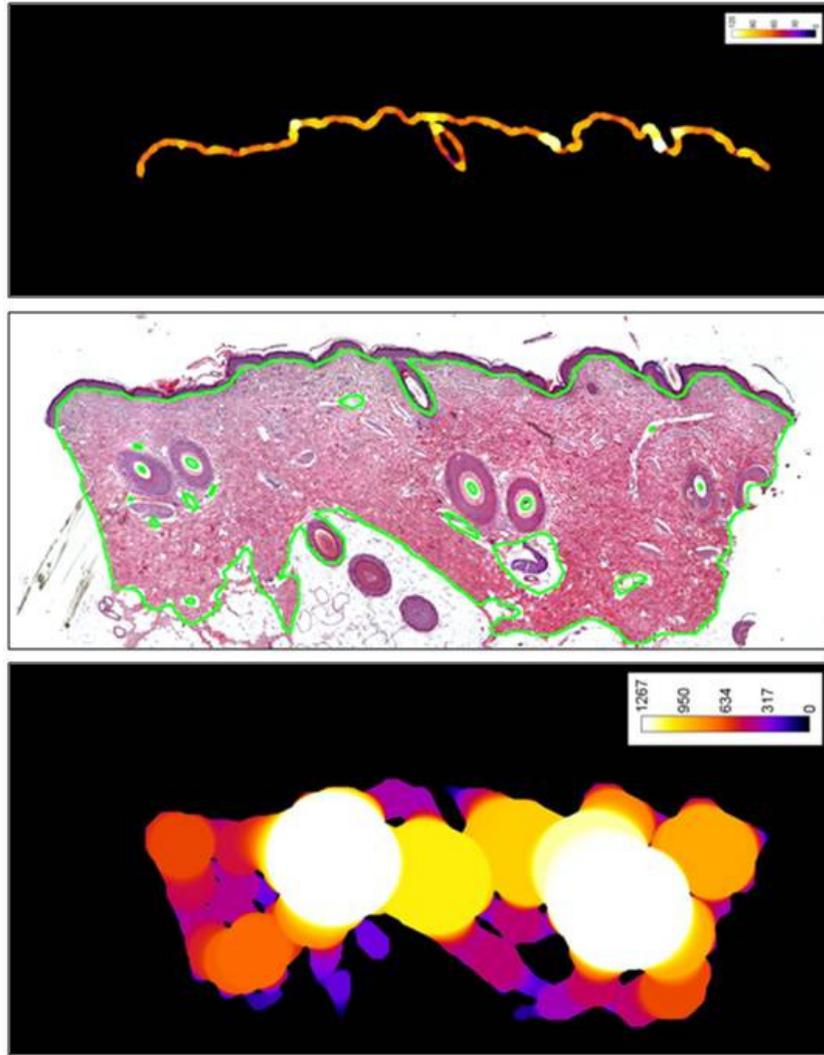


Figura 5.9.- Ejemplo de la metodología utilizada para la determinación del espesor y superficie de la dermis y epidermis.

Los datos de las mediciones individuales se recogen en las tablas A5.5, A5.6 y A5.7, y los valores medios se recogen en la tabla 5.10 y la representación gráfica de los resultados en las gráficas 5.17 y 5.18.

La técnica de MN causa una disminución del grosor de la epidermis en los tres animales estudiados e incrementa el grosor de la dermis en dos de ellos (animales 59 y 68). Por su parte, la asociación de MN+EP origina incremento del grosor de la epidermis en los animales 59 y 68, con ligera disminución en el 58, así como un incremento más discreto del grosor dérmico en los mismos animales en los que se ve incremento del grosor epidérmico.

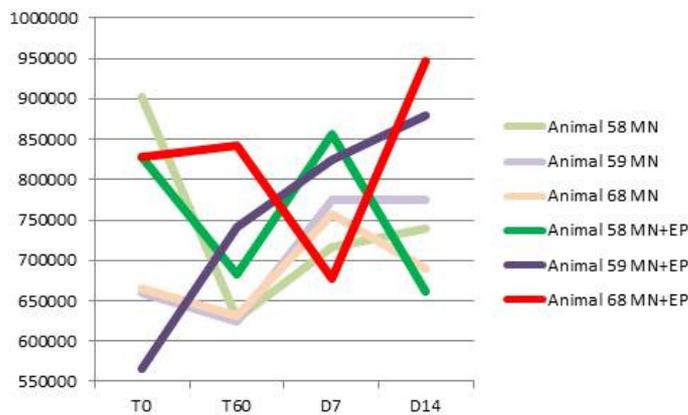
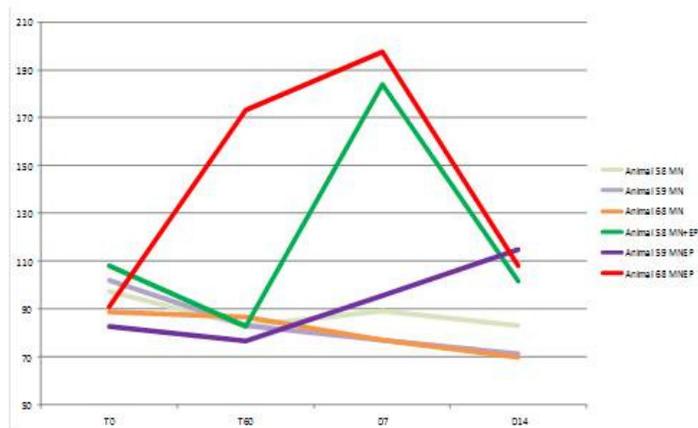
Porcentaje de variación del grosor de la epidermis de T0 a D14		
Animal	MN	MN+EP
58	-14,72%	-5,96%
59	-30,24%	+39,09%
68	-20,87%	+18,77%

Porcentaje de variación del grosor de la dermis de T0 a D14		
Animal	MN	MN+EP
58	-7,33%	-3,42%
59	+12,58%	+4,27%
68	+31,93%	+0,92%

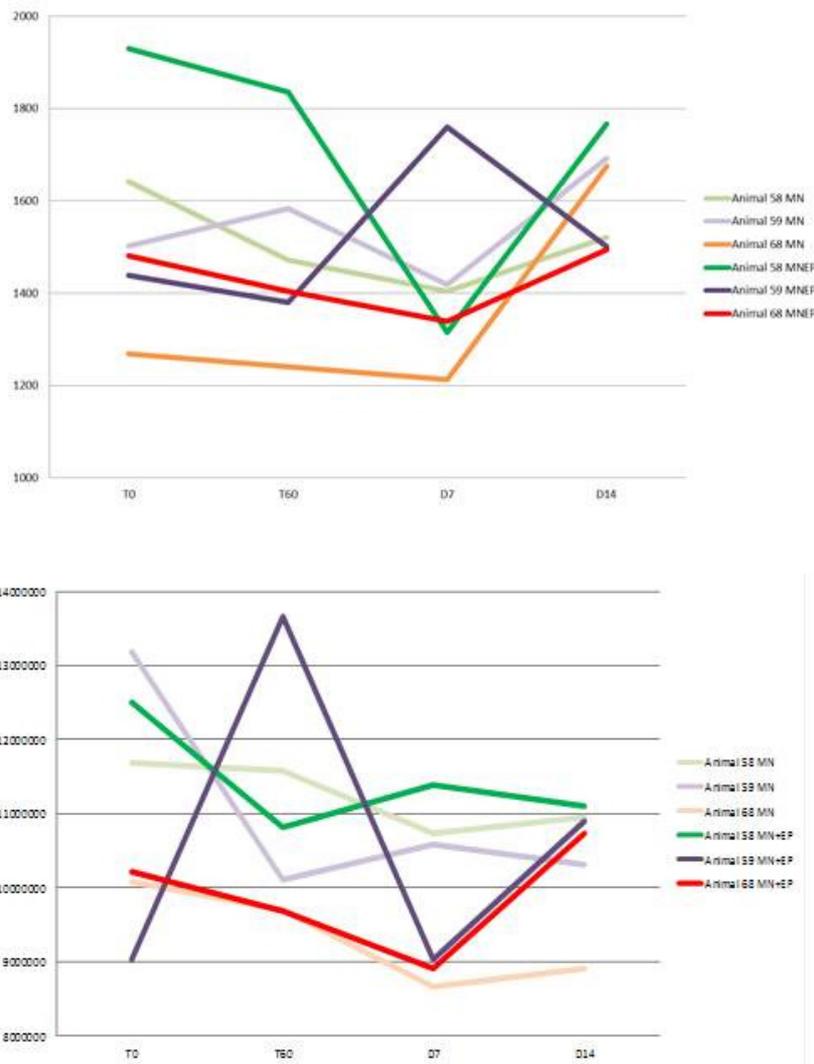
Porcentaje de variación de la superficie epidérmica de T0 a D14		
Animal	MN	MN+EP
58	-18,07%	-20,07%
59	+17,55%	+55,43%
68	+3,6%	+14,43%

Porcentaje de variación de la superficie de la dermis de T0 a D14		
Animal	MN	MN+EP
58	-6,27%	-11,24%
59	-21,81%	+20,74%
68	-11,62%	+5,08%

Tabla 5.10.- Valores del espesor y superficie de la epidermis y dermis expresados en porcentajes de los valores de la moda.



Gráfica 5.17.- Variaciones en el espesor (superior) y superficie (inferior) de la epidermis inducidas por las técnicas de MN y MN+EP en los animales analizados.



Gráfica 5.18.- Variaciones en el espesor (superior) y superficie (inferior) de la dermis inducidas por las técnicas de MN y MN+EP en los animales analizados.

Sin embargo, el análisis de las superficies en los animales a los que se les aplicó la técnica MN muestra un aumento importante en el animal 59, más discreto en el animal 68 mientras que el animal 58 responde con una marcada disminución de dicha superficie. Por el contrario, las muestras obtenidas tras la aplicación de la técnica MN+EP sobre las mismas muestras ofrece un incremento notable de la superficie de la epidermis en uno de los animales, más discreta en otro y una ligera disminución en el tercer ejemplar. En la dermis se cuantifica una disminución de la superficie en el animal 58, un ligero aumento en el animal 68 y más marcado en el animal 59.

5.4. Variaciones estructurales de la piel inducidas por las moléculas y técnicas utilizadas

Uno de los datos más destacables del estudio es que ninguna de las moléculas testadas ni ninguna de las técnicas de aplicación de las mismas utilizadas producen daños estructurales evidentes en la dermis y/o epidermis objetivables a simple vista bajo el microscopio (Fig. 5.10). Es evidente que las variaciones en el espesor/área de la dermis/epidermis que se objetivó en todos los animales deben de tener una base celular o en la matriz extracelular que se analizará más adelante.

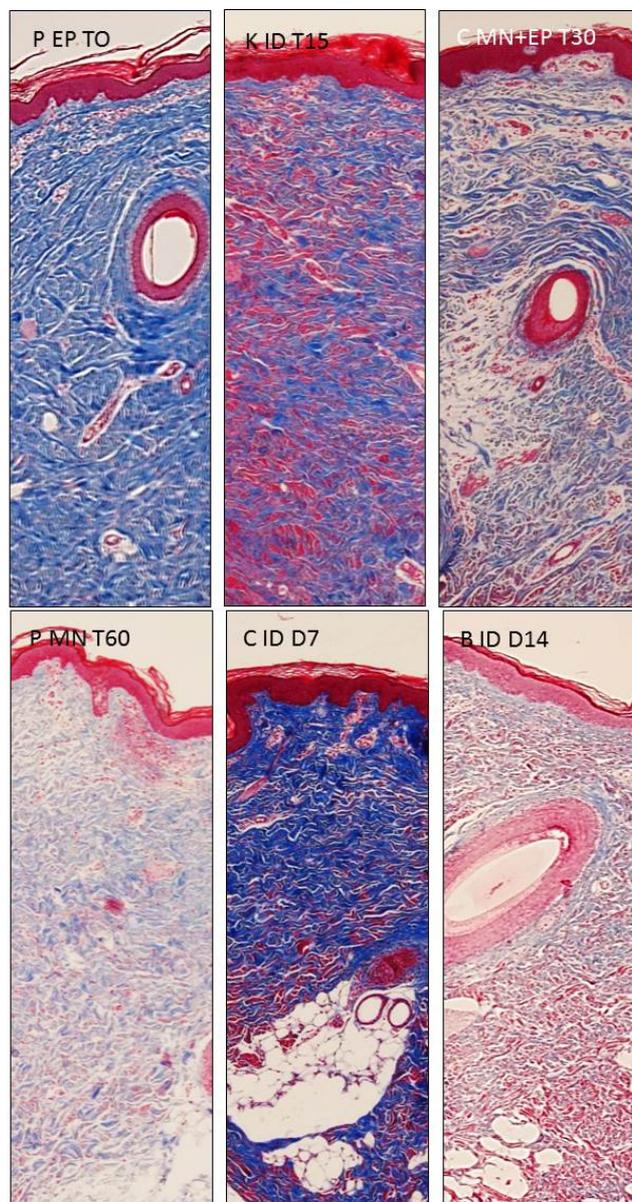


Figura 5.10.- Microfotografías correspondientes a diferentes moléculas, técnicas de aplicación y tiempos de evolución que demuestran la ausencia de cambios estructurales en dermis y epidermis.

Sólo en las secciones procedentes de animales a los que se les habían aplicado las moléculas con las técnicas de administración intradérmica mediante agujas de mesoterapia y micro agujas se observaron ocasionalmente los trayectos de entrada de las mismas y los desgarros epidérmicos mínimos que originan (Fig. 5.11)

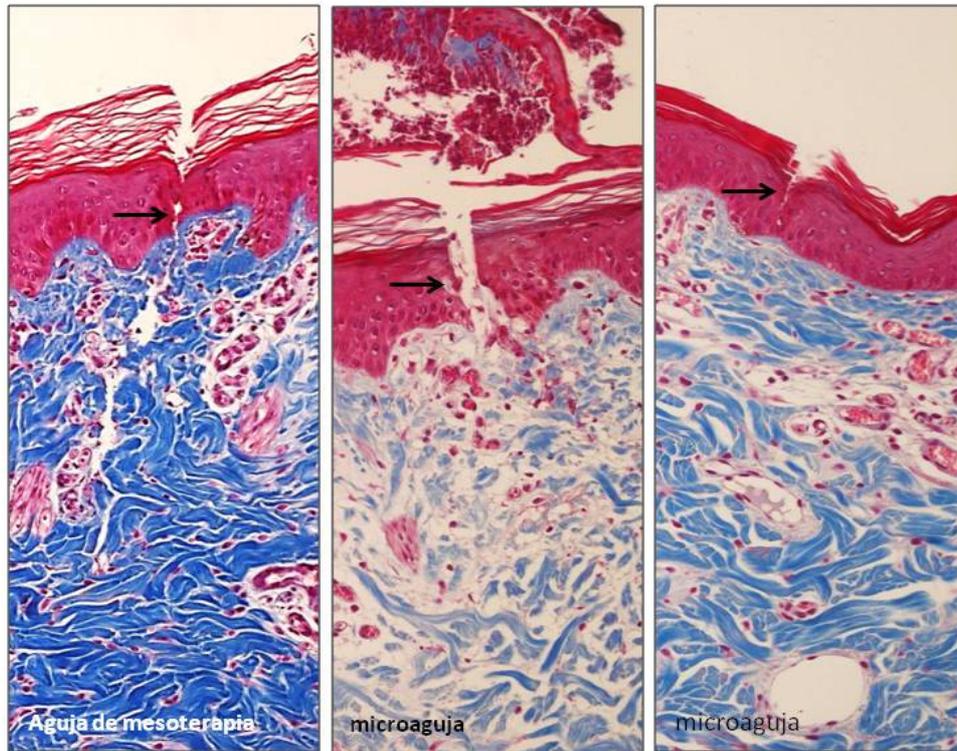


Figura 5.11.- Microlesiones (flechas) originadas por las agujas de mesoterapia y las microagujas en la epidermis y dermis superficial.

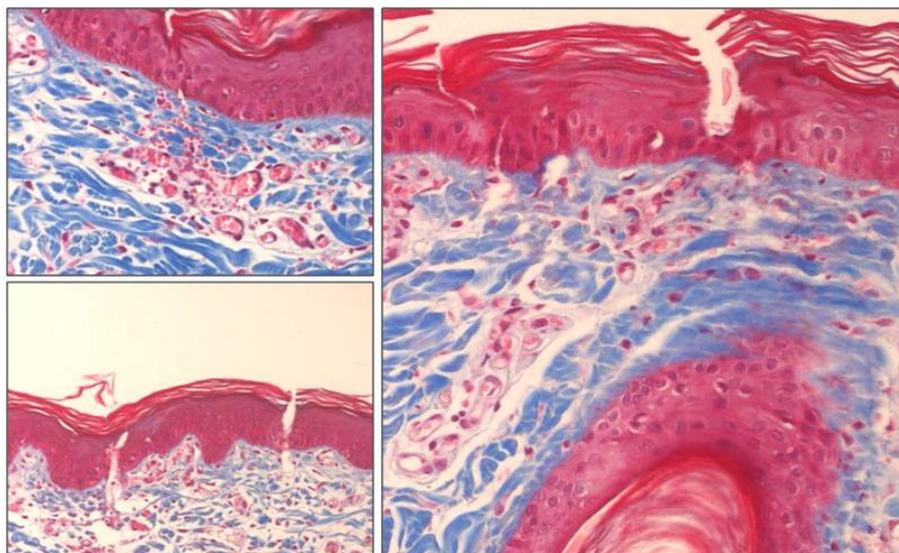


Figura 5.12.- Microlesiones y microhemorragias originadas por las agujas de mesoterapia y las microagujas en la epidermis y dermis superficial.

En la mayoría de los casos las perforaciones se limitaban a la epidermis y dermis más superficial y en el vértice de las mismas se observaron ocasionalmente extravasaciones de hematíes, pero nunca se apreciaron reacciones inflamatorias con infiltrado (Fig. 5.12).

5.5. Variaciones en la densidad de células dendríticas epidérmicas en las distintas condiciones experimentales.

Las dos categorías de células dendríticas cutáneas, melanocitos proteína S100 positivos y células de Langerhans vimentina positivas, se encuentran expuestas a cambios en el microambiente como consecuencia de la experimentación realizada. La proliferación o disminución de los melanocitos puede causar alteraciones en la pigmentación cutánea, y las variaciones en las células dendríticas informan sobre cambios en el estado de barrera inmunológica de la piel. Esta parte del estudio se ha realizado exclusivamente en los periodos de tiempo experimentales más largos ya que son los únicos en los que podrían objetivarse variaciones. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 5.11 y se ilustran en las figuras 5.13 a 5.15.

	MN	MN+EP	EP	ID
T60	3,3	5,1	4,2	4
D7	4,3	8,4	11,3	3,1
D15	4,6	8,1	9,4	5,2

Tabla 5.11.- Densidad de melanocitos por mm² a diferentes tiempo y con las varias técnicas de aplicación utilizadas.

Los resultados del estudio cuantitativo (determinando el número de perfiles celulares por mm² de superficie) sobre preparaciones de piel procesadas para marcar de forma selectiva los melanocitos demuestran que en las muestras de piel en los que se realiza electroporación aislada o asociada a microagujas la densidad de melanocitos es superior a la normal, mientras que las microagujas y la inyección intradérmica no producen variaciones.

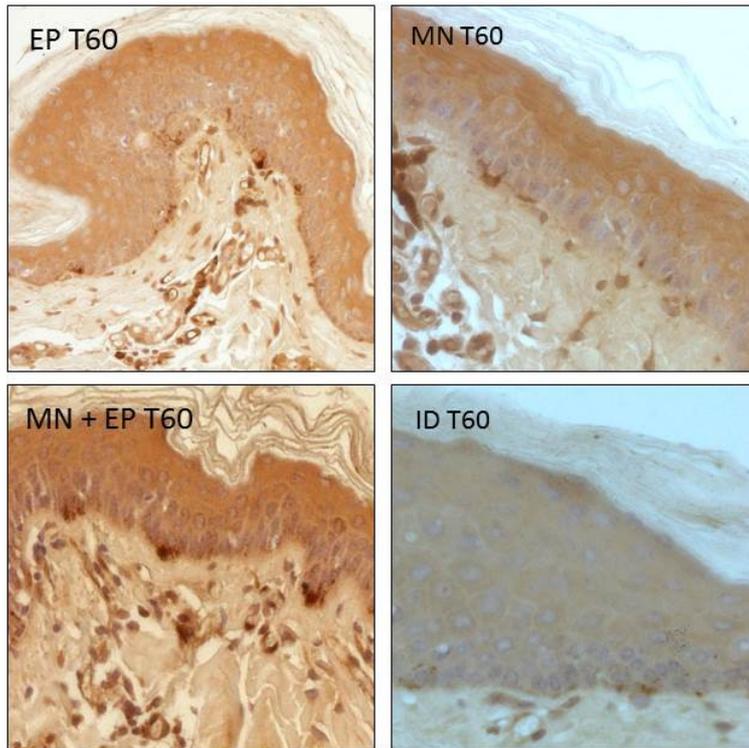


Figura 5.13.- Localización inmunohistoquímica de la proteína S100 en melanocitos a T60 con las diferentes técnicas.

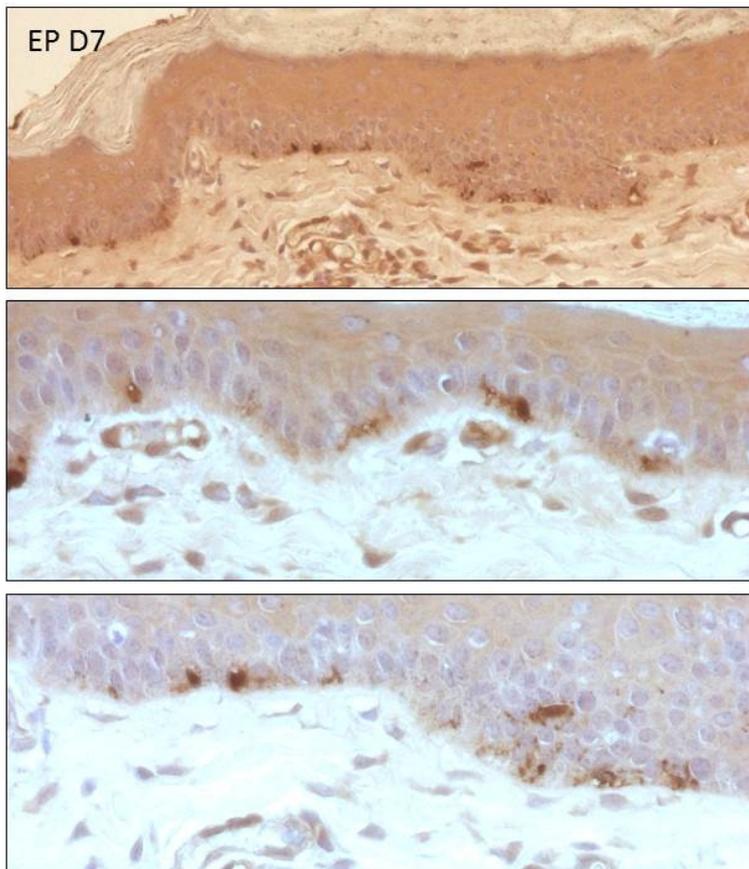


Figura 5.14.- Localización inmunohistoquímica de la proteína S100 en melanocitos a D7 tras electroporación.

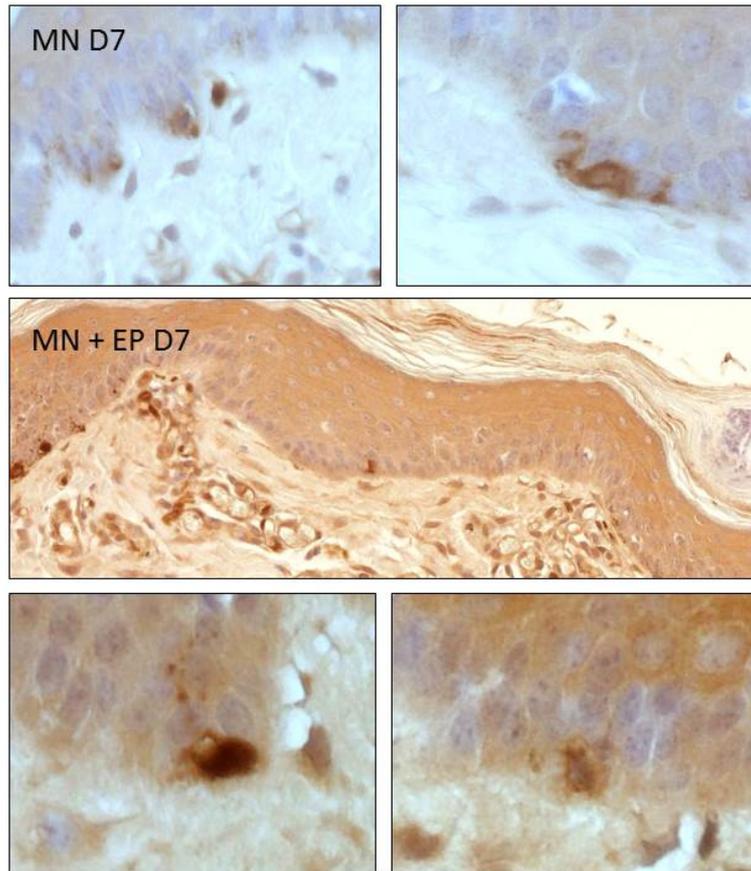


Figura 5.15.- Localización inmunohistoquímica de la proteína S100 en melanocitos a D7 tras electroporación y electroporación mas microagujas.

En cuanto a las células de Langerhans epidérmicas, estudiadas en los mismos animales, los resultados ofrecen una situación paralela a la de los melanocitos: se incrementan claramente en las técnicas que utilizan electroporación en tanto que con el resto de las técnicas no se producen variaciones (Tabla 5.12; figuras 5.16 y 5.17).

	MN	MN+EP	EP	ID
T60	1,2	2,1	1,3	1,1
D7	2,2	5,3	6,8	1,7
D15	1,4	6,4	4,1	2,2

Tabla 5.12.- Densidad de células de Langerhans por mm² a diferentes tiempo y con las varias técnicas de aplicación utilizadas.

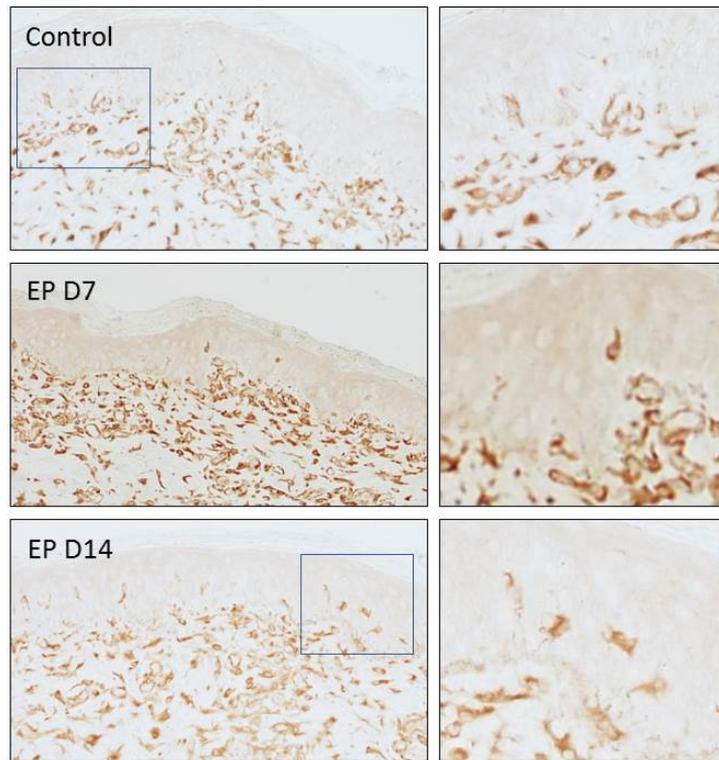


Figura 5.16.- Localización inmunohistoquímica de la vimentina en las células de Langerhans en la piel de animales sometidos a técnicas de electroporación a los 7 y 14 días.

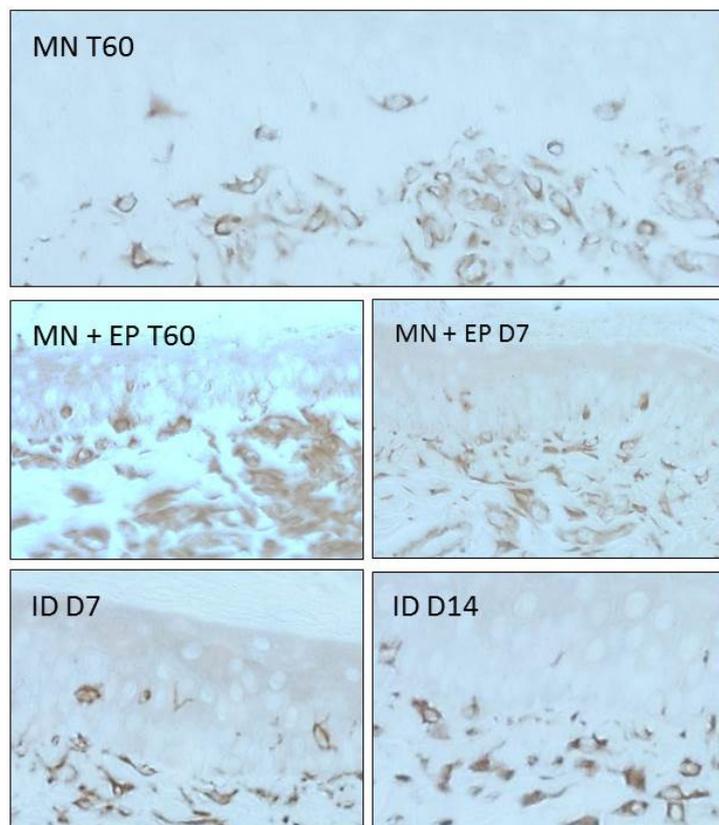


Figura 5.17.- Localización inmunohistoquímica de la vimentina en las células de Langerhans en la piel de animales sometidos a técnicas de MN, MN+EP e ID a los 60 minutos y 7 y 14 días.

5.6. Variaciones en la densidad de la red capilar de la dermis papilar y en la densidad de fibroblastos

Mediante análisis de imágenes y sobre áreas de la dermis papilar delimitadas manualmente, se procedió a evaluar el área ocupada por el plexo capilar superficial a los diferentes tiempos tras la administración de las moléculas con el fin de determinar si alguna de ellas produce variaciones en el área capilar. Esta parte del estudio se realizó sobre preparaciones procesadas para la localización de la vimentina (Figs. 5.18 y 5.19).



Figura 5.18.- Localización inmunohistoquímica de la vimentina en las secciones completas de piel analizadas, que incluyen las células vimentina positivas epidérmicas, los capilares del plexo vascular superficial y los fibroblastos dérmicos.

Los resultados muestran que independientemente de la técnica utilizada no hay diferencias notables en el porcentaje del área ocupada por la red capilar en los periodos finales de la experimentación (D14) ni durante la primera hora. Sólo a los 7 días, con la técnica MN y MN+EP, el lecho vascular parece un poco ampliado (Tabla 5.13).

Por lo que respecta al porcentaje del área ocupada por los fibroblastos vimentina positivos, evaluados a los diferentes tiempos de la experimentación y para las distintas moléculas no se han objetivado variaciones (Tabla 5.14).

	MN	MN+EP	EP	ID
T60	22,1	26,2	19,3	21,1
D7	19,6	36,3	18,3	20,6
D15	18,4	25,2	4,1	2,2
T60	20,3	22,7	22,8	18,2
D7	24,5	41,2	17,3	22,9
D15	18,4	26,4	24,1	23,2
T60	22,2	25,3	21,0	21,6
D7	21,1	41,2	22,4	24,0
D15	18,9	24,3	24,1	23,2
T60	21,7	24,6	20,9	17,9
D7	23,2	39,8	24,5	23,2
D15	21,5	26,1	26,3	27,1

Tabla 5.13.- Densidad del plexo vascular superficial (expresada en % del área preestablecida manualmente) para las diferentes moléculas, tiempos y técnicas.

	MN	MN+EP	EP	ID
T60	15,5	17,4	13,7	17,2
D7	18,4	14,9	16,8	20,1
D15	14,6	17,3	18,2	14,7
T60	18,6	16,5	14,8	16,2
D7	14,3	16,2	18,1	16,6
D15	16,1	16,2	14,9	15,2
T60	17,3	14,7	17,1	17,2
D7	16,6	16,1	14,3	16,2
D15	17,3	18,0	14,9	15,3
T60	17,7	20,1	16,3	15,8
D7	17,2	15,4	16,2	15,9
D15	16,1	18,3	15,8	18,4

Tabla 5.14.- Densidad de fibroblastos vimentina positivos (expresada en % del área preestablecida manualmente) para las diferentes moléculas, tiempos y técnicas.

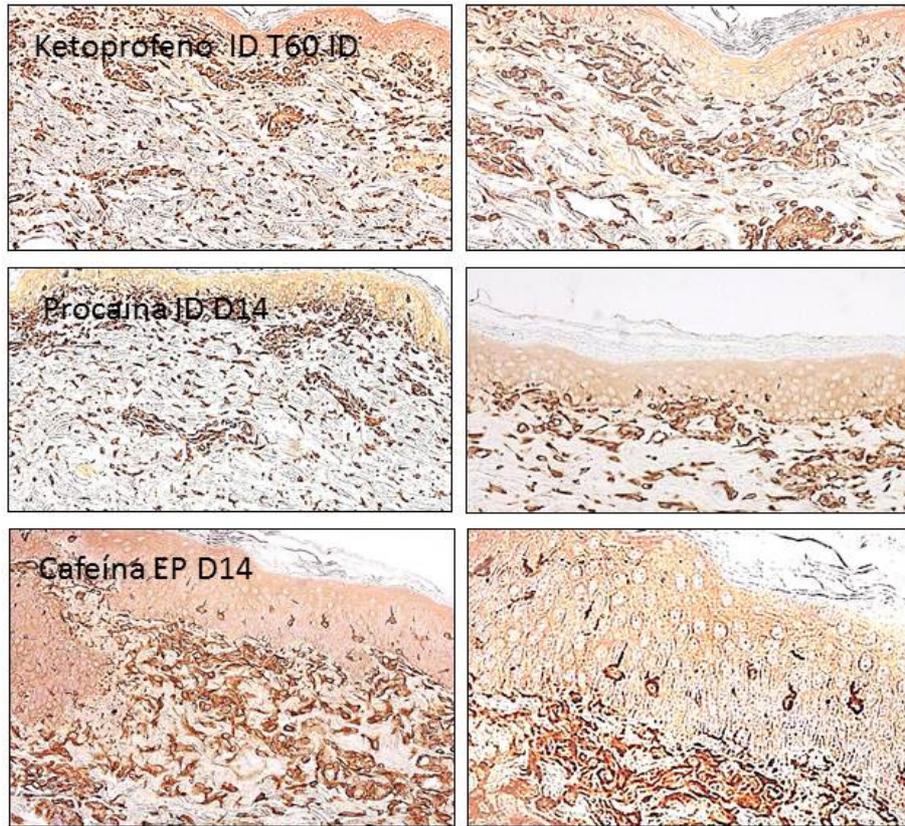


Figura 5.19.- Localización inmunohistoquímica de la vimentina en secciones de piel utilizando diferentes moléculas, técnicas y tiempos.

Discusión

6. Discusión.

6.1. Consideraciones generales

El presente trabajo de tesis doctoral se diseñó para explorar el potencial de paso de moléculas con diferentes características y propiedades organolépticas a través de los estratos de la piel.

La piel se utilizó desde tiempos inmemoriales para aplicar remedios terapéuticos de forma tópica, combinando distintas presentaciones galénicas para adaptarse a las peculiaridades del principio activo utilizado. Sin embargo, la paradoja de que algunos venenos muy potentes sean letales cuando son utilizados por vía oral o parenteral y no lo sean cuando entran en contacto con la piel intacta, acrecentó la teoría de que la piel era una barrera infranqueable, idea que prácticamente se mantuvo hasta bien entrado el siglo XX.

El estrato córneo de la epidermis representa una barrera lipofílica importante: por un lado, evita la pérdida excesiva de agua desde el interior del cuerpo, pero por otro, impide la penetración de moléculas, la difusión transcutánea de fármacos y solo permite el paso de pequeñas moléculas lipófilas. Pero además, la queratina dificulta el paso de moléculas, tanto de hidrosolubles como liposolubles, y la sustancia intercelular formado por lípidos hidrófobos, es impermeable a las sustancias hidrofílicas. Todos estos hechos han estimulado la búsqueda de diferentes técnicas y métodos que permitan aumentar la permeabilidad cutánea e incorporar al arsenal terapéutico moléculas más grandes. Con este objetivo se han desarrollado diferentes sistemas, tanto de tipo físico como químico, entre los que se encuentran la electroiontoporación, el uso de microagujas o la inyección intradérmica mediante pequeñas agujas huecas (mesoterapia o intradermoterapia) utilizadas en nuestro estudio.

Cuando un compuesto logra pasar el estrato corneo y atravesar la epidermis viva puede alcanzar la dermis y a través de los vasos que hay en ella llegar al torrente circulatorio y ejercer sus efectos de forma sistémica. O puede anclarse a componentes

de la membrana celular de los queratinocitos y células de la dermis e inducir respuestas biológicas locales; o ligarse a la matriz extracelular y quedar a disposición de las células circundantes. Sin perder de vista que en la piel hay nervios y si se unen a las células de Schwann o a los axones pueden irritarlos o bloquearlos. Y que si actúan sobre las células de las paredes capilares pueden facilitar o bloquear el tránsito de moléculas desde la sangre. Todas estas opciones se han tenido siempre en mente durante el desarrollo del estudio.

Pero la piel *per se*, especialmente las capas más superficiales de la epidermis, suponen una barrera para cualquier sustancia que pretenda atravesarla: la hidrofilia o lipofilia de los diferentes estratos epidérmicos facilita el paso de algunas moléculas y retiene a otras; la polaridad de la epidermis y la dermis atrae hacia ellas a moléculas con diferentes cargas eléctricas. Para salvar el obstáculo epidérmico se han ideado a lo largo de la historia diferentes estrategias. En nuestro caso hemos analizado cuatro: la inyección dérmica que libera el compuesto en dermis tras atravesar epidermis y membrana basal; la electroporación o ionto-electroporación que facilita el paso de sustancias a través de la epidermis gracias a abrir los espacios intercelulares actuando mediante corrientes eléctricas; la utilización de microagujas que atraviesan sólo epidermis y membrana basal haciendo que las moléculas alcancen la unión dermo-epidérmica. Y, por último se ha analizado el efecto combinado de la electroporación y las microagujas. En todos los casos se trata de procedimientos muy poco traumáticos para el paciente, casi nada molestos o dolorosos y, por tanto, fácilmente tolerables y aceptables para su utilización en clínica.

Se ha analizado el comportamiento en la piel de cuatro sustancias (procaína, ketoprofeno, biotina y cafeína) con diferentes características físicas, químicas y de aplicación en clínica. Seguramente la posibilidad de su absorción transcutánea abre posibilidades terapéuticas para estas moléculas u otras relacionadas estructuralmente con ellas.

Antes de pasar a discutir los resultados obtenidos es conveniente hacer una serie de consideraciones a propósito del modelo animal y de las técnicas de estudio utilizadas.

La piel del cerdo ya ha sido utilizada con éxito en trabajos sobre liberación de fármacos, toxicología dérmica y reparación tisular (Ferri y Cols., 1995; Qvist y Cols., 2000; Sullivan y Cols., 2001). Además actualmente la piel representa el paradigma de intensas investigaciones en los campos de la adhesión celular, inflamación y células madre. Las células de la epidermis humanas son muy heterogéneas y responden de manera muy diferente a las señales extrínsecas (ver Watt, 2014).

Se eligió el modelo suino frente a todos mamíferos (especialmente roedores empleados habitualmente en investigación como ratones, ratas o conejos) porque comparten la arquitectura tisular (epidermis dermis e hipodermis) y el ciclo biológico es semejante, en torno a los 30 días (Weinstein, 1965; Bartek y Cols., 1972; Godin y Touitou, 2007). Además su estructura, ultraestructura y el perfil inmunostiquímico de piel vellosa del hombre y del cerdo presentan notables similitudes (Mawafy y Cassens, 1975; Meyer y Cols., 1978; Wollina y Cols., 1992; Liu y Cols., 2010; Debeer y Cols., 2013). No obstante, la mayoría de los autores están de acuerdo en que hay mucha variabilidad en la estructura de la piel en función de la raza de los animales (ver Liu y Cols., 2008, 2010; Debeer y Cols., 2013), aunque los estudios sobre la piel de razas de cerdos domésticos comunes parecen confirmar que es un buen modelo (ver Debeer y Cols., 2013).

Los resultados obtenidos en el estudio estructural son coincidentes con los de todos los trabajos consultados y en la piel del cerdo se pueden encontrar los mismos estratos y elementos celulares que en la piel humana. Pero en base a los datos de la literatura sobre las uniones intercelulares en la piel humana (Morita y Miyachi, 2003; Yuti y Cols., 2007; Morita y Cols., 2011; Watt, 2014; Ishiga-Yamamoto y Igawa, 2015) la piel del cerdo estudiada en nuestro trabajo presenta pocas uniones intercelulares demostrables mediante ultraestructura; en otras palabras, la epidermis del cerdo sería más permeable a las moléculas que intenten atravesarla ya que hay menos uniones entre las células. A pesar de todo, esta parte de nuestro trabajo (el relativo a la ultraestructura de la piel del cerdo) debe de ser reevaluado en profundidad utilizando las muestras de piel en las condiciones idóneas en este tipo de estudios (perfusión de

los animales o de los tejidos a estudiar) ya que parte de las diferencias encontradas pueden deberse a factores técnicos.

Con carácter general, y a los fines del estudio, el modelo de la piel de cerdo puede considerarse una elección correcta, pero su extrapolación a humanos debe de realizarse con precaución ya que la piel humana difiere en función de la localización, la edad, la etnia o el sexo (Berardesca y Maibach, 2003; Wesly y Maibach, 2003; Dao y Kazin, 2007) y todo ello determina variaciones en la farmacocinética cutánea (Anderson, 2008).

En cuanto a las técnicas de estudio utilizadas, las estructurales y ultraestructurales fueron las apropiadas, con independencia de los resultados obtenidos al permitir analizar en detalle la composición de la piel. Sin embargo, puede considerarse un fracaso el estudio inmunohistoquímico ya que de todos los antígenos que se pretendieron estudiar en un primer momento (sobre la base de los datos publicados por Debeer y Cols., 2013), sólo se obtuvo positividad específica para la vimentina, la proteína S100 y el colágeno de tipo IV. No se logró inmunopositividad específica para CD34, colágeno de tipo III, factor de von Willebrand, desmoplakinas y VEGF-R. Ello puede ser debido a varios posibles factores entre los que se encuentran la especificidad de los anticuerpos, el procesado de las piezas o las características antigénicas especie-específicas de la piel del cerdo. En estudios posteriores se pretende retomar este asunto porque puede aportar importante información sobre la biología de la piel como barrera. En cuanto a la técnica de HPLC utilizada para determinar las concentraciones cutáneas de los medicamentos estudiados, puede considerarse como la más adecuada y ha sido ampliamente utilizada con este propósito (ver Chen y Cols., 2015; Park et al., 2016).

6.2. Discusión de los resultados

6.2.1. Concentraciones cutáneas de las moléculas

A pesar de que la piel constituye una barrera prácticamente infranqueable para el paso de elementos químicos (especialmente los hidrosolubles) a su través, ofrece

potenciales ventajas como vía de administración de fármacos por el hecho de no ser gastrolesiva o evitar el primer paso hepático que podría ser responsable de la destrucción parcial o total de los mismos. Por ello se han desarrollado distintos métodos para permeabilizarla. El presente estudio parte del conocimiento de que la vía intradérmica vs la vía subcutánea u otras vías parenterales, potencia la actividad de los fármacos puesto que esta forma de administración les dota de una farmacocinética particular que puede llegar a incrementar hasta 20 veces la absorción de algunas macromoléculas (Milewski y Cols., 2015; McVey y Cols., 2012; Corbel, 1986).

Los datos aportados por el estudio de las muestras de piel mediante HPLC muestran diferencias en cuanto a las concentraciones máximas alcanzadas por las sustancias estudiadas en función de la técnica de permeación utilizada para su administración. En el caso de la procaína, las técnicas electroporación y de microneedling más electroporación a T30 y T60 so con las que se obtienen concentraciones más elevadas, incluso superiores de las obtenidas mediante administración intradérmica, con la que se obtienen los valores más elevados en T15. Para el ketoprofeno, los mayores niveles se logran suministrándolo por vía intradérmica a todos los tiempos estudiados, seguida por la electroporación, las microaguas y la combinación de estas dos últimas. En el caso de la biotina la vía intradérmica vuelve a presentarse como aquella con la que se consiguen valores tisulares más altos a T30, si bien a T60 parece ser más efectiva la administración mediante microagujas. Finalmente, por lo que respecta a la cafeína, con la vía intradérmica solo se consiguen los niveles del fármaco más elevados en el momento mismo de la inyección; a periodos de tiempo ligeramente superiores (T15) es la eficaz la administración mediante electroporación y microagujas, y para mantener concentraciones altas a T30 y T60 cualquier vía de las estudiadas logra mejores resultados que la intradérmica. En resumen, si se define la eficacia de una técnica por la permanencia de la mayor concentración del producto administrado, a T60 las técnicas más eficaces son la electroporación, las microagujas y las combinación de las dos, y la menos eficaz es la vía intradérmica. Todos los comentarios anteriores se refieren a los primeros 60 minutos tras la administración del fármaco, ya que en los otros tiempos estudiados (a la semana y las dos semanas) en la piel de los animales

sólo se detectan niveles residuales de las moléculas. Pero se desconoce si niveles tan bajos son capaces de realizar algún efecto biológico o no.

Los resultados de HPLC obtenidos en la piel para el ketoprofeno y la procaína administrados por vía intradérmica, concuerdan con los obtenidos por Binaglia y Cols. (1981a, 1981b) en lo que respecta a la evolución de las concentraciones cutáneas de ambos productos. Sin embargo, si se relaciona la eficacia de un medicamento con la mayor permanencia en el tejido, a la vista de los resultados se puede afirmar que la técnica más eficaz de administración a T60 es la de microagujas mas electroporación, mientras que la ID aporta mayores concentraciones en tiempos más cortos.

Las concentraciones cutáneas de los medicamento estudiados en función de los niveles alcanzado y su permanencia en la piel, muestran claras diferencias en cuanto a los productos y las técnicas de permeación cutáneas utilizadas siendo la vía intradérmica la mejor para la biotina y el ketoprofeno, mientras que la técnica no guarda ninguna relación con los niveles tisulares de cafeína y la procaína. El hecho de que procaína y cafeína compartan propiedades químicas y físicas (carga positiva, hidrosolubilidad y valores de pKa altos) y estas sean notablemente diferentes de las del ketoprofeno y la biotina (liposolubilidad, cargas negativas y valores de pKa bajos) parece tener relevancia en lo que respecta a facilitar o dificultar el paso transdérmico, incluso una vez rebasado el estrato córneo.

La ventaja de utilizar este tipo de administración transcutánea es el incremento de la actividad terapéutica en el tiempo, lo que queda demostrado con la presencia de cantidades residuales de todos los productos a D7 y D14. Por otro lado, la cantidad de medicamento administrado no disminuye con el lavado de la zona de piel donde fue aplicado, como sí ocurre con la administración tópica o mediante parches (Takeshi y Cols., 2014).

Son sorprendentes las diferencias en la concentración de fármaco y en tiempo en que se consiguen utilizando dos técnicas que perforan la epidermis y alcanzan diferentes profundidades en la dermis; es decir, la administración intradérmica vs. la utilización

de microagujas. Milewski y Cols. (2010) llaman la atención sobre el hecho de que una variación mínima en la profundidad a la que se realice la inyección modifique tanto la farmacocinética de macromoléculas, de tal manera que se podría llegar a alterar *in vivo* los perfiles farmacocinéticos de los fármacos sin realizar cambios en su composición, simplemente inyectándolos a diferentes profundidades en la piel. Para explicar este hecho han sido invocadas las diferencias entre las características microcirculatorias y linfáticas de la dermis frente al subcutis (Harvey y Cols., 2011), que ya fueron puestas de relieve en trabajos llevados a cabo a finales del siglo XX (Multedo, 1985). Pero, por otra parte, se sabe que la fragmentación del medicamento que se administre por vía intradérmica, también determina que su efecto terapéutico se vea incrementado de forma considerable, tal y como fue propuesto por Kaplan y Cols. (1988) y refrendado recientemente (Wonglertnirant y Cols., 2010).

Es conocido que la combinación de técnicas físicas, como lo realizado en el presente trabajo, contribuye al aumento de la liberación de medicamentos a través de la piel, pero no hay referencias acerca de su aplicación *in vivo* tal y como se ha desarrollado en este estudio. Si a las estrategias físicas habituales para incrementar el paso transdérmico de sustancias activas, se le añade la administración intradérmica, la microperforación (bien sola o asociada con electroiontoporación) y la electroiontoporación se logra un aumento de la cantidad de fármaco intradérmico que además se mantiene durante más tiempo; en definitiva, se potencia la biodisponibilidad del producto. La microperforación es una forma sencilla y mínimamente invasiva de incrementar la absorción de sustancias por vía percutánea y representa un método potencialmente útil para otras aplicaciones y otros principios activos (Stahl y Cols., 2012). La profundidad de los microporos formados con nuestro protocolo queda limitada a la transición de la epidermis a la dermis con lo que la sensación dolorosa que puede producir queda bastante minimizada, siendo una técnica bien tolerada por personas que padecen de belenofobia.

6.2.2. Las técnicas de permeación cutánea utilizadas no producen cambios en la estructura de la piel

Una de las consecuencias que puede acarrear la administración de un compuesto por vía transdérmica, es que se ligue de forma más o menos estable a los componentes de la matriz extracelular determinando procesos inflamatorios que, en última instancia, produzcan alteraciones en la estructura de la piel que puedan llevar a anomalías en la epidermis y a la formación de cicatrices en la dermis. Además, una sustancia candidata a ser suministrada a través de la piel no debe de causar ni adelgazamientos ni engrosamientos cutáneos en la zona de aplicación ya que impedirían a este órgano cumplir con las funciones propias. Los resultados del presente trabajo, obtenidos utilizando una metodología de precisión, demuestran que el espesor de la dermis/epidermis en los animales a los que se les sometió a las diferentes técnicas de permeación no se modifica respecto a los animales normales, si bien se han observado algunas pequeñas diferencias. Estos hallazgos difieren de los obtenidos por otros autores que describen incrementos variables entre el 140% y más del 650% en el grosor epidérmico (Aust y Cols., 2011; Zeitter y Cols., 2014). Seguramente estas diferencias sean atribuibles a los diferentes protocolos utilizables, que hace que los resultados no sean comparables.

Cuando se produce una agresión en la piel, esta reacciona mediante un proceso de curación que lleva parejos cambios en epidermis y dermis y que dan lugar a una cicatriz (ver Andrews y Cols., 2016). Si la función de barrera de la piel se rompe como consecuencia de una agresión, se pone en marcha el mecanismo de la cicatrización que discurre en tres fases denominadas fase inflamatoria, fase proliferativa y fase de remodelación. Este proceso incluye la participación de elementos celulares procedentes de la propia epidermis (queratinocitos, melanocitos y células de Langerhans), de la dermis (fibroblastos, mioblastos), de los vasos agredidos (plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliales, etc.), de estructuras anexas (células papilares del pelo), del sistema nervioso (neuronas) y de los adipocitos subcutáneos (Yamaguchi y Yoshikawa).

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta tesis, ninguna de las técnicas de permeación cutánea utilizadas, ni ninguno de los fármacos estudiados, produce una agresión tal que resulte en un proceso de cicatrización. Esta afirmación se sustenta en tres observaciones del trabajo. Primero: no se observan cambios en la estructura de la piel en las preparaciones histológicas. Segundo: la densidad de fibroblastos de la dermis no cambia como consecuencia de las intervenciones realizadas sobre ella. Tercero: el lecho vascular, que necesariamente se amplía en los procesos de reparación tisular, tampoco sufre cambios objetivables. Obviamente debería disponerse de datos sobre las posibles variaciones en la matriz extracelular de la dermis para confirmar definitivamente esta apreciación.

6.2.3. La técnica de permeación cutánea de electroporación o electroporación asociada a microagujas incrementa la densidad de células dendríticas de la piel

La piel de los vertebrados, incluida la del hombre y la del cerdo, contienen células de morfología dendrítica que en base a su morfología, localización y perfil antigénico pueden dividirse en melanocitos y células de Langerhans; las primeras son las responsables de la pigmentación de la piel y las segundas son células presentadoras de antígenos cruciales en el desarrollo de las respuestas inmunes a los patógenos y en la tolerancia a los propios antígenos (Patel y Metcalf, 2016). Recientemente, Market y Cols. (2015) y Summerfield y Cols. (2015) han demostrado que las células dendríticas de la piel del cerdo son equivalentes a la de la piel humana.

Mediante inmunomarcaje con proteína S100 y vimentina, en la piel de cerdo se han puesto de evidencia dos poblaciones celulares: los melanocitos y las células dendríticas propiamente dichas o células de Langerhans. El perfil inmunohistoquímico de ambos tipos de células coincide por el encontrado de Debeer y Cols. (2013). Las dos poblaciones celulares sufren escasas modificaciones en cuanto a su densidad en la mayoría de las diferentes condiciones experimentales creadas en este estudio. Sin embargo, en las muestras de piel que habían sido sometidas a electroporación se encontraron mayores cantidades de melanocitos y células de Lanherhans que en la piel normal y en la piel tratada con el resto de las técnicas de permeación estudiadas. En

principio este efecto puede atribuirse al efecto de la corriente eléctrica utilizada en electro-iontoporación, pero no se han encontrado en la bibliografía estudios que avalen o rechacen esta interpretación. Son necesarios, pues, ulteriores estudios para aclarar la posible influencia de los campos eléctricos en la proliferación y/o migración de las células dendríticas de la piel y cuáles son las posibles consecuencias sobre la inmunología y pigmentación de la piel. *A priori* la densidad de melanocitos no parece lo suficientemente alta como para determinar cambios en la pigmentación de la piel, aunque esta afirmación es puramente especulativa.

La electroporación es un método físico mínimamente invasivo utilizado para incrementar el paso de vacunas DNA a través de la piel intacta y ha demostrado que induce de forma rápida la respuesta inmune de tipo humoral. Zhao y Cols. (2006) han comprobado que las células de Langerhans responden frente a estímulos físicos de activación con un incremento de la tasa basal, emigrando fuera de la piel a través de los linfáticos como si se hubiese producido una presentación de células T. Estos autores postularon que el uso de pulsos de electroporación a través de la piel intacta se comportarían como si fuesen irritantes químicos induciendo el éxodo de las células de Langherans de la piel en el transcurso de las primeras 24 a 48 horas después de la exposición al campo eléctrico. Consideraron este hecho como una ventaja más para aplicar el método eléctrico cuando se pretende incrementar la migración de las células de Langherans con fines de vacunación. Para algunos autores, este hecho podría explicar el mecanismo por el cual la respuesta inmunitaria es más rápida y efectiva cuando se lleva a cabo por vía transdérmica con apoyo de electroporación que cuando se administra la vacunación por vía intramuscular (Smith y Cols., 2014).

6.3. Consecución de los objetivos y limitaciones del trabajo

Con carácter general, y salvo en lo que se refiere a los estudios de la piel mediante técnicas de inmunohistoquímica, los objetivos propuestos al inicio del estudio se han alcanzado satisfactoriamente. A pesar de ello, y a modo de autocrítica, es necesario exponer cuales son las limitaciones del trabajo. En primer lugar, el número de animales utilizado fue escaso, pero fue el máximo que consintieron las disponibilidades

económicas del momento. También hubiera sido conveniente realizar un estudio farmacocinético más detallado estudiando no solo las concentraciones a los diferentes tiempo del fármaco en la piel, sino también en sangre periférica y las posibles diferencias en función de las técnicas de administración utilizadas. E idealmente realizar el estudio contrario: administrar los fármacos por vía parenteral y determinar sus concentraciones en la piel para compararlas con las obtenidas por la aplicación transcutánea. Para poder desarrollar todos esos aspectos hubieran sido necesarios, al menos, 16 cerdos lo que supondría un importante incremento del presupuesto económico para cubrir los gastos de estabulación, quirófano y manejo de los animales, además de los estudios analíticos y de reactivos de laboratorio. Muchas veces ideas interesantes no pueden desarrollarse plenamente por falta la financiación apropiada.

6.4. Perspectivas de futuro

La finalización del trabajo de una tesis doctoral representa realmente el inicio en el mundo de la investigación científica y necesariamente quedan puntos sin aclarar que pretendemos abordar en los próximos años. El presente estudio abre la puerta a futuras investigaciones sobre la farmacocinética de otras sustancias que administrada por vía transcutánea, eviten su metabolismo rápido por el hígado que las hace ineficaces terapéuticamente.

Y en relación directa con el tema de esta tesis, sería interesante estudiar más periodos de tiempo entre los 60 minutos y los 7 días, para poder establecer en qué momento desaparece prácticamente el medicamento de la piel, ya que el lapso de tiempo obviado en el presente trabajo es excesivamente largo. De forma ideal sería de sumo interés analizar de forma paralela la concentración del fármaco en piel y en sangre.

Además, convendría validar el modelo de la piel de cerdo como la idónea para este tipo de trabajos, y para ello es necesario realizar un análisis detallado de la ultraestructura del órgano, centrado sobre todo en las uniones intercelulares de la epidermis.

Pero el primer trabajo a realizar, y que nos proponemos abordar próximamente, es el de la composición de la matriz extracelular de la dermis y los cambios que se producen en ella al aplicar las diferentes técnicas de permeación. Los efectos locales de las moléculas en la piel están necesariamente ligados a su unión a componentes de la matriz extracelular. Para ello, previamente, será necesario poner a punto la técnica de inmunohistoquímica para los diferentes componentes de la matriz extracelular y seleccionar los anticuerpos adecuados.

Conclusiones

7. Conclusiones.

Tras el análisis de los resultados y la oportuna discusión de los mismos, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. La piel es una vía de absorción de moléculas de diferentes características organolépticas (procaína, ketoprofeno, biotina y cafeína) y su acción local se ejerce principalmente antes de los siete días de su administración. Las concentraciones cutáneas más altas para la biotina y el ketoprofeno, se obtienen mediante administración intradérmica; para la cafeína y la procaína, las cuatro técnicas utilizadas logran concentraciones cutáneas similares.
2. Las concentraciones cutáneas de las moléculas analizadas se mantienen más elevadas en el tiempo (durante los primeros 60 minutos de su administración) con las técnicas microneedling, electroiontoporación y la combinación de ambas, demostrando que con la vía intradérmica no logra las mayores concentraciones tisulares.
3. Ninguna de las técnicas de permeación cutánea utilizadas asociadas a las moléculas producen lesiones estructurales objetivables. Tampoco originan modificaciones en el grosor relativo de dermis y epidermis.
4. Las vías de facilitación de medicamentos estudiadas, *per se*, independientemente de las moléculas que se les asocie, no producen incremento de la cantidad de fibroblastos (demostrables por la expresión de vimentina), lo que sugiere que en ningún caso se estimula el proceso cicatricial.
5. La microperforación es una forma sencilla y mínimamente invasiva de incrementar la absorción de sustancias por vía percutánea y representa un método potencialmente útil para la administración de procaína, biotina,

ketoprofeno y cafeína. Su efectividad se potencia cuando se asocia a electroiontoporación.

6. La combinación de electroiontoporación y microneedling causa concentraciones más elevadas y persistentes en el tiempo de los productos estudiados, consiguiendo mantener cantidades más elevadas que las obtenidas por vía intradérmica.

7. Las técnicas de electroiontoporación y microneedling más electroiontoporación producen cambios en la densidad de melanocitos y células dendríticas, sin que ello suponga, *a priori*, modificaciones a largo plazo ni en la pigmentación ni en el espesor de la dermis.

Anexos

Anexo 1

Tabla A5.1.- Resultados de la HPLC en las muestras de procaína en el animal 58. Los valores de la concentración se expresan en µg/ml.

MUESTRA	ANIMAL	SEXO	ANALITO	Tº	TECNICA	CONC.
70	58	H	PROCAINA	T0	EP	4,3
74	58	H	PROCAINA	T0	MN+EP	2,5
86	58	H	PROCAINA	T0	MN	2,8
88	58	H	PROCAINA	T0	ID	2,2
72	58	H	PROCAINA	T15	EP	4,2
78	58	H	PROCAINA	T15	MN+EP	4,0
90	58	H	PROCAINA	T15	MN	2,3
92	58	H	PROCAINA	T15	ID	4,8
76	58	H	PROCAINA	T30	EP	2,9
80	58	H	PROCAINA	T30	MN+EP	5,4
94	58	H	PROCAINA	T30	MN	2,0
96	58	H	PROCAINA	T30	ID	2,5
82	58	H	PROCAINA	T60	EP	3,6
84	58	H	PROCAINA	T60	MN+EP	4,2
99	58	H	PROCAINA	T60	MN	0,02
101	58	H	PROCAINA	T60	ID	0,05
106	58	H	PROCAINA	D7	EP	0,16
107	58	H	PROCAINA	D7	MN+EP	0,07
108	58	H	PROCAINA	D7	MN	0,09
109	58	H	PROCAINA	D7	ID	0,07
146	58	H	PROCAINA	D14	ID	0,04
147	58	H	PROCAINA	D14	MN	0,06
148	58	H	PROCAINA	D14	EP	0,10
149	58	H	PROCAINA	D14	MN+EP	0,05

Tabla A5.2.- Resultados de la HPLC en las muestras de Ketoprofeno en el animal 69. Los valores de la concentración se expresan en $\mu\text{g/ml}$.

MUESTRA	ANIMAL	SEXO	ANALITO	Tº	TECNICA	CONC.
111	69	H	KETOPROFENO	T0	EP	31,80
115	69	H	KETOPROFENO	T0	MN+EP	12,90
127	69	H	KETOPROFENO	T0	MN	22,00
129	69	H	KETOPROFENO	T0	ID	22,00
113	69	H	KETOPROFENO	T15	EP	23,60
119	69	H	KETOPROFENO	T15	MN+EP	8,40
131	69	H	KETOPROFENO	T15	MN	15,00
133	69	H	KETOPROFENO	T15	ID	95,10
117	69	H	KETOPROFENO	T30	EP	23,90
123	69	H	KETOPROFENO	T30	MN+EP	2,70
135	69	H	KETOPROFENO	T30	MN	11,80
137	69	H	KETOPROFENO	T30	ID	81,00
121	69	H	KETOPROFENO	T60	EP	21,90
125	69	H	KETOPROFENO	T60	MN+EP	3,70
139	69	H	KETOPROFENO	T60	MN	5,50
141	69	H	KETOPROFENO	T60	ID	40,70

Tabla A5.3.- Resultados de la HPLC en las muestras de de biotina en el animal 68. Los valores de la concentración se expresan en µg/ml.

MUESTRA	ANIMAL	SEXO	ANALITO	Tº	TECNICA	CONC.
110	68	M	BIOTINA	T0	EP	19,00
114	68	M	BIOTINA	T0	MN+EP	11,20
126	68	M	BIOTINA	T0	MN	32,60
128	68	M	BIOTINA	T0	ID	149,50
112	68	M	BIOTINA	T15	EP	20,60
118	68	M	BIOTINA	T15	MN+EP	7,70
130	68	M	BIOTINA	T15	MN	38,50
132	68	M	BIOTINA	T15	ID	280,20
116	68	M	BIOTINA	T30	EP	18,40
122	68	M	BIOTINA	T30	MN+EP	8,80
134	68	M	BIOTINA	T30	MN	23,20
136	68	M	BIOTINA	T30	ID	232,80
120	68	M	BIOTINA	T60	EP	18,20
124	68	M	BIOTINA	T60	MN+EP	7,00
138	68	M	BIOTINA	T60	MN	37,70
140	68	M	BIOTINA	T60	ID	30,60
142	68	M	BIOTINA	D7	EP	1,00
143	68	M	BIOTINA	D7	MN+EP	0,50
144	68	M	BIOTINA	D7	MN	0,50
145	68	M	BIOTINA	D7	ID	0,40
154	68	M	BIOTINA	D14	EP	0,60
155	68	M	BIOTINA	D14	MN+EP	0,50
156	68	M	BIOTINA	D14	MN	0,50
157	68	M	BIOTINA	D14	ID	0,40

Tabla A5.4.- Resultados de la HPLC en las muestras de cafeína en el animal 59. Los valores de la concentración se expresan en µg/ml.

MUESTRA	ANIMAL	SEXO	ANALITO	Tº	TECNICA	CONC.
71	59	M	CAFEINA	T0	EP	4,40
75	59	M	CAFEINA	T0	MN+EP	3,99
87	59	M	CAFEINA	T0	MN	8,64
89	59	M	CAFEINA	T0	ID	19,08
73	59	M	CAFEINA	T15	EP	6,32
79	59	M	CAFEINA	T15	MN+EP	3,41
91	59	M	CAFEINA	T15	MN	5,63
93	59	M	CAFEINA	T15	ID	4,10
77	59	M	CAFEINA	T30	EP	6,34
81	59	M	CAFEINA	T30	MN+EP	6,27
95	59	M	CAFEINA	T30	MN	6,85
97	59	M	CAFEINA	T30	ID	3,91
83	59	M	CAFEINA	T60	EP	2,02
85	59	M	CAFEINA	T60	MN+EP	5,93
98	59	M	CAFEINA	T60	MN	0,15
100	59	M	CAFEINA	T60	ID	0,07
105	59	M	CAFEINA	D7	ID	0,02
103	59	M	CAFEINA	D7	EP	0,07
102	59	M	CAFEINA	D7	MN+EP	0,10
104	59	M	CAFEINA	D7	MN	0,11
150	59	M	CAFEINA	D14	MN+EP	0,07
151	59	M	CAFEINA	D14	EP	0,04
152	59	M	CAFEINA	D14	MN	0,04
153	59	M	CAFEINA	D14	ID	0,03

Tabla A5.5.- Estadística descriptiva de los valores de la superficie y el espesor de la dermis y la epidermis en los experimentos con las técnicas MN y MN+EP en los tiempos T0, T60, D7 y D14 en cada uno de los animales elegidos para la medición. **Muestras correspondientes al animal 58**

Animal 58

	<i>Técnica</i>	<i>Tº</i>	<i>Superficie</i>			<i>Espesor</i>			
			Area	Mean	StdDev	Mode	Min	Max	Median
86-4xder	MN	T0	11680168,3	1245,59	416,24	1641,46	36,09	1644,61	1246,31
86-4xepi	MN	T0	901643,16	97,03	30,63	97,52	6,38	195,29	94,85
74-4xder	MN+EP	T0	12508177,2	1527,94	339,82	1829,2	46,01	1832,69	1579,61
74-4xepi	MN+EP	T0	828151,37	103,7	19,81	108,31	9,02	137,73	104,64
99-4xder	MN	T60	11580564,6	1245,73	388,55	1471,15	46,01	1556,72	1421,47
99-4xepi	MN	T60	627845,02	85,11	24,08	83,2	12,76	170,24	79,94
84-4xder	MN+EP	T60	10813530,9	1328,49	444,38	1835,06	51,04	1838,55	1409,16
84-4xepi	MN+EP	T60	682175,22	93,42	18,26	82,88	6,38	128,4	94,2
108-4xder	MN	D7	10726667,7	1141,3	333,18	1403,69	28,53	1406,38	1331,51
108-4xepi	MN	D7	717028,36	93,72	30,6	89,13	12,76	189,69	88,63
107-4xder	MN+EP	D7	11381194,5	949,01	303,33	1314,95	46,01	1317,44	956,4
107-4xepi	MN+EP	D7	856959,91	105,58	38,79	183,93	6,38	196,96	99,66
147-4xder	MN	D14	10946878,5	1095,13	425,33	1521,11	40,35	1524,01	1272,49
147-4xepi	MN	D14	738652,57	89,96	18,19	83,16	9,02	140,36	88,86
149-4xder	MN+EP	D14	11102247,2	1424,8	391,28	1766,6	25,52	1770,01	1586,4
149-4xepi	MN+EP	D14	661884,07	100,75	23,92	101,85	9,02	165,88	99,86

Tabla A5.6.- Estadística descriptiva de los valores de la superficie y el espesor de la dermis y la epidermis en los experimentos con las técnicas MN y MN+EP en los tiempos T0, T60, D7 y D14 en cada uno de los animales elegidos para la medición. **Muestras correspondientes al animal 59**

Animal 59

	<i>Técnica</i>	<i>Tº</i>	<i>Superficie</i>			<i>Espesor</i>			
			Area	Mean	StdDev	Mode	Min	Max	Median
87-4xder	MN	T0	13185457,7	1199	362,41	1502,86	63,8	1505,68	1339,01
87-4xepi	MN	T0	659624,98	94,44	21,14	102,09	14,27	155,23	91,35
75-4xder	MN+EP	T0	9023921,25	1125,48	348,96	1439,19	63,8	1441,88	1306,83
75-4xepi	MN+EP	T0	566106,62	87,27	15,87	82,75	6,38	134,59	86,78
98-4xder	MN	T60	10100511,9	1096,64	366,78	1583,39	46,01	1586,4	1046,4
98-4xepi	MN	T60	623988,28	86,81	23,38	83,17	6,38	147,29	82,19
85-4xder	MN+EP	T60	13657873	932,71	378,02	1380,25	46,01	1382,86	934,62
85-4xepi	MN+EP	T60	740952,37	90,48	20,64	76,66	6,38	159,5	86,78
104-4xder	MN	D7	10588801,9	1056,09	406,75	1418,32	72,18	1420,95	1337,06
104-4xepi	MN	D7	775021,95	90,52	37,7	76,86	9,02	217,01	82,94
102-4xder	MN+EP	D7	9032428,47	1352,21	448,3	1759,81	54,14	1763,14	1598,82
102-4xepi	MN+EP	D7	824457,45	95,76	27,36	95,74	6,38	154,44	95,7
152-4xder	MN	D14	10308633,5	1298,01	473,43	1691,97	36,09	1695,21	1604,77
152-4xepi	MN	D14	775398,47	85	27,68	71,21	6,38	169,88	82,94
150-4xder	MN+EP	D14	10895957,3	1119,62	348,33	1500,76	63,8	1503,57	1135,93
150-4xepi	MN+EP	D14	879937,54	116,54	33,5	115,1	6,38	200,34	108,65

Tabla A5.7.- Estadística descriptiva de los valores de la superficie y el espesor de la dermis y la epidermis en los experimentos con las técnicas MN y MN+EP en los tiempos T0, T60, D7 y D14 en cada uno de los animales elegidos para la medición. **Muestras correspondientes al animal 68**

Animal 68

	<i>Técnica</i>	<i>Tº</i>	<i>Superficie</i>			<i>Espesor</i>			
			Area	Mean	StdDev	Mode	Min	Max	Median
126-4xder	MN	T0	10082398,5	907,36	277,4	1269,05	38,28	1271,46	930,78
126-4xepi	MN	T0	665791,69	98,86	22,3	88,76	9,02	154,31	99,04
114-4xder	MN+EP	T0	10208215,8	1097,92	365,84	1480,56	54,14	1483,35	1170,86
114-4xepi	MN+EP	T0	827347,46	92,83	17,12	91,11	12,76	137,73	91,35
138-4xder	MN	T60	9698718,8	868,51	332,88	1240,68	28,53	1267,29	924,11
138-4xepi	MN	T60	632017,22	80,45	15,67	86,61	12,76	119,87	77,62
124-4xder	MN+EP	T60	9681948,58	1027,32	322,5	1404,28	63,8	1406,9	1057,23
124-4xepi	MN+EP	T60	842296,15	103,87	34,52	173,23	9,02	173,55	92,89
144-4xder	MN	D7	8655505,73	932,54	291,18	1212,61	51,04	1214,88	1034,82
144-4xepi	MN	D7	756481,1	83,63	26,67	77,07	6,38	150,57	76,83
143-4xder	MN+EP	D7	8894847,6	907,91	331,29	1338,68	54,14	1341,2	970,52
143-4xepi	MN+EP	D7	676761,53	97,17	40,97	197,51	6,38	197,88	83,92
156-4xder	MN	D14	8910640,91	1323,34	347,27	1674,35	18,05	1677,59	1374,29
156-4xepi	MN	D14	689797,11	92,16	30,79	70,23	12,76	168,44	88,63
155-4xder	MN+EP	D14	10727481,8	1139,53	332,84	1494,26	63,8	1497,06	1247,94
155-4xepi	MN+EP	D14	946763,99	126,55	33,99	108,22	12,76	205,95	121,22

Bibliografía

8. Bibliografía

Se han seguido los criterios del modelo Chicago B15, relacionando a los autores mencionados en el texto por orden alfabético y año de la publicación de su trabajo.

- Adachi H, Ioppolo F, Paoloni M, Santilli V. «Physical characteristics, pharmacological properties and clinical efficacy of the ketoprofen patch: a new patch formulation.» *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 15, nº 7 (Jul 2011): 823-30.
- Allevato M. «Sistema terapéuticos transdérmicos.» *Act Terap Dermatol*, nº 30 (2007): 154-65.
- Al-Qallaf B, Das DB, Mori D, Cui Z. «Modelling transdermal delivery of high molecular weight drugs from microneedle systems.» *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 365, nº 10.1098/rsta.2007.0003 (2007): 2951-67.
- Amante D, Smith T, Kiosses B, Sardesai N, Humeau L, Broderick K. «Direct transfection of dendritic cells in the epidermis after plasmid delivery enhanced by surface electroporation.» *Hum Gene Ther Methods* 25, nº 6 (Dec 2014): 315-6.
- Anderson GD. Gender differences in pharmacological response. *Int Rev Neurobiol*. 2008; 83:1-10.
- Andrews SN, Jeong E, Prausnitz MR. «Transdermal delivery of molecules is limited by full epidermis, not just stratum corneum.» *Pharm Res* 30, nº 4 (Apr 2013): 1099-109.
- Andrews JP, Marttala J, Macarak E, Rosenbloom J, Uitto J. 2016. Keloids: The paradigm of skin fibrosis - Pathomechanisms and treatment. *Matrix Biol*. 2016. pii: S0945-053X(16)00006-8.
- Aron E. «Étude physio-clinique des injections intradermiques. Action de la solution histamine-histidine.» *La Presse Medicale*, nº 56 (14 Julliet 1937): 1037-39.
- Aust M, Reimers K, Kaplan H, Stahl F, Repenning C, Scheper T, Jahn S, Schwaiger N, Ipaktchi R, Redeker J, Altintas M, Vogt P. «Percutaneous collagen induction-regeneration in place of cicatrization?» *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 64, nº 1 (Jan 2011): 97-107.

- Badran M, Kuntsche J, Fahr A. «Skin penetration enhancement by a microneedle device (Dermaroller) in vitro: dependency on needle size and applied formulation.» *Eur J Pharm Sci* 36 , nº 4-5 (Mar 2009): 511-23.
- Bai Y, Sachdeva V, Kim H, Friden P, Banga A. «Transdermal delivery of proteins using a combination of iontophoresis and microporation.» *Ther Deliv* 5, nº 5 (May 2014): 525-36.
- Bal S, Kruithof A, Liebl H, et al. «In vivo visualization of microneedle conduits in human skin using laser scanning microscopy.» *Laser Phys Lett* 7, nº 3 (Mar 2010): 242-46.
- Ballesteros D. «Mésothérapie énergétique.» *Bulletin de la Société Française de Mésothérapie*, nº 57 (1983): 14-16.
- Banga A, Bose S, Ghosh T. «Iontophoresis and electroporation: comparisons and contrasts.» *Int J Pharm* 179, nº 1 (Mar 1999): 1-19.
- Barry B. «Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery.» *Eur J Pharm Sci* 14, nº 2 (2001): 101-14.
- Bartek M, LaBudde A, Maibach H. «Skin permeability in vivo: comparison in rat, rabbit, pig and man.» *J Invest Dermatol* 58, nº 3 (Mar 1972): 114-23.
- Batheja P, Thakur R, Michniak B. «Transdermal iontophoresis.» *Expert Opin Drug Deliv* 3, nº 1 (2006): 127-38.
- Becker S. «Transport modeling of skin electroporation and the thermal behavior of the stratum corneum.» *Int J Thermal Sci* 54 (2012): 48-61.
- Becker S, Zorec B, Miklavčič D, Pavšelj N. «Transdermal transport pathway creation: Electroporation pulse order.» *Math Biosci*, 2014: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mbs.2014.07.001>.
- Belloch V, Caballé C, Zaragoza R, Zaragoza J. *Manual de terapéutica física y radiología*. 3ª edición. Valencia: Saber, 1972.
- Berardesca E, Maibach H. Ethnic skin: overview of structure and function. *J Am Acad Dermatol*. 2003;48(6 Suppl):S139-142.
- Bicheron M. «Contribution à l'étude des traitements des phénomènes douloureux par la mésothérapie.» *BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MÉSOTHÉRAPIE* 31 (1974): 6-9.
- Bicheron M. «Mésothérapie et microcirculation.» *Tempo Médical*, nº 76 (1981): 103-5.

- Binaglia L, Marconi P, Pitzurra M. «Assorbimento del Na-ketoprofene somministrato per via intradermica.» *Giornale di Mesoterapia* 1, n° 2 (1981a): 85-91.
- Binaglia L, Marconi P, Pitzurra M. «Diffusione della procaina inoculata per via intradermica.» *Giornale di Mesoterapia* 1, n° 1 (1981b): 15-28.
- Bolzinger M, Briançon S, Pelletier J, Chevalier Y. «Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane.» *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, n° 17 (2012): 156-65.
- Bordet R. «Evolution de l'enseignement de la mésothérapie en pratique vétérinaire. .» *III Congreso Internacional de Mesoterapia*, pgs 251-3. Roma, 1982.
- Bos J, Meinardi M. «The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs.» *Exp Dermatol*, n° 9 (2000): 165-9.
- Burton S, Ng CY, Simmers R, Moeckly C, Brandwein D, Gilbert T, Johnson N, Brown K, Alston T, Prochnow G, Siebenaler K, Hansen K. «Rapid intradermal delivery of liquid formulations using a hollow microstructured array.» *Pharm Res* 28, n° 1 (Jan 2011): 31-40.
- Byrn C, Olsson I, Falkheden L. «Subcutaneous sterile water injections for chronic neck and shoulder pain following whiplash injuries. .» *Lancet*, n° 341 (1993): 449-52.
- Charoo N, Rahman Z, Repka M, Murthy S. «Electroporation: an avenue for transdermal drug delivery.» *Curr Drug Deliv* 7, n° 2 (Apr 2010): 125-36.
- Chen Y, Guo J, Tang Y, Wu L, Tao W, Qian Y, Duan JA. Pharmacokinetic profile and metabolite identification of yuanhuapine, a bioactive component in *Daphne genkwa* by ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2015; 112:60-69.
- Chos D. «Injections en mésothérapie: profondeur, quantité et pli cutané.» *Bulletin de la Société Française de Mésothérapie*, n° 85 (1993): 11-4.
- Corbel D. «Étude des cinétiques locales, régionales et générales de la voie I.D. par utilisation des traceurs radioactifs.» *Bulletin de la Société Française de Mésothérapie*, n° 66 (1986): 8-11.
- Corbel D, Corbel D. *Initiation à l'I.D. thérapie (mésothérapie)*. Paris: SIMEP, 1989.
- Corovic S, Markelc B, Dolinar M, Cemazar M, Jarm T. «Modeling of microvascular permeability changes after electroporation.» *PLoS One* 10, n° 3 (Mar 2015).

- Cribier B, Grosshans E. *Histologie de la peau normale et lésions histopathologiques élémentaires*. In: *Encycl Méd Chir (Dermatologie)*. Vols. 98-085 A10. Éditions Techniques (Paris), 2002.
- Dalloz-Bourguignon A. *Vade-mecum de Mésothérapie*. Paris: Maloine, 1987.
- Dao H Jr, Kazin RA. Gender differences in skin: a review of the literature. *Gend Med*. 2007 4:308-328.
- Davis S, Landis B, Adams Z, Allen M, Prausnitz M. «Insertion of microneedles into skin: measurement and prediction of insertion force and needle fracture force.» *J Biomech* 37, nº 8 (Aug 2004): 1155-63.
- Debeer S, Le Luduec J, Kaiserlian D, Laurent Ph, Nicolas J, Dubois B, Kanitakis J. «Comparative histology and immunohistochemistry of porcine versus human skin.» *Eur J Dermatol* 23, nº 4 (Apr 2013): 456-66.
- Denet A, Vanbever R, Préat V. «Skin electroporation for transdermal and topical delivery.» *Adv Drug Deliv Rev* 56, nº 5 (Mar 2004): 659-74.
- Dirk H Spennemann. *A Baunscheit Homeopatic Medicine Kit in the Jindera Pioneer Museum. Studies in German Colonial Heritage nº 4*. ISSN 1834-7797, 2007, página 88.
- Domingo M. *Electroestética*. 2ª edición. Barcelona: Sorisa, 1991.
- Donnelly R, Raj Singh T, Woolfson A. «Microneedle-based drug delivery systems: microfabrication, drug delivery, and safety.» *Drug Deliv* 17, nº 4 (May 2010): 187-207.
- Dujardin N, Staes E, Kalia Y, Clarys P, Guy R, Préat V. «In vivo assessment of skin electroporation using square wave pulses.» *J Control Release* 79, nº 1-3 (Feb 2002): 219-27.
- Escobar-Chávez J, Bonilla-Martínez D, Villegas-González M, Molina-Trinidad E, Casas-Alancaster N, Revilla-Vázquez A. «Microneedles: a valuable physical enhancer to increase transdermal drug delivery.» *J Clin Pharmacol* 51, nº 7 (Jul 2011): 964-77.
- Escobar-Chávez J, Bonilla-Martínez D, Villegas-González M, Revilla-Vázquez A. «Electroporation as an efficient physical enhancer for skin drug delivery.» *J Clin Pharmacol* 49, nº 11 (Nov 2009): 1262-83.

- Ferry LL, Argentieri G, Lochner DHG. «The comparative histology of porcine and guinea pig skin with respect to iontophoretic drug delivery». *Pharm Acta Helv*, n°70 (1995): 43-56
- Förster M, Bolzinger M, Fessi H, Briançon S. «Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery.» *Eur j Dermatol* 19, n° 4 (2009): 309-23.
- George F. «Les profondeurs d'injection en mésothérapie.» *J Med Esth et Chir Derm* 31, n° 161 (2014): 17-18.
- Godin B, Touitou E. «Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models.» *Adv Drug Deliv Rev* 59, n° 11 (Sep 2007): 1152-61.
- Grafe F, Wohlrab W, Neubert R, Brandsch M. «Transport of biotin in human keratinocytes.» *J Invest Dermatol* 120, n° 3 (Mar 2003): 428-33.
- Gujjar M, Banga A. «Iontophoretic and Microneedle Mediated Transdermal Delivery.» *Pharmaceutics*, n° 6 (2014): 663-71.
- Gupta J, Felner E, Prausnitz M. «Rapid pharmacokinetics of intradermal insulin administered using microneedles in type 1 diabetes subjects.» *Diabetes Technol Ther* 13, n° 4 (Apr 2011): 451-6.
- Harvey A, Kaestner S, Sutter D, Harvey N, Mikszta J, Pettis R. «Microneedle-based intradermal delivery enables rapid lymphatic uptake and distribution of protein drugs.» *Pharm Res* 28, n° 1 (2011): 107-16.
- Hekimian M. «Des injections hypodermiques d'eau pure.» *Tesis Facultad de Medicina de Paris*. 1872.
- Henry S, McAllister D, Allen M, Prausnitz M. «Microfabricated microneedles: a novel approach to transdermal drug delivery.» *J Pharm Sci* 87, n° 8 (Aug 1998): 922-5.
- Heyneman C, Lawless-Liday C, Wall G. «Oral versus topical NSAIDs in rheumatic diseases: a comparison.» *Drugs* 60, n° 3 (Sep 2000): 555-74.
- Hildebrand T, Rügsegger P. «A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images.» *Journal of Microscopy*, n° 185 (January 1997): 67-75.
- Hong X, Wei L, Wu F, Wu Z, Chen L, Liu Z, Yuan W. «Dissolving and biodegradable microneedle technologies for transdermal sustained delivery of drug and vaccine.» *Drug Des Devel Ther*, n° 7 (Sep 2013): 945-52.

- Horie M, Sekiya I, Nakamura T, Tanaka H, Maekawa K, Nakanishi M, Muneta T, Kobayashi E. «In vivo pharmacokinetics of ketoprofen after patch application in the Mexican hairless pig.» *Biopharm Drug Dispos* 30, n° 4 (May 2009): 204-8.
- Ishida-Yamamoto A, Igawa S. The biology and regulation of corneodesmosomes. *Cell Tissue Res.* 2015 360:477-482.
- Ita K. «Transdermal Delivery of Drugs with Microneedles-Potential and Challenges.» *Pharmaceutics* 7, n° 3 (Jun 2015): 90-105.
- Jameson J, Havran W. «Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing.» *Immunol Rev*, n° 215 (Feb 2007): 114-22.
- Jung E, Maibach H. «Animal models for percutaneous absorption.» *J Appl Toxicol*, n° 35 (2015): 1-10.
- Kalia YN, Naik A, Garrison J, Guy RH. «Iontophoretic drug delivery.» *Adv Drug Deliv Rev* 56, n° 5 (Mar 2004): 619-58.
- Kalluri H, Banga A. «Formation and closure of microchannels in skin following microporation.» *Pharm Res* 28, n° 1 (Jan 2011): 82-94.
- Kanikkannan N. «Iontophoresis-based transdermal delivery systems.» *BioDrugs* 16, n° 5 (2002): 339-47.
- Kanitakis J. «Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin.» *Eur J Dermatol* 12, n° 4 (July-August 2002): 390-401.
- Kanitakis J. «Immunohistochemistry of normal human skin.» En *Diagnostic Immunohistochemistry of the Skin. An illustrated text*, de Vassileva S, Woodley D Kanitakis J, 38-51. London: Chapman & Hall Med, 1998.
- Kaplan A. «Des lymphatiques cutanées, de l'immunité local et de quelques autres questions.» *Bulletin de la Société Française de Mésothérapie*, n° 73 (1989): 4-7.
- Kaplan A. «Des techniques et des doses.» *Bulletin de la Société Française de Mésothérapie*, n° 79 (1991): 8-9.
- Kaplan A, Coutris G. «Injection intra-dermique superficielle: utilisation en médecine nucléaire.» *Journal de Médecine Nucléaire et de Biophysique* XIII, n° 4 (1989): 229-33.
- Kaplan A, Coutris G, Jacquinet B, Wioland M. «Mésoscintigraphie: contribution de la technique méso à la scintigraphie diagnostique. Implications

- pharmacocinétiques.» Editado por Sociedad Francesa de Mesoterapia. *Libro de resúmenes del V Congreso Internacional de Mesoterapia*. Paris, 1988.
- Kaplan, A. «Mésoscintigraphie et proposition d'une theorie unifiée de la Mésothérapie.» Editado por Sociedad Francesa de Mesoterapia. *libro de resúmenes del VI Congreso Internacional de Mesoterapia*. Bruxelles 9-11 de octubre, 1992. 42-49.
- Kaushik S, Hord A, Denson D, McAllister D, Smitra S, Allen M, Prausnitz M. «Lack of pain associated with microfabricated microneedles.» *Anesth Analg* 92, nº 2 (Feb 2001): 502-4.
- Kloth L. «Electrical stimulation for wound healing: a review of evidence from in vitro studies, animal experiments, and clinical trials.» *Int J Low Extrem Wounds* 4, nº 1 (Mar 2005): 23-44.
- Kolli C, Xiao J, Parsons D, Babu R. «Microneedle assisted iontophoretic transdermal delivery of prochlorperazine edisylate.» *Drug Development and Industrial Pharmacy* 38, nº 5 (2012): 571-6.
- Kulkarni V, Rosati M, Bear J «Comparison of intradermal and intramuscular delivery followed by in vivo electroporation of SIV Env DNA in macaques.» *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, nº 10 (9 2013): 2081-94.
- Langer R. «Transdermal drug delivery: past progress, current status, and future prospects.» *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (2004): 557-8.
- Lavignolle B, de Seze M, de Boysson A, Lavignolle V, Fourquet M, Jeanmarie Y, Roch F. «La mésothérapie dans le traitement des douleurs projetées de la pathologie dégénérative du rachis.» *La Revue de Mésothérapie*, nº 117 (2003): 9-15.
- Lee N, Mårtensson L, Homer C, Webster J, Gibbons K, Stapleton H, Dos Santos N, Beckmann M, Gao Y, Kildea S. «Impact on caesarean section rates following injections of sterile water (ICARIS): a multicentre randomised controlled trial.» *BMC Pregnancy Childbirth* 3 (2013): 13:105. doi: 10.1186/1471-2393-13-105.
- Li G, Badkar A, Kalluri H, Banga A. «Microchannels created by sugar and metal microneedles: characterization by microscopy, macromolecular flux and other techniques.» *J Pharm Sci* 99, nº 4 (Apr 2010): 1931-41.
- Liebl H, Kloth L. «Skin cell proliferation stimulated by microneedles.» *J Am Coll Clin Wound Spec* 4, nº 1 (Mar 2012): 2-6.

- Liu S, Jin M, Quan YS, Kamiyama F, Kusamori K, Katsumi H, Sakane T, Yamamoto A. «Transdermal delivery of relatively high molecular weight drugs using novel self-dissolving microneedle arrays fabricated from hyaluronic acid and their characteristics and safety after application to the skin.» *Eur J Pharm Biopharm* 86, n° 2 (Feb 2014): 267-76.
- Liu Y, Zeng BH, Shang HT, Cen YY, Wei H. «Bama miniature pigs (*Sus scrofa domestica*) as a model for drug evaluation for humans: comparison of in vitro metabolism and in vivo pharmacokinetics of lovastatin». *Comp Med* 58 (2008):580-587
- Liu Y, Chen JY, Shang HT, Liu CE, Wang Y, Niu R, Wu J, Wei H. «Light microscopic, electron microscopic, and immunohistochemical comparison of Bama minipig (*Sus scrofa domestica*) and human skin». *Comp Med* 6 (2010):142-148.
- Luo L, Lane M. «Topical and transdermal delivery of caffeine.» *Int J Pharm* 490, n° 1-2 (Jul 2015): 155-64.
- Lv Y-G, Liu J, Gao Y-H, Xu B. «Modleing of transdermal drug delivery with a microneedle array.» *J Micromech Microeng*, n° 16 (2006): 2492-501.
- MacLeod A, Havran W. «Functions of skin-resident $\gamma\delta$ T cells.» *Cell Mol Life Sci* 68, n° 14 (Jul 2011): 2399-408.
- Mammcurari M, Gatti A, Maggiori S, Bartoletti CA, Sabato A. «Mesotherapy, definition, rationale and clinical role: a consensus report from the Italian Society of Mesotherapy.» *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, n° 15 (2011): 682-94.
- Manet. «Résumé d'un an de Mésothérapie en pratique quotidienne vétérinaire.» *Bulletin de la Société Française de Mésothérapie*, n° 6 (1965): 6-8.
- Marquet F, Vu Manh TP, Maisonnasse P, Elhmouzi-Younes J, Urien C, Bouguyon E, Jouneau L, Bourge M, Simon G, Ezquerra A, Lecardonnel J, Bonneau M7 Dalod M, Schwartz-Cornil I, Bertho N. Pig skin includes dendritic cell subsets transcriptomically related to human CD1a and CD14 dendritic cells presenting different migrating behaviors and T cell activation capacities. *J Immunol*. 2014; 193:5883-5893.
- Marra F, Levy JL, Santi P, Kalia Y. «In vitro evaluation of the effect of electrotreatment on skin permeability.» *J Cosmet Dermatol* 7, n° 2 (2008): 105-11.
- Mazières B. «Topical ketoprofen patch.» *Drugs R D* 6, n° 6 (2005): 337-44.

- McCrudden M, Alkilani A, McCrudden C, McAlister E, McCarthy H, Woolfson A, Donnelly R. «Design and physicochemical characterisation of novel dissolving polymeric microneedle arrays for transdermal delivery of high dose, low molecular weight drugs.» *J Control Release*, n° 180 (Apr 2014): 71-80.
- McVey E, Hirsch L, Sutter D, Kapitza C, Dellweg S, Clair J, Rebrin K, Judge K, Pettis R. «Pharmacokinetics and postprandial glycemic excursions following insulin lispro delivered by intradermal microneedle or subcutaneous infusion.» *J Diabetes Sci Technol* 6, n° 4 (Jul 2012): 743-54.
- Meyer W, Scharz R, Neurand K. «The skin of domestic mammals as a model for the human skin with special reference to the domestic pig». *Curr Probl Dermatol* 7 (1978):39-52
- Milewski M, Manser K, Nissley B, Mitra A. «Analysis of the absorption kinetics of macromolecules following intradermal and subcutaneous administration.» *Eur J Pharm Biopharm*, n° 89 (2015): 134-44.
- Mir L. «Electroporation-based gene therapy: recent evolution in the mechanism description and technology developments.» *Methods Mol Biol*, n° 1121 (2014): 3-23.
- Mir L, Orłowski S. «Mechanisms of electrochemotherapy.» *Adv Drug Deliv Rev* 35, n° 1 (Jan 1999): 107-18.
- Morita K, Miyachi Y. Tight junctions in the skin. *J Dermatol Sci*. 2003 31: 81-89.
- Morita K, Miyachi Y, Furuse M. Tight junctions in epidermis: from barrier to keratinization. *Eur J Dermatol*. 2011 21:12-17.
- Morton D, Jennings M, Buckwell A, Ewbank R, Godfrey C, Holgate B, Inglis I, James R, Page C, Sharman I, Verschoyle R, Westall L, Wilson A; Joint Working Group on Refinement. «Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. British Veterinary Association Animal Welfare Foundation.» *Lab Anim* 35, n° 1 (Jan 2001): 1-41.
- Mrejen D. *La mésothérapie ponctuelle systématisée*. Paris: Ed. Médifusion, 1987.
- Multedo J. *Mésothérapie, la troisième circulation*. Paris: Le Hameau-nouvelles therapies, 1985.

- Murthy S, Sen A, Zhao Y, Hui S. «pH influences the postpulse permeability state of skin after electroporation.» *J Control Release* 93, nº 1 (Nov 2003): 49-57.
- Naik A, Kalia Y, Guy R. «Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function.» *Pharm Sci Technolo Today* 3, nº 9 (Sep 2000): 318-26.
- Norman J, Brown M, Raviele N, Prausnitz M, Felner E. «Faster pharmacokinetics and increased patient acceptance of intradermal insulin delivery using a single hollow microneedle in children and adolescents with type 1 diabetes.» *Pediatr Diabetes* 14, nº 6 (2013): 459-65.
- Okuno M, Takahashi Y, Isowa K, Machida Y. «Effect of iontophoresis and switching iontophoresis on skin accumulation of ketoprofen.» *Biol Pharm Bull* 31, nº 3 (Mar 2008): 487-92.
- Ordiz I. «Mathématiques et Mésothérapie.» *Bulletin de la Société Française de Mésothérapie*, nº 96 (1996): 2-4.
- Parienti I. *Mésothérapie*. Paris: Masson, 1987.
- Park JY, Awji EG, Suh JW, Park SC. Pharmacokinetics, pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship, and withdrawal period of amoxicillin sodium in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Xenobiotica*. 2016; 46:522-529.
- Patel VI, Metcalf JP. Identification and characterization of human dendritic cell subsets in the steady state: a review of our current knowledge. *J Investig Med*. 2016; 64: 833-847.
- Petchsangsaï M, Rojanarata T, Opanasopit P, Ngawhirunpat T. «The combination of microneedles with electroporation and sonophoresis to enhance hydrophilic macromolecule skin penetration.» *Biol Pharm Bull* 37, nº 8 (Aug 2014): 1373-82.
- Pistor M. «Exposé sommaire des propriétés nouvelles de la procaine local en pathologie humaine.» *La Presse Medicale* 44 (1958): 999-1000.
- Pitzurra M, Cavallo R, Farinelli S, Sposini T, Cipressa T, Scaringi L. «Sull'inoculazione di antibiotici per via intradermica: alcuni dati sperimentali.» *Giornale di Mesoterapia* 2, nº 1 (1982): 9-14.
- Pons Gimier L, Parra Juez J. *Ciencia cosmética. Bases fisiológicas y criterios prácticos*. Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 1995.

- Pouillot A, Dayan N, Polla A, Polla L, Polla S. «The stratum corneum: a double paradox.» *J Cosmet Dermatol* 7, nº 2 (Jun 2008): 143-8.
- Prausnitz M, Mirtagotri S, Langer R. «Current estatus and future potential of transdermal drug delivery.» *Nat Rev Drug Discov*, nº 3 (2004): 115-24.
- Prausnitz M. «Microneedles for transdermal drug delivery.» *Advanced Drug Delivery Reviews*, nº 56 (2004): 581-7.
- Prausnitz M, Langer R. «Transdermal drug delivery.» *Nat Biotechnol* 26, nº 11 (Nov 2008): 1261-8.
- Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. s.f.
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ketoprofen#section=Top> (último acceso: 26 de 8 de 2015).
- Qvist MH, Hoeck U, Kreilgaard B, Madsen F, Frokjaer S. «Evaluation of Gottingen minipig skin for transdermal in vitro permeation studies». *Eur J Pharm Sci* 11, (2000):59-68
- Rubin M. *Mésothérapie et Mésopuncture*. Paris: Presses Universitaires de France, 1988.
- Saito T, Toriwaki J. «New algorithms for euclidean distance transformation of an n-dimensional digitized picture with applications.» *Pattern Recognition* 27, nº 11 (1994): 1551-65.
- Saxena K, Nischal H, Batra S. «Intracutaneous injections of sterile water over the sacrum for labour analgesia.» *Indian J Anaesth* 52, nº 2 (2009): 169-73.
- Schoellhammer C, Blankschtein D, Langer R. «Skin permeabilization for transdermal drug delivery: recent advances and future prospects.» *Expert Opin Drug Deliv* 11, nº 3 (Mar 2014): 393-407.
- Sharma A, Kara M, Smith F, Krishnan T. «Transdermal drug delivery using electroporation. I. Factors influencing in vitro delivery of terazosin hydrochloride in hairless rats.» *J Pharm Sci* 89, nº 4 (Apr 2000a): 528-35.
- Sharma A, Kara M, Smith F, Krishnan T. «Transdermal drug delivery using electroporation. II. Factors influencing skin reversibility in electroporative delivery of terazosin hydrochloride in hairless rats.» *J Pharm Sci* 89, nº 4 (Apr 2000b): 536-44.

- Shinkai N, Korenaga K, Mizu H, Yamauchi H. «Intra-articular penetration of ketoprofen and analgesic effects after topical patch application in rats.» *J Control Release* 131, n° 2 (Oct 2008): 107-12.
- Shipton E. «New delivery systems for local anaesthetic.» *Anesthesiology Research and Practice*, 2012.
- Smith T, Schultheis K, Kiosses W, Amante D, Mendoza J, Stone J, McCoy J, Sardesai N, Broderick K. «DNA vaccination strategy targets epidermal dendritic cells, initiating their migration and induction of a host immune response.» *Mol Ther Methods Clin Dev* 1:14054. doi: 10.1038/mtm.2014.54. eCollection 2014 (Dec 2014).
- So J, Park H, Lee S, Kim D, Shin S, Cho C. «Effect of microneedle on the pharmacokinetics of ketoprofen from its transdermal formulations.» *Drug Deliv* 16, n° 1 (Jan 2009): 52-6.
- Stahl J, Wohler M, Kietzmann M. «Microneedle pretreatment enhances the percutaneous permeation of hydrophilic compounds with high melting points.» *BMC Pharmacol Toxicol*, Aug 13 2012: 13:5.
- Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P. «The pig as a model for human wound healing». *Wound Repair Regen* 9 (2001):66-76.
- Summerfield A, Meurens F, Ricklin M. «The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin.» *Mol Immunol* 66, n°1 (2014): 14-21.
- Summerfield A, McCullough K. «The porcine dendritic cell family.» *Dev Comp Immunol* 33, n° 3 (Mar 2009): 299-309.
- Takeshi M, Ebihara T, Maekawa K, Yamamoto K, Higo N. «Elimination of ketoprofen from the stratum corneum after topical administration with ketoprofen formulations in human subjects.» *Int J Pharm* 465, n° 1-2 (Apr 25 2014): 197-201.
- Tammisto T, Tammisto C. «Injection of morphine loco dolenti recommended as early as 1876.» *Acta Anaesthesiol Scand* 44, n° 5 (2000): 520-3.
- Tashiro Y, Kato Y, Kayakawa E, Ito K. «Iontophoretic transdermal delivery of ketoprofen: novel method for the evaluation of plasma drug concentration in cutaneous vein.» *Biol Pharm Bull* 23, n° 5 (2000): 632-6.

- Tashiro Y, Shichibe S, Kato Y, Hajakawa E, Itoh K. «Effect of lipophilicity on in vivo iontophoretic delivery. I. NSAIDs.» *Biol Pharm Bull* 24, nº 3 (2001): 278-83.
- Thong H, Zhai H, Maibach H. «Percutaneous penetration enhancers: an overview.» *Skin Pharmacol Physiol*, nº 20 (2007): 272-82.
- Tuan-Mahmood T, McCrudden M, Torrisi B, McAlister E, Garland MJ, Singh T, Donnelly R. «Microneedles for intradermal and transdermal drug delivery.» *Eur J Pharm Sci* 50, nº 5 (Dec 2013): 623-37.
- Turner P, Brabb T, Pekow C, Vasbinder M. «Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider.» *J Am Assoc Lab Anim Sci* 50, nº 5 (Sep 2011): 600-13.
- Turner P, Pekow C, Vasbinder M, Brabb T. «Administration of substances to laboratory animals: equipment considerations, vehicle selection, and solute preparation.» *J Am Assoc Lab Anim Sci* 50, nº 5 (Sep 2011): 614-27.
- Various authors. *Pratique anti-rhumatismale*. Paris: Laboratoires Midy, ca.1939.
- Vučen S, Vuleta G, Crean A, Moore A, Ignjatović N, Uskoković D. «Improved percutaneous delivery of ketoprofen using combined application of nanocarriers and silicon microneedles.» *J Pharm Pharmacol* 65, nº 10 (Oct 2013): 1451-62.
- Watt FM. Mammalian skin cell biology: at the interface between laboratory and clinic. *Science* 2014 346:937-940.
- Weinstein GD. «Autoradiographic studies of turnover time and protein synthesis in pig epidermis.» *J Invest Dermatol* nº 44 (1965):413-419
- Wesley NO, Maibach HI. Racial (ethnic) differences in skin properties: the objective data. *Am J Clin Dermatol*. 2003;4: 843-860.
- Wonglertnirant N, Todo H, Opanasopit P, Ngawhirunpat T, Sugibayashi K. «Macromolecular delivery into skin using a hollow microneedle.» *Biol Pharm Bull* 33, nº 12 (2010): 1988-93.
- Wreje U, Bronsson B. « A multicenter randomized controlled trial of injections of sterile wáter and saline for chronic myofascial pain síndromes. .» *Pain*, nº 61 (1995): 441-4.

- Wu X, Todo H, Sugibayashi K. «Effects of pretreatment of needle puncture and sandpaper abrasion on the in vitro skin permeation of fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran.» *Int J Pharm* 316, n° 1-2 (Jun 2006): 102-8.
- Wu X, Todo H, Sugibayashi K. «Enhancement of skin permeation of high molecular compounds by a combination of microneedle pretreatment and iontophoresis.» *J Control Release* 118, n° 2 (Apr 2007): 189-95.
- Xue P, Tu C, Wang K, Wang X, Fang Y. «Intracutaneous sterile water injections versus oral paracetamol for renal colic during pregnancy: a randomized controlled trial.» *Int Urol Nephrol* 45, n° 2 (2013): 321-5.
- Yamaguchi Y, Yoshikawa K. «Cutaneous wound healing: an update.» *J Dermatol* 28, n° 10 (Oct 2001): 521-34.
- Yan K, Todo H, Sugibayashi K. «Transdermal drug delivery by in-skin electroporation using a microneedle array.» *Int J Pharm* 397, n° 1-2 (Sep 2010): 77-83 .
- Yuki T, Haratake A, Koishikawa H, Morita K, Miyachi Y, Inoue S. Tight junction proteins in keratinocytes: localization and contribution to barrier function. *Exp Dermatol*. 2007 16:324-330.
- Zeitter S, Sikora Z, Jahn S, Stahl F, Strauß S, Lazaridis A, Reimers K, Vogt PM, Aust MC. «Microneedling: matching the results of medical needling and repetitive treatments to maximize potential for skin regeneration.» *Burns* 40, n° 5 (Aug 2014): 966-73.
- Zhao YL, Murthy SN, Manjili MH, Guan LJ, Sen A, Hui SW. «Induction of cytotoxic T-lymphocytes by electroporation-enhanced needle-free skin immunization.» *Vaccine* 24, n° 9 (Feb 2006): 1282-90.
- Zorec B, Becker S, Reberšek M, Miklavčič D, Pavšelj N. «Skin electroporation for transdermal drug delivery: the influence of the order of different square wave electric pulses.» *Int J Pharm* 457, n° 1 (Nov 2013): 214-23.

Resumen de Currilucum Vitae

9 . Resumen de Currilucum Vitae

Formación y Estudios realizados

1. Licenciado de Medicina y Cirugía por la Universidad de Oviedo en julio de 1982
2. Especialista en Medicina del Deporte y de la Salud. Agosto 2013.
3. Especialista Universitario en Homeopatía. Universidad de Valladolid, 1998.
4. Diplomatura Interuniversitaria de Mesoterapia. Universidad Victor Segalen (Bordeaux 2), 2002-2003.
5. Diplomado en Auriculomedicina, Lyon, junio de 1986.
6. Magister en Medicina Estética, Sociedad Española de Medicina Estética y Unión Europea de Medicina Estética. Barcelona, julio de 1991.
7. Curso de Formación para la Enseñanza de la Homotoxicología. Sociedad Internacional de Homotoxicología. Baden-Baden, Abril de 1999.
8. Terapéutica Antihomotóxica: Fundamentos y práctica. (120 horas). Cali (Colombia), 9 a 27 de Julio 2001.
9. Curso de Terapias Biológicas y Ayudas Ergogénicas en Medicina Deportiva. Oviedo, mayo 1999.
10. Acreditación como Médico General en el Sistema Nacional y Comunitario de Salud octubre 1994.
11. Certificado acreditativo de capacitación en Homeopatía. Ilustre Colegio Oficial de Médicos de Asturias. Noviembre 2006.
12. Certificado acreditativo de capacitación de Acupuntura. Ilustre Colegio Oficial de Médicos de Asturias. Noviembre 2006.
13. Instructor en Soporte Vital Básico y Desfibrilación Semiautomática. Enero 2015.

Experiencia Profesional

1. Consulta privada ininterrumpida desde 1984 hasta la actualidad con orientación en Medicina Estética.
2. Secretario de Redacción del Boletín de la Sociedad Española de Mesoterapia (1995-1996).
3. Miembro del Comité de Redacción de la Revista Española de Medicina Estética.
4. Coordinador Científico de la Revista Mesoestética hasta octubre de 2005.
5. Director médico de Body_esthetic Laboratories desde abril de 2003 hasta octubre de 2005.
6. Asesor Técnico en formación médica de Laboratorios Biótica, desde enero de 2006 a diciembre de 2008.
7. Socio fundador y Director médico de Cosméticos Asturianos XXI, S.L. desde septiembre de 2005.
8. Formador médico de Mesoestetic laboratorios.

Premios y Reconocimientos

1. Colaborador Honorario del Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Oviedo.
2. Premio Internacional H. H. Reckeveg 2001 (Baden-Baden, Alemania).
3. Miembro Honorífico de la Asociación para la Promoción del Linfodrenaje Manual Vodder.
4. Premio a la mejor comunicación libre. XXX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Estética. Málaga, 19-21 de febrero de 2015.

Actividad Docente

1. Avances en Mesoterapia Facial y Corporal. Curso Precongresual del I Congreso Interactivo de Medicina Estética. 24 de Septiembre de 2009. Cartagena de Indias. Colombia.
2. Curso de Primer Nivel Internacional de Mesoterapia General y Medicina Estética. Asociación Mesoterapeutica Costarricense. San José de Costa Rica, 10 y 11 de Noviembre de 2007.
3. Curso de Mesoterapia en Aplicaciones Estéticas. Curso Postcongreso 2º ELDEI. 3 de Septiembre de 2007. Buenos Aires.
4. IV Seminario de Mesoterapia Estética Homeopática. Fisiobel. 23 de octubre de 2006. Lisboa.
5. Seminario de Mesoterapia Homeopática y terapias complementarias en Envejecimiento y Celulitis. Colegio Oficial de Médicos de Médicos de Bilbao. 20 de octubre de 2006.
6. Seminario de Mesoterapia Homeopática y terapias complementarias en Envejecimiento y Celulitis. Colegio Oficial de Médicos de Médicos de Las Palmas. Gran Canaria, 6 de octubre de 2006.
7. Seminario de Mesoterapia Homeopática y terapias complementarias en Envejecimiento y Celulitis. Colegio Oficial de Médicos de Guipuzcoa. San Sebastián, 26 de mayo de 2006.
8. III Seminario de Mesoterapia Estética Homeopática. Fisiobel. 13 de febrero de 2006. Lisboa.
9. II Seminario de Mesoterapia Estética Homeopática. Fisiobel. 17 de octubre de 2005. Lisboa.
10. Seminario de Mesoterapia Estética Homeopática. Fisiobel. 18 de Abril de 2005. Lisboa.
11. Curso de especialización en Mesoterapia. Hotel Radisson Empresarial. 8-9 de Abril de 2005. Santiago de Chile.
12. Curso de iniciación a la Mesoterapia. Hotel Radisson Empresarial. 6-7 de Abril de 2005. Santiago de Chile.
13. Curso de Mesoterapia aplicada. C+C. Madrid 20-21 de noviembre de 2004.
14. Curso Avanzado de Mesoterapia postcongreso Russian Anti-age Conference. Moscú, 18-19 de octubre 2004.

15. Mesotherapy and Pharmacology. Curso de Mesoterapia. Barcelona 27 a 29 de Septiembre de 2004.
16. Seminario de Mesoterapia. Papel da Mesoterapia no tratamento da celulite, gorduras localizadas e envelhecimento cutâneo. Fisiobel. Lisboa 28 de Junio de 2004.
17. Curso de Mesoterapia aplicada. C+C. Madrid 15-16 de mayo de 2004.
18. Introducción a la mesoterapia en medicina estética: envejecimiento, alopecias, celulitis, Colegio de Médicos de Varsovia (Polonia). 2 de abril de 2004.
19. Curso de Mesoterapia aplicada. C+C. Madrid 31 de enero-1 de febrero de 2004.
20. Mesoterapia en celulitis y envejecimiento facial. San Juan de Puerto Rico, 6 de diciembre de 2003.
21. Mesoterapia homeopática en Medicina Estética. México D.F. y Guadalajara. 3 y 4 de diciembre de 2003.
22. Curso de Biomesoterapia. San Juan de Puerto Rico, 16-17 de Agosto de 2003.
23. Curso de Biomesoterapia. Lisboa y Oporto. Octubre y Noviembre de 2002, Marzo y Mayo de 2003.
24. Curso de Mesoterapia General. México DF. 8-15 de marzo de 2002.
25. Curso de Biomesoterapia aplicada en Reumatología y Medicina Deportiva. Bilbao octubre 2001.
26. Seminario de Biomesoterapia. Madrid, 26 de Mayo de 2001.
27. Taller práctico de Mesoterapia. León, 5 de Mayo de 2001.
28. Taller práctico de Mesoterapia. Oviedo, 28 de Abril de 2001.
29. Seminario de Biomesoterapia. Barcelona, 10 de Marzo de 2001.
30. Seminario "Homotoxicología en Reumatología y Medicina Deportiva". San Sebastian, 19 de Enero de 2001.
31. Seminario "Homotoxicología y Medicina Estética". Oviedo, 18 de Enero de 2001.
32. Seminario de Mesoterapia. Madrid, 16 de Junio de 2000.
33. Curso "Tejido adiposo en Medicina y cirugía cosmética". Barcelona 7-9 Abril de 2000.
34. Seminario "Iniciación a la Homotoxicología". Palma de Mallorca 11 de Marzo de 2000.
35. Seminario "Medicina Biológica y Reumatología". X Curso General de Homeopatía y Homotoxicología. Nivel II. Madrid, 26 y 27 de Febrero 2000.
36. Seminario "Medicina Biológica y Reumatología". X Curso General de Homeopatía y Homotoxicología. Nivel II. Barcelona, 18 y 19 de Febrero 2000.
37. Visión Integral de la Mesoterapia aplicada en Medicina Estética. La Coruña, 4 y 5 de Febrero 2000.
38. Seminario "Mesoterapia de la piel y anejos en Medicina y Cirugía Cosmética". Academia Nacional de Medicina y Cirugía Cosmética. 21 a 23 de Enero de 2000.
39. Seminario de Mesoterapia Aplicada. C+C Servicios Médicos. Madrid 16-17 de octubre de 1999.
40. Mesoterapia como unidad terapéutica en tratamiento de patologías médico-estéticas. Bogotá, 5-6 de Julio de 1999.

41. Seminario de Mesoterapia Aplicada. C+C Servicios Médicos. Madrid 15-16 de mayo de 1999.
42. I Curso teórico-práctico para postgraduados. Departamento de Formación Clínica Fisiovar. Lisboa, enero, febrero y marzo de 1999.
43. Etiopatogenia de la celulitis. Seminario de la A.P.LMV. Montanejos, 11 de octubre de 1998.
44. Mesoterapia en Medicina Estética. Santafé de Bogotá 16 de Junio de 1998.
45. Dirección de las Iª Jornadas Internacionales de Terapias Biológicas Inyectables. Oviedo, Mayo de 1998.
46. IV Curso teórico-práctico de Iniciación a la Dermofarmacia del ICO de Farmacéuticos del Pº de Asturias. Oviedo, 18 a 20 de junio de 1997.
47. Curso de Mesoterapia. Madrid, 23-24 de Marzo de 1996.
48. Curso de Mesoterapia. Madrid, 4-5 de Marzo de 1995.
49. Curso de Medicina Estética. Madrid-Valencia 1994-1995.
50. Curso de Mesoterapia. Madrid 8-9 de octubre de 1994.
51. Seminario de Mesoterapia. Madrid 27-28 de Marzo de 1994.
52. Seminario de Celulitis. Madrid 6-7 de febrero de 1994.
53. Seminario de Envejecimiento cutáneo y arrugas. Madrid 30-31 de enero de 1994.
54. Curso de Medicina Estética. Madrid 1992-1993.
55. Seminario de Mesoterapia. Madrid 7-8 de Noviembre de 1992.
56. Seminario de obesidad y celulitis. San Sebastian 30 de abril, 1 a 3 de mayo de 1992.
57. Seminario de obesidad y celulitis. Valencia 28-29 de marzo y 11-12 de abril de 1992.
58. Curso de actualización en técnicas de diagnóstico y tratamiento. Medicina Estética. Zaragoza, marzo a junio de 1992.
59. Seminario de Mesoterapia. Madrid, 29 de febrero y 1 de marzo de 1992.
60. Seminario "Dietética y Cocina". Alianza Francesa de Oviedo, enero-febrero de 1992.
61. Curso de Medicina Estética. Madrid 1990-1991.
62. Curso de Mesoterapia. Madrid, 15-16 diciembre de 1991.
63. Curso de Medicina Estética. Santiago de Compostela, 1 a 3 de noviembre de 1991.
64. Seminario de Mesoterapia. San Sebastian 11-12 de octubre de 1991.
65. Curso de Mesoterapia. Zaragoza, 22-23 de junio de 1991.
66. Curso de Medicina Estética. San Sebastian 11-12 y 18-19 de mayo de 1991.
67. Curso de Medicina Estética. Peñíscola, 15 a 18 de marzo de 1990.
68. Curso de Medicina Estética. Madrid 12 a 15 de octubre de 1989.
69. Curso de Medicina Estética. Madrid 7 a 9 de abril de 1989.
70. Curso de Mesoterapia. Madrid 25-26 de febrero de 1989.
71. Curso de Medicina Estética. Peñíscola 17 a 20 de marzo de 1988.

Actividad Docente Universitaria

1. Profesor del Master de Medicina Estética del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Córdoba. Desde Febrero de 2006 hasta la fecha. <http://www.uco.es/mastermedicinaestetica/?mod=profesores>.
2. Profesor de la Diplomatura de Postgrado en Bases Clínicas en Medicina y Cirugía Cosmética de la Universidad Autónoma de Barcelona, desde 2001 hasta 2015.
3. Profesor del Máster de Medicina Estética de la Universidad Complutense de Madrid, desde 2014 hasta la fecha.
4. Profesor del Máster en Medicina Estética y del Bienestar organizado el Centro de Estudios Colegiales del Colegio de Médicos de Barcelona, 2016.
5. Profesor del Curso de Postgrado Universitario en Dermofarmacia y Cosmetología para Medicina y Cirugía Cosmética. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Unitat de Tecnologia Farmacéutica. Les Heures. Universitat de Barcelona, 2003.
6. Profesor del Curso de Postgrado en Homotoxicología organizado por la Fundación Empresa-Universidad de Zaragoza, Zaragoza, 2002.
7. Profesor del Curso de Extensión Universitaria “Introducción a la Mesoterapia en medicina” desarrollado en la Universidad de Oviedo desde el 20-03-06 hasta el 25-03-06.
8. Director y profesor del Curso presencial teórico-práctico de Mesoterapia organizado conjuntamente por la Asociación de Medicina Mesoterápica Iberoamericana y la Fundación Española de Medicina Estética y Longevidad. 2007-2008/2008-2009/2009-2010/2010-2011.
9. Profesor del curso de formación de Técnico Auxiliar en Medicina Estética. Universidad de Córdoba 15 diciembre de 2008 a 2 de febrero de 2009.

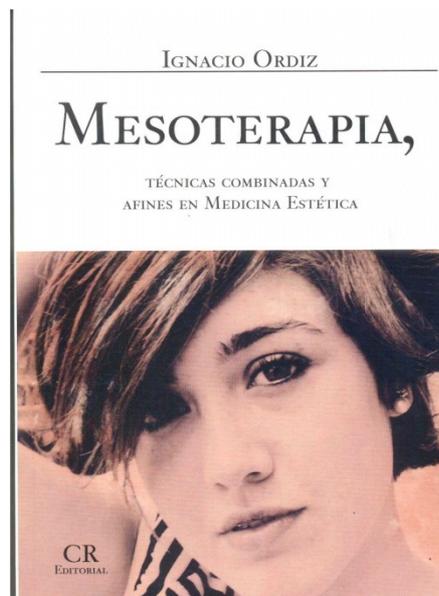
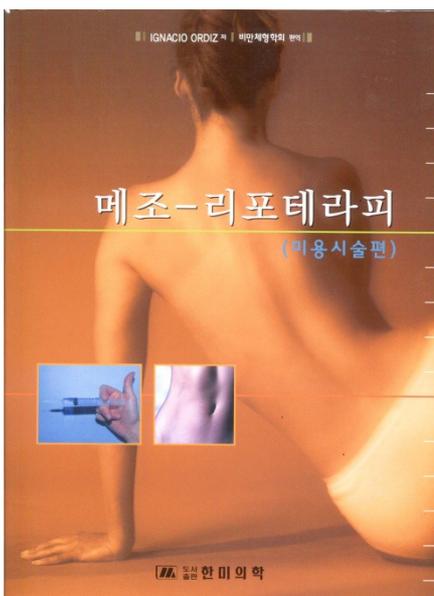
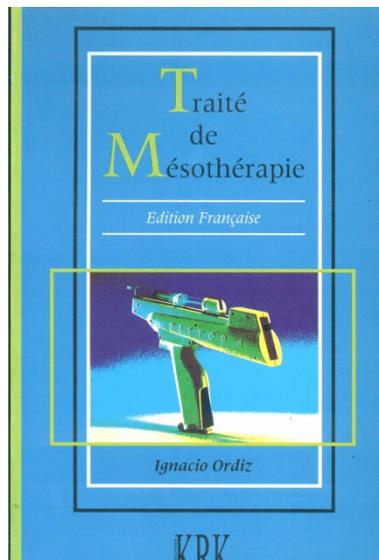
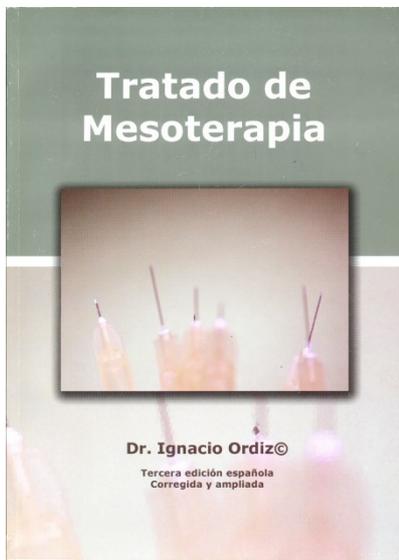
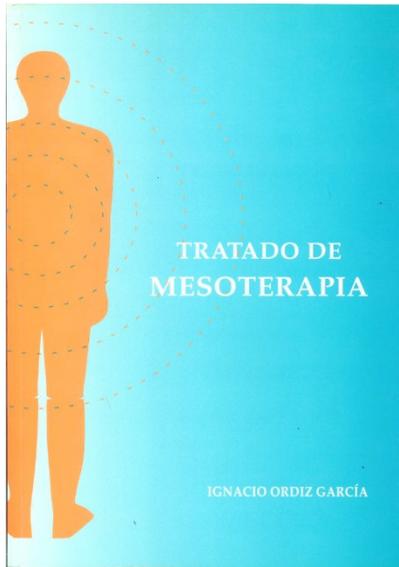
Publicaciones realizadas

1. Celulitis: ¿enfermedad o pandemia cultural? Estética Confidencial on line. Cirugía y Medicina Estética, Biológica y Antienvjecimiento. Junio 2011. http://www.formacion-medica.com/pdf/REVISTA%20ESTETICA_1.pdf
2. Mesoterapia y otras técnicas inyectivas en el tratamiento de la celulitis. <http://www.med-estetica.com/Cientifica/Revista/n48/mesoterapiacelulitis.html>.
3. Efectos secundarios de la Mesoterapia: las infecciones cutáneas. <http://www.med-estetica.com/Cientifica/Revista/n42/mesoterapia.html> Septiembre 2006.
4. Revisión bibliográfica del uso de hialuronato sódico estabilizado como implante intradérmico. <http://www.med-estetica.com/Cientifica/Revista/n18/implante.htm>. Junio 2004
5. Gestión de residuos biosanitarios generados en una consulta de Mesoterapia. Papeles Confidenciales de Medicina Estética y Longevidad, nº3, septiembre 2003.
6. Melanina y agentes despigmentantes. Revista de la S.E.M.E. <http://www.med-estetica.com/Cientifica/Revista/n10/melanina.htm>. Agosto 2003.

7. Infecciones nosocomiales en Mesoterapia. Revista de la S.E.M.E. <http://www.med-estetica.com/Cientifica/Revista/n7/nosocomiales.htm>. Marzo 2003.
8. Antecedentes históricos de la Mesoterapia. Revista de la S.E.M.E. <http://www.med-estetica.com/Cientifica/Revista/n4/mesohistoria.htm>
9. Análisis del tratamiento con fármacos antihomotóxicos en las epicondilitis crónicas. Estudio etiopatogénico. Medicina de Rehabilitación, vol XIV, 3, 2001: 10-14.
10. Terapia Biológica de la Celulitis. Revista de la S.E.M.E., nº49, Enero 2000.
11. Papel de la Mesoterapia en la Insuficiencia Venoso-linfática. MesoEstetic 1999, vol 2, nº-3: 10-14.
12. Terapia biológica de la celulitis. Medicina Biológica, mayo 1999: 19-26.
13. El obeso y un compromiso social. Revista Española de Medicina y Cirugía Cosmética., 1998, nº6, : 10-11.
14. Revisión bibliográfica en Mesoterapia: 1993-1998. MesoEstetic 1998, vol 2, nº 1: 5-12.
15. Particularidades farmacológicas de la Mesoterapia. MesoEstetic 1997, vol 1, nº 4: 5-12.
16. Tratamiento mesoterápico de la celulitis. MesoEstetic 1997, vol 1, nº 3: 5-11.
17. Materiales y técnicas básicas empleadas en Mesoterapia. MesoEstetic 1997, vol 1, nº 2: 5-15.
18. Antecedentes históricos de la Mesoterapia. MesoEstetic 1997, vol 1, nº 1: 7-10.
19. Prevención de la iatrogenia y efectos secundarios de la Mesoterapia. BSEMM IIª época 1996; 3: 19-22.
20. Aspectos legales del empleo de medicamentos extranjeros en España. BSEMM IIª época, 1995; 1:14-17.
21. Papel del silicio en el envejecimiento. Su utilidad mesoterápica. Armonía Médica, 21, 60-72.
22. Agentes químicos de acción reparadora: los peelings. Armonía Médica, 20, 27-66.
23. Resumen de una encuesta efectuada entre Mesoterapeutas Españoles durante 1991-1992. Armonía Médica 13, 24-31.
24. Protocolo de Actuación en Celulitis. Cómo evitar las iatrogenias. Armonía Médica, 11, 45-68.
25. Mathématiques et Mésothérapie. BSFM 1996; 96: 2-4
26. Iatrogenia de la gonadotrofina coriónica humana en el tratamiento de la obesidad según Simeons. Medicina Estética, Octubre/Diciembre 1991, 36-40.
27. Iatrogenia de la Mesoterapia en Medicina Estética. Medicina Estética. Julio-Septiembre 1991, 28-35.

Libros publicados

1. Técnicas combinadas en rejuvenecimiento facial. Publicación on line a través de la página web www.ordizmesoterapia.com , edición febrero 2013.
2. Mesoterapia en las alteraciones estéticas del contorno corporal. Capítulo en: Medicina Estética y Antienvjecimiento. Tresguerres JA. Editorial Panamericana, Madrid 2012.
3. Indicaciones estéticas de la Mesoterapia. Capítulo en: Medicina Estética, abordaje terapéutico. Vidurrizaga, Esparza, Deltell, Amselem. Editorial Panamericana, Madrid 2011.
4. Manual de Mesoterapia, técnicas combinadas y afines en Medicina Estética. Editorial Circulo Rojo. Noviembre 2010. ISB 978-84-15143-34-5.
5. Mesoterapia en Reumato-Traumatología. Edición on-line a través de la página web www.ordizmesoterapia.com
6. Tratado de Mesoterapia on line a través de la página web www.ordizmesoterapia.com
7. Tratado de Mesoterapia. 3ª edición española. ISBN 978-987-23822-0-9. Ed. Novedades Estéticas. Buenos Aires 2007.
8. Tratado de Mesoterapia, edición rusa, enero 2005.
9. Tratado de Mesoterapia, edición coreana, noviembre 2004.
10. Tratado de Mesoterapia. 2ª edición española. KRK ediciones. Oviedo, 1999. ISBN 84-95401-02-9
11. Traité de Mésothérapie. Edición Francesa. KRK Ediciones. Oviedo, 1997. ISBN 84-89613-17-6.
12. Tratado de Mesoterapia. P.G.P. Alicante, 1994. ISBN 84-604-8152-2.



Ponencias en Congresos

1. Protocolo de actuación en celulitis. Evitar las iatrogenias. Primer Encuentro Multidisciplinario de técnicas de Medicina y Cirugía Estética. Madrid, 5 a 9 de octubre de 1992.
2. Migrañas: tratamiento con Mesoterapia. Protocolo actual de tratamiento. III Congreso Nacional de la S.E.M. Sevilla 27-28 Noviembre 1992.
3. Posibilidades de la Mesoterapia en el tratamiento de la hidrolipodistrofia. 1º Congreso Portugués de Mesoterapia. Sintra, 6-7 diciembre 1992.
4. Papel del silicio en el envejecimiento. Comunicación libre en IX Congreso Nacional de Medicina Estética. Barcelona. 17 a 19 de Septiembre 1993.
5. Aplicación de placa de Gore-tex en surco nasogeniano (Vídeo). IX Congreso Nacional de Medicina Estética. Barcelona, 17 a 19 de Septiembre de 1993.
6. Utilización del silicio orgánico en el envejecimiento, una propuesta terapéutica. IIº Encuentro Multidisciplinario de técnicas de Medicina y Cirugía Estética. Madrid, 12 a 15 de Noviembre de 1993.
7. Tratamiento Mesoterápico de las alopecias. IIº simposio Internacional de Actualización en Estética de la Piel. Sao Paulo, 6 a 8 de Mayo de 1994.
8. Prevención de la iatrogenia y de los efectos secundarios de la Mesoterapia. IIº Simposio Internacional de Actualización en Estética de la Piel, São Paulo, 6 a 8 de Mayo de 1994.
9. Puesta al día: Mesoterapia en lipodistrofias y obesidad. Xº Congreso Nacional de Medicina Estética. Barcelona 27 a 29 de mayo de 1994.
10. Actualización en Mesoterapia (Taller práctico). Xº Congreso Nacional de Medicina Estética. Barcelona 27 a 29 de mayo de 1994.
11. Matemáticas y mesoterapia: concepto de interface-meso. Congreso conmemorativo del X Aniversario de la S.E.M. Madrid, 4 a 6 de Noviembre de 1994.
12. Bases fisiológicas de la piel eudérmica. III Curso teórico-práctico de iniciación a la Dermofarmacia del I.C.O de Farmacéuticos del Principado de Asturias. Oviedo, 5 a 7 de Abril de 1995.
13. La Mesoterapia: presente y futuro. III Congreso Argentino de Mesoterapia. Buenos Aires 19 y 20 de Mayo de 1995.
14. Conceitos Fundamentais em Mesoterapia. II Curso teórico-práctico de Mesoterapia. Encontro Franco-Belga-Hispano-Brasileiro de Mesoterapia. São Paulo, 27 y 28 de Mayo de 1995.
15. Mathématiques et Mésothérapie. Reunion trimestral de la Société Française de Mésothérapie. Paris, 1 de Febrero de 1996.
16. Indicaciones y contraindicaciones. Incidentes y accidentes. XII Congreso Nacional de la SEME, Barcelona 12-14 de abril de 1996.
17. Actualización en el tratamiento de la celulitis. V Jornadas Mediterraneas de Medicina y Cirugía Estéticas. Sitges, 3 a 6 de Abril de 1997.

18. Tratamiento de las arrugas finas con ácido glicólico. Work-shop en V Jornadas Mediterraneas de Medicina y Cirugía Estéticas. Sitges, 3 a 6 de Abril de 1997.
19. Mesoterapia y Medicina Naturista. Reunión de Primavera de la Asociación Española de Médicos Naturistas. Oviedo, 25 a 27 de Abril de 1997.
20. Histofisiología de la piel y sus disfunciones estéticas. IV Curso teórico-práctico de iniciación a la Dermofarmacia del I.C.O. de Farmacéuticos del Principado de Asturias. Oviedo, del 18 al 20 de Junio de 1997.
21. Quoi de neuf en mésothérapie de la cellulite? First European Congress of Aesthetic Medicine and Dermatologic And Aesthetic Surgery. Brussels November 7, 8 & 9, 1997.
22. En el siglo XXI, mesoterapia+mesoperfusión. Work-shop en VI Jornadas Mediterraneas de Medicina y Cirugía Estéticas. Sitges 27 a 29 de Marzo de 1998.
23. Qué hay de nuevo en la obesidad? Congreso Panamericano de Estética. Santafé de Bogotá, 13 a 15 de Junio 1998.
24. Mi experiencia personal en el tratamiento de la celulitis. Congreso Panamericano de Estética. Santafé de Bogotá, 13 a 15 de Junio de 1998.
25. Envejecimiento cutáneo. Técnicas de relleno de tejidos blandos. Congreso Panamericano de Estética. Santafé de Bogotá, 13 a 15 de junio de 1998.
26. Mesoterapia de revitalización. Congreso Panamericano de Estética. Santafé de Bogotá, 13 a 15 de junio de 1998.
27. Seminario monográfico: celulitis. Reunión X aniversario de la Asociación para la Promoción del LMV. Montanejos (Castellón), 10-12 octubre de 1998.
28. La iatrogenia en Medicina Estética. A propósito de un caso. Comunicación libre en el XV Congreso de la S.E.M.E. Barcelona, febrero de 1999.
29. Biomesoterapia y celulitis. XII Simposio Nacional de Homotoxicología y Medicina Biológica. Madrid, 22 de mayo de 1999.
30. Tratamiento mesoterápico de la papada. VIII Congreso de Medicina Estética. VIII Manejo Integral del Paciente Obeso. Bogotá 3-4 de Julio de 1999.
31. Farmacología de los medicamentos lipolíticos. VIII Congreso de Medicina Estética. VIII Manejo Integral del Paciente obeso. Bogotá 3-4 de Julio de 1999.
32. La Mesoterapia como técnica no invasiva para el rejuvenecimiento facial. Rejuvenecimiento facial no quirúrgico. Madrid 11-12 de Diciembre de 1999.
33. Fisiopatología de los edemas. Su diagnóstico diferencial. Salón Internacional de la Belleza (Cosmobelleza). Barcelona 3-5 Marzo 2001.
34. Terapia antihomotóxica de lesiones de partes blandas en el deportista. I Symposium Nutrición y Ayudas ergogénica en el deporte. Oviedo, 17 y 18 de Marzo de 2001.
35. Mesoterapia antihomotóxica en lesiones deportivas. XVI Simposio Nacional de Homotoxicología y Medicina Biológica. Madrid, 31 de marzo de 2001.
36. Envejecimiento cutáneo y Mesoterapia. Journées Pratiques de Médecine et Chirurgie Esthétiques. Knokke (Bélgica) 21-23 de septiembre 2001.

37. Celulitis y Mesoterapia. Journées Practiques de Médecine et Chirurgie Esthétiques. Knokke (Bélgica) 21-23 de septiembre 2001.
38. Nuevos conceptos en Mesoterapia. Curso Anual de la Sociedad Española de Medicina y Cirugía Cosmética. Madrid, 24 de Noviembre de 2001.
39. Mesolighting versus Mesolifting. Xª Jornadas Mediterraneas de Confrontaciones terapéuticas en Medicina y Cirugía Cosmética. Sitges 11-14 de Abril 2002.
40. Mesosoftnes facial con Mesoéclat®. Work shop. Xª Jornadas Mediterraneas de Confrontaciones terapéuticas en Medicina y Cirugía Cosmética. Sitges 11-14 de Abril 2002.
41. Mesoéclat®: application topique. Work shop 23º Congrès National de Médecine Esthétique et de Chirurgie Dermatologique. Paris 27-29 Septiembre 2002.
42. Caratteristiche farmacologiche di Mesoterapia. Le direzioni principali di Mesoterapia in estetica: Cellulite; aging. San Petersburgo 21 de octubre de 2002, Moscú 23 de octubre de 2002.
43. Tratamiento antienvjecimiento de acción inmediata: el Mesoecclat®. Anti-Aging World Conference 2003, Paris 28 de febrero-2 Marzo.
44. Metodo Mesoecclat contro l'invecchiamento cutaneo. XXIV Congresso Nazionale di Medicina Estetica. Roma 11-13 Aprile 2003.
45. I Congreso Internacional de Mesoterapia de Perú. Lima 28-29 de Septiembre de 2003.
46. Características farmacológicas de la Mesoterapia. I Congreso Nacional de Mesoterapia y Medicina Estética. Kiev 6 y 7 de Noviembre de 2003.
47. Aplicaciones de la Mesoterapia en el ámbito estético. I Congreso Nacional de Mesoterapia y Medicina Estética. Kiev 6 y 7 de Noviembre de 2003.
48. Medicina Estética del tercio superior de la cara. ICMM, 22 de noviembre de 2003.
49. Evaluation: Mesoecclat method-ageing skin. International Master Course on Ageing Skin, Paris 8-10 de Enero de 2004.
50. Mesoecclat: treating cutaneous anti-ageing immediate action (Workshop). International Master Course on Ageing Skin. Paris 8-10 de Enero de 2004.
51. Métodos combinados para el rejuvenecimiento facial: Mesoèclat® y Radiance® (Workshop). XIX Congreso Nacional de la S.E.M.E. Barcelona 12-14 de febrero de 2004.
52. Mesoecclat® against the facial aging (Workshop). Antiaging World Conference. Paris 19 a 21 de Marzo de 2004.
53. Terapias combinadas para rejuvenecimeinto facial (ponencia y work-shop). XII Jornadas Mediterraneas de Confrontaciones Terapéuticas. Sitges, 30 de abril a 2 de mayo de 2004.
54. Luz Pulsada Intensa (IPL) y cosmetología en el tratamiento del rejuvenecimiento facial. Tercer Simposium Depitotal, San Sebastian 5-7 septiembre 2004.
55. Terapias combinadas antienvjecimiento facial. Russian Antiage Conference. Moscú 16-17 de octubre de 2004.
56. Utilización de un análogo de la proteína SNAP-25 en el tratamiento de las arrugas de expresión. Russian Antiage Conference. Moscú 16-17 de octubre de 2004.

57. Tratamientos combinados del envejecimiento. IV Encuentro Internacional de técnicas de Medicina Estética y Antienvjecimiento. Madrid, 29 a 31 de octubre 2004.
58. Protocolos in Aesthetic Mesotherapy. IPL+Mesoeclat®: combination therapy. 1st Asia-Pacific Convection of Aesthetic Medicine. Seul, 28 de noviembre 2004.
59. Nanosomas de silicio orgánico para el tratamiento del envejecimiento cutáneo. V Encuentros Internacionales de Medicina Estética y Antienvjecimiento. Madrid 11 a 13 de Noviembre de 2005.
60. Infecciones y Mesoterapia. V Encuentros Internacionales de Medicina Estética y Antienvjecimiento. Madrid 11 a 13 de Noviembre de 2005.
61. Tratamiento homeopático de la celulitis. Curso Anual SEMCC'2005: Actualizaciones en patología estética del tejido graso. Madrid, (Organización Médica Colegial) 3 de diciembre de 2005.
62. Micobacterias y Mesoterapia. XXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Estética. Valencia 9-11 de Marzo de 2006.
http://www.seme.org/docs/congresos_seme/SEME2006_Programa.pdf
63. Intradermoterapia en Medicina Estética. Consideraciones generales. Complicaciones. Perspectivas futuras. XIII Congreso Brasileño de Medicina Estética. San Paulo 21 a 24 de Junio de 2006.
64. Mesoterapia y otras técnicas inyectivas en el tratamiento de la celulitis. VI Encuentro Internacional de Medicina Estética y Antienvjecimiento. Madrid 24 a 26 de Noviembre de 2006.
65. Sesión Interactiva. Actualizaciones en medicina estética II. Mesoterapia con fosfatidilcolina. Efectos secundarios. XXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Estética. Madrid 22 a 24 de febrero de 2007.
66. Coordinador de los Talleres de Mesoterapia en el Practicum Internacional de Técnicas Lipolíticas aplicadas en Medicina Estética. Sotogrande, Cadiz 8-9 Junio 2007.
67. Mecanismo de acción de la Mesoterapia. Yatrogenia y complicaciones. 2º Encuentro Latinoamericano de Estética Integrada. Buenos Aires, 31 de Agosto, 1 y 2 de Septiembre 2007.
68. Envejecimiento del seno y Mesoterapia. 2º Encuentro Latinoamericano de Estética Integrada. Buenos Aires, 31 de Agosto, 1 y 2 de Septiembre 2007.
<http://www.eldei.com.ar/new/temas2.htm> <http://www.femeninas.com.ar/2-encuentro-de-estetica-integrada.asp>
69. Combinación de mesoterapia y medicina física en el tratamiento de la celulitis. VII Encuentro Internacional en Técnicas de Medicina Estética y Antienvjecimiento. Madrid 16, 17 y 18 de Noviembre de 2007.
70. HylanSes®: nueva generación de implantes cutáneos reabsorbibles de ácido hialurónico doblemente reticulado. Taller práctico en XVI Jornadas Mediterraneas de Confrontaciones terapéuticas en Medicina y Cirugía Cosmética. Sitges 9 a 11 de Mayo de 2008.

71. Peeling y carboxiterapia con JetPeel®. Taller práctico en XVI Jornadas Mediterraneas de Confrontaciones terapéuticas en Medicina y Cirugía Cosmética. Sitges 9 a 11 de Mayo de 2008.
72. Implantes de hialurónico. Congreso Médico Internacional de Estética Integral Feria Integral de la Belleza (FIBELL). Bilbao 20-23 de junio de 2008.
73. Patología del tejido adiposo. VII Simposium Tecnología Estética. San Sebastian 6-8 de Septiembre de 2008.
74. Ultrasonidos y cavitación. Teoría. VII Simposium Tecnología Estética. San Sebastian 6-8 de Septiembre de 2008.
75. Seguimiento clínico del linfedema. XVIII Seminario Asociación para la Promoción del Linfodrenaje Manual Vodder. Barcelona 31-octubre/1-2 Noviembre 2008.
76. Peeling y carboxiterapia con Jet-Peel®. Simposium teórico-práctico de Dermocosmética Avanzada. (SesDerma Laboratorios). Barcelona 21 y 22 de Noviembre de 2008.
77. Biorevitalización con polinucleótidos. VIII Encuentro Internacional en técnica de Medicina Estética y Antienvjecimiento. Madrid 28 y 29 de Noviembre de 2008.
78. Tratamiento de la celulitis con mesoterapia y carboximesoterapia. Simposium teórico-práctico de Dermocosmética Avanzada. Valencia 3-4 de abril de 2009.
<http://www.clinicafontana.es/simposiumabril2009.pdf>
79. Mesotherapy with nanosomes. Dubai World Dermatology and laser conference and exhibition. Dubai Derma 2009. Dubai 26-28 April 2009.
http://www.dubaiderma.com/conference_program.php
80. Una nueva era en Mesoterapia. XVII Jornadas Mediterráneas de Confrontaciones Terpéuticas en Medicina y Cirugía Cosmética. Sitges, 15 1 7 de Mayo de 2009.
<http://www.semcc.com/actividades/docs/PreProgramaXVIIas.pdf>
81. Nanomesoterapia. XVII Jornadas Mediterráneas de Confrontaciones Terpéuticas en Medicina y Cirugía Cosmética. Sitges, 15 1 7 de Mayo de 2009.
<http://www.semcc.com/actividades/docs/PreProgramaXVIIas.pdf>
82. Mesoterapia: iatrogenia y complicaciones. I Congreso Interactivo de Medicina Estética. 24 a 26 de Septiembre de 2009. Cartagena de Indias. Colombia.
83. Envejecimiento del seno y mesoterapia. I Congreso Interactivo de Medicina Estética. 24 a 26 de Septiembre de 2009. Cartagena de Indias. Colombia.
84. IPL y mesoterapia. I Congreso Interactivo de Medicina Estética. 24 a 26 de Septiembre de 2009. Cartagena de Indias. Colombia.
85. Nuevas estrategias antienvjecimiento: peeling de ferúlico y nanomesoterapia (Taller).- VIII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Antienvjecimiento y longevidad. Sevilla, 22-254 de Octubre de 2009. www.sem.al.org
86. La anti-Mesoterapia. IX Encuentro Internacional en técnicas de Medicina Estética y Antienvjecimiento. Madrid, 27 y 28 de Noviembre de 2009.

87. Técnica transcutánea de inducción de la síntesis de colágeno: Nanoroller y nanosomas. Simposium teórico-práctico de Dermocosmética Avanzada. (SesDerma Laboratorios). Madrid, 5 y 6 de febrero de 2010.
88. Corrección de los implantes de ácido hialurónico on formulaciones tópicas. Granulomas y su manejo (work shop de bio-revitalización). Simposium teórico-práctico de Dermocosmética Avanzada. (SesDerma Laboratorios). Madrid, 5 y 6 de febrero de 2010.
89. Mesoterapia con nanosomas: innovación tecnológica en Medicina Estética. (Taller) XVIII Jornadas Mediterraneas de Confrontaciones Terapéuticas en Medicina y Cirugía Cosmética. Sitges 21 a 23 de mayo de 2010.
90. Nanoroller y Nanosomas: aplicaciones en Medicina Estética (Taller) XVIII Jornadas Mediterraneas de Confrontaciones Terapéuticas en Medicina y Cirugía Cosmética. Sitges 21 a 23 de mayo de 2010.
91. Conceptos erróneos y prejuicios en el tratamiento de la celulitis.. X Encuentro Internacional en técnicas de Medicina Estética y Antienvjecimiento. Madrid 26 y 27 de Noviembre de 2010.
92. Técnicas cosméticas mínimamente invasivas de aplicación palpebral y periocular. XLII Congreso de la Sociedad Andaluza de Oftalmología. 20, 21 y 22 de enero de 2011.
93. Peelings y técnicas afines en el rejuvenecimiento palpebral y periocular. Simposium teórico-práctico de Dermocosmética y Técnicas Avanzadas. (SesDerma Laboratorios). Madrid, 2 de abril de 2011.
94. Rejuvenecimiento periocular y cosmética palpebral. 87 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología. Oviedo 21 a 24 de septiembre de 2011.
95. Actualizaciones en medicamentos inyectables para mesoterapia estética: ampliación posibilidades terapéuticas (taller). XXVII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Estética (IX Congreso Europeo). Madrid 23-25 febrero de 2012.
96. Revisión de las técnicas de remodelación facial: nuevas tendencias en relleno y volumen de larga duración 100% reabsorbible. (taller). XXVII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Estética (IX Congreso Europeo). Madrid 23-25 febrero de 2012.
97. Workshops peelings químicos. Cluj-Napoca (Rumanía). 3 de marzo de 2012.
98. Workshops peelings químicos. Helsinki (Finlandia), 28 de abril de 2012.
99. Workshops peelings químicos. Tallin (Estonia), 29 de abril de 2012.
100. Aplicación de Dermaroller en cicatrices y estrías. Taller teórico-práctico. XX Jornadas Internacionales Mediteraneas de Confrontaciones terapéuticas en medicina y Cirugía Cosmética. Sitges 18 a 20 de Mayo de 2012.
101. Mesoterapia homeopática corporal. II Jornadas Gallegas de Medicina Estética. La Toja, 15 y 16 de Junio de 2012.
102. El genotipo ahorrador y el síndrome metabólico. XII Encuentro Internacional en Técnicas de Medicina Estética y Antienvjecimiento. 30 de Noviembre y 1 de Diciembre de 2012. Madrid.

103. Papel de la mesoterapia en la medicina estética actual. XXI Jornadas Mediterraneas de confrontaciones terapéuticas en Medicina y Cirugía Cosmética. Sitges 17 1 9 de Mayo de 2013.
104. Hallazgos de un estudio sobre alteraciones ponderales en trabajadores de la Universidad de Oviedo. XXI Jornadas Mediterraneas de confrontaciones terapéuticas en Medicina y Cirugía Cosmética. Sitges 17 1 9 de Mayo de 2013.
105. Aplicación de las ondas de choque en Medicina Estética. XXI Jornadas Mediterraneas de confrontaciones terapéuticas en Medicina y Cirugía Cosmética. Sitges 17 1 9 de Mayo de 2013.
106. Estudio de nuevas combinaciones de agentes exfoliantes. Comunicación libre al XXIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Estética. Málaga, 20-22 de febrero de 2014.
107. Mesoterapia corporal: elección de los principios activos más eficaces. XXII Jornadas Mediterraneas de confrontaciones terapéuticas en Medicina y Cirugía Cosmética. Sitges del 16 al 18 de Mayo de 2014.
108. Valoración del efecto de nuevas combinaciones de agentes exfoliantes. XXII Jornadas Mediterraneas de confrontaciones terapéuticas en Medicina y Cirugía Cosmética. Sitges del 16 al 18 de Mayo de 2014.
109. Protocolos combinados de rejuvenecimiento facial: peelings, hilos tensores y aplicación de ácido hialurónico. XIII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Antienevejecimiento y longevidad. Sevilla, 2, 3 y 4 de Octubre de 2014.
110. Tratamiento combinado de la flacidez de brazos con hilos PDO, inyecciones intradérmicas y carboxiterapia. Comunicación Libre. XXX Congreso de la Sociedad Española de Medicina Estética. Málaga, Febrero de 2015.
111. Mesoterapia, mito o realidad. Una revisión crítica. 7º Curso Internacional de Dermatología Estética y Cosmética. Sevilla 9, 10 y 11 de abril de 2015.
112. Combinación de agentes exfoliantes en el tratamiento de las hiperpigmentaciones y el envejecimiento cutáneo de moderado a severo de grado III y IV. Estudio clínico observacional multicéntrico. XXIII Jornadas Mediterráneas de Confrontaciones Terapéuticas en Medicina y Cirugía Cosmética. Sitges del 8 al 10 de Mayo de 2015.
113. Ácido tranexámico y otros agentes despigmentantes. Aplicación con microneedling. Taller en "Clínica en marcha". XXXI Congreso de la Sociedad Española de Medicina Estética. Málaga Febrero 2106.

Otras Experiencias Profesionales: traducciones médicas

1. Los síndromes ligamentarios iliolumbares y sacroilíacos. Original en francés del Dr. P. Malafosse. Publicada en: B.S.E.M.M. IIª época, nº 3, 1996: 27-32.
2. La Mesoterapia lenta (mesoperfusión). Original en francés del Dr. Jean Pierre Martin. Publicada en: MesoEstetic, 1997, vol 1; 1: 17-22 (I parte) y MesoEstetic, 1997, vol 1; 2: 15-24 (II parte).

3. El Artecoll ®. Historia, composición y aspectos histológicos. Técnica de inyección. Comparación con otros productos. Original en francés del Dr. Bernard Hertzog. Publicado en: MesoEstetic, 1997, vol 1; 3: 51-56.
4. Tratamiento del envejecimiento cutáneo por Mesoterapia asociada a la mascarilla biotérmica de vitamina A ácida. Original en francés del Dr. Jean Pierre Martin. Publicada en: MesoEstetic, 1998, vol 1; 4: 12-23.
5. La Mesoterapia, sus aplicaciones en medicina estética y actitud terapéutica del médico. Original en francés del Dr. Bernanrd Hertzog. Publicada en: MesoEstetic, 1998. vol 2; 1: 24-37.

Pertenencia a Sociedades Científicas

1. Colegiado en el Ilustre Colegio Oficial de Médicos de Asturias con el número 3305002.
2. Miembro de la Sección Colegial de Médicos Acupuntores, Homeópatas y Naturistas del ICO de Médicos de Asturias.
3. Socio fundador y Presidente de la Asociación Médica de Mesoterapia Iberoamericana (AMMIA) www.ammia.org
4. Socio fundador y vocal de la Sociedad Asturiana de Medicina Cosmética y Estética.
5. Miembro de número de la Sociedad Española de Medicina Estética.
6. Miembro de número de la Sociedad Española de Medicina y Cirugía Cosmética.
7. Miembro de número de la Sociedad Española de Medicina Homeopática.
8. Miembro de número de la Sociedad Francesa de Mesoterapia.
9. Miembro de número de la Sociedad Italiana de Mesoterapia.
10. Miembro de número de la Federación Española de Medicina Deportiva.
11. Miembro de Honor de la Asociación Española de Linfodrenaje Manual Vodder.
12. Miembro del Comité Científico de la Sociedad Internacional de Mesoterapia.