



UNIVERSIDAD DE MURCIA

**DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGÍA,
OPTOMETRÍA, OTORRINOLARINGOLOGÍA Y
ANATOMÍA PATOLÓGICA**

Efectos de los Aceites de Almendras Dulces y
de Crisálida del Gusano de la Seda sobre el
Fotoenvejecimiento Cutáneo Inducido en
Ratones SKH1/CRL por Radiación UV

D^a. Ana María Gil Ortega

2014



INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN EN ENVEJECIMIENTO

Efectos de los aceites de almendras dulces y
de crisálida del gusano de la seda sobre el
fotoenvejecimiento cutáneo inducido en
ratones SKH1/CRL por Radiación UV

D^a Ana María Gil Ortega

2014

A mis padres

Agradecimientos

Si hay alguien al que debo la presentación de esta tesis es al Dr. D. Vicente Vicente Ortega. Desde el inicio me transmitió su ilusión por el proyecto y me animó a embarcarme en esta andadura. Nunca podré agradecerle su gran dedicación, su generosidad para compartir su enorme conocimiento y su valioso tiempo, su increíble sencillez, su ánimo constante y el cariño demostrado en la tutela de esta tesis.

Al Dr. D. Francisco José Gómez García, al que he tenido la suerte de conocer durante el desarrollo de este trabajo; por su inestimable ayuda y paciencia, por guiarme por el “fabuloso mundo de la inmunohistoquímica”, por apoyarme y animarme en todo momento.

A la Dra. D^a Paloma Sánchez-Pedreño Guillén, gran profesional de la Dermatología, gracias por su colaboración e imprescindible aportación.

A Victor Bolarín y al resto del personal del laboratorio, por su valiosa e indispensable ayuda durante la parte experimental de esta tesis.

Al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Reina Sofía de Murcia, por su intervención en el estudio inmunohistoquímico, en especial al Dr. Francisco Martínez Díaz.



A los profesores Manuel Canteros Jordana y Matilde Campos Aranda, de la Cátedra de Bioestadística de la Facultad de Medicina, por su colaboración en el estudio estadístico.

Al laboratorio Pronamed, S.L., por la aportación de los aceites ensayados.

A todos mis amigos, por apoyarme y a animarme a seguir, es un lujo poder contar con todos ellos.

Y no por último menos importante, a mi familia:

A mis padres, por ser el ejemplo a seguir, por inculcarme la necesidad de “invertir los talentos” y valores como el esfuerzo y la superación, que han hecho posible la culminación de esta tesis.

A mis hermanos y cuñados, por “estar siempre ahí” de forma incondicional, y como no, a mis diez sobrinos, por ser la ilusión de mi vida.

Gracias a todos.



ÍNDICE

I. INTRODUCCION	19
II. ANTECEDENTES	23
A. Piel: Historia. Sustrato fisiológico	25
B. El sol y sus efectos sobre la piel: Radiación Ultravioleta	40
C. Envejecimiento cutáneo. Fotoenvejecimiento	65
D. Fotoprotección	81
E. Sustancias con propiedades antienvjecimiento	95
F. Modelos experimentales de Fotoenvejecimiento	131
III. OBJETIVOS	147
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	151
A. MATERIAL	153
a. Animales	153
b. Lámpara	153
c. Aceites	156
B. MÉTODOS	160
a. Procedimiento experimental	160
b. Estudio macroscópico	161



c. Método anatomopatológico	161
d. Método Estadístico	162
 V. RESULTADOS	 169
 VI. DISCUSIÓN	 227
 VII. RESUMEN	 263
 VIII. CONCLUSIONES	 267
 IX. BIBLIOGRAFIA	 271



I. INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es definido por la OMS como un proceso biológico, es decir natural, que además, es inevitable, universal, irreversible y heterogéneo, y está caracterizado por los cambios estructurales, funcionales, psicológicos y sociales que sufre el organismo con el transcurso del tiempo.

Actualmente se acepta que, aunque el origen de dichos cambios es multifactorial (factores endógenos y exógenos), los mecanismos íntimos de producción de los cambios están intimamente relacionados con el daño oxidativo a nivel celular y tisular de los distintos órganos y aparatos.

La piel, con el transcurso de la edad, como el resto de los órganos, sufre esos cambios, que se conocen como **envejecimiento cronológico, intrínseco o fisiológico**; pero además, es el único órgano del organismo que puede padecer también otros cambios originados directamente por la exposición a la radiación ultravioleta solar, cambios que se añaden a los anteriores y que suelen ser mas intensos y graves. Estos cambios se engloban bajo el término de **fotoenvejecimiento o envejecimiento cutáneo patológico**, que está caracterizado por un envejecimiento cutáneo más extenso, de aparición más precoz y sobre todo, de mayor gravedad, pues engloba la **fotocarcinogénesis** o presentación de cánceres cutáneos.



Estos hechos han supuesto un doble reto para la ciencia y en concreto para la investigación; por una parte, en relación con el desarrollo de diversos modelos experimentales de fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis, fundamentalmente inducidos en ratones tras la exposición crónica a la radiación ultravioleta, con el fin de ir conociendo de forma progresiva y detallada los mecanismos y cambios implicados en dicho fenómeno; y por otra, en el desarrollo de productos o sistemas de fotoprotección.

En este sentido, durante los últimos años ha ocurrido un enorme desarrollo de nuevos protectores solares de naturaleza química y de nuevas formulaciones de los de naturaleza física, pero quizás lo mas novedoso corresponda al gran esfuerzo investigador en relación con los de naturaleza biológica y el ensayo de distintas sustancias de origen natural.

En nuestro trabajo, nos planteamos el desarrollo de un modelo experimental de fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis cutáneos en ratones desnudos SHK1, mediante la exposición crónica a radiaciones ultravioleta, con el fin de conocer los efectos del aceite de la crisálida del gusano de la seda como posible agente fotoprotector.



II. ANTECEDENTES

A. PIEL

a. Historia

Desde la Antigüedad, el hombre ha cuidado su piel. En los pueblos primitivos, la cosmética tenía un carácter mágico en China y la India era de carácter religioso; de las dinastías egipcias datan los primeros remedios cosméticos asociados a la medicina: recetas de ungüentos, aceites, tabletas de arcilla e incluso fórmulas para las arrugas.

En Grecia y Roma la cosmética alcanzó un gran auge, se desarrolló un verdadero ritual de cuidados; se perfumaban, incorporando la práctica del baño y de los masajes y utilizaban gran cantidad de cosméticos para embellecerse y evitar la desecación cutánea, lo que indica la importancia que siempre ha tenido el mantenimiento de la piel en el canon de belleza.

Pero además del aspecto estético, el estudio de la piel siempre ha interesado desde el punto de vista médico. Para el mundo griego y romano (que ya conocían la disección del cuerpo humano), la piel correspondía a una membrana amorfa formada a partir de los humores exhalados por el calor interno del cuerpo y su color se debía al efecto del sol sobre algún humor interno. Esta creencia se mantuvo durante la Edad Media e incluso en el Renacimiento (Vicente, 1999). De modo que, aunque la Dermatología como especialidad es relativamente joven, el estudio de la histología y de las enfermedades de la piel es tan antiguo como la medicina.

b. La piel como sustrato fisiológico

Es necesario un conocimiento profundo de la fisiología de la piel, que permita comprender los procesos y mecanismos responsables de las patologías y alteraciones cutáneas.

Se ha escrito mucho acerca de la importancia de la piel y sus múltiples funciones. Actualmente se considera que la piel es el órgano más extenso del cuerpo humano, lo recubre en su totalidad y actúa como barrera, protegiéndonos del medio externo, pero al mismo tiempo comunicándonos con él. En una persona de 170 cm de altura y 70 kg de peso, ocupa aproximadamente 2 m² y su peso aproximado es de 10 kg. Su espesor varía entre los 0,5 mm (en los párpados) a los 4 mm (en el talón). (*Avci, 2003*).

La piel juega un papel vital como barrera, pues aísla al organismo del medio exterior, pero al mismo tiempo, lo conecta con él. Es, por definición, una barrera de regulación del medio interno; controla la temperatura corporal y el equilibrio hidroelectrolítico, protege al organismo y mantiene íntegras sus estructuras, al tiempo que actúa como mecanismo de comunicación con el medio. Es también la barrera más importante frente a la atmósfera exterior, potencialmente hostil y de modo especial, frente a las radiaciones solares que, aunque imprescindibles para el mantenimiento y desarrollo de la vida, pueden ser, al mismo tiempo, fuente de importantes alteraciones. Éstas se han ido conociendo de un modo progresivo, sobre todo a la exposición solar persistente, que favorece la presentación de cambios degenerativos como el fotoenvejecimiento, cuya máxima representación es el cáncer cutáneo. (*Vicente, 1999*)

Las funciones de la piel son indispensables para mantener la homeostasis y por tanto, vitales para la propia supervivencia del individuo. Además de la protección, entre ellas encontramos la intervención en procesos como la regulación de temperatura, la síntesis de hormonas

y sustancias químicas y la excreción de sales y agua. Por otro lado, en la piel se encuentran receptores sensitivos pertenecientes al complejo entramado sensorial.

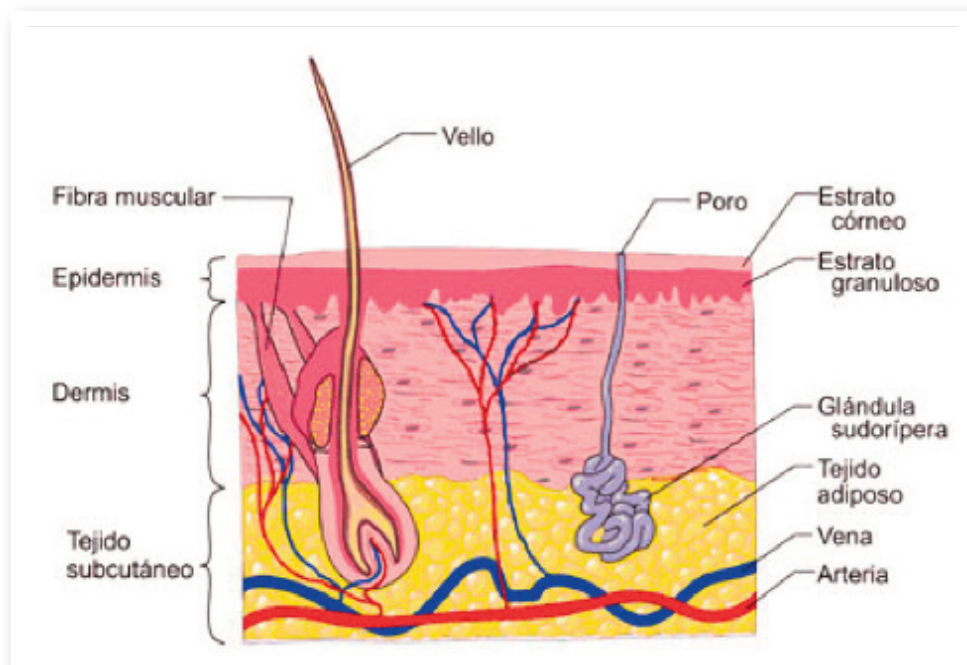
En resumen, éstas son las funciones cutáneas que hacen de la piel uno de los órganos más importantes:

FUNCIONES CUTÁNEAS			
Función	Mecanismo	Acción	Situación defectuosa
Inmunitaria	Inmunidad natural, adaptada	Prevenir infecciones fúngicas, bacterianas, víricas, enfermedades autoinmunes, neoplasias	Infecciones, enfermedades autoinmunes, neoplasias cutáneas
Barrera	Estrato córneo, epidermis, melanina	Prevenir la infección, absorción y deshidratación, filtrar la radiación ultravioleta	Infecciones bacterianas de repetición, absorción de sustancias químicas, deshidratación, cáncer cutáneo.
Reparadora	Fibroblastos	Curación de heridas y úlceras cutáneas, reparar el daño celular por ultravioleta	Úlceras cutáneas, queloides, neoplasias cutáneas
Vascular	Circulación hemática y linfática	Nutritiva y regulación de la temperatura, drenaje linfático	Infarto, insuficiencia venosa, vasculitis, vasculopatía, linfedema
Comunicación	Fibras nerviosas aferentes y eferentes	Conducción de estímulos nerviosos, secreción de citocinas	Hiper e hiposensibilidad, prurito, hiperhidrosis, síndromes neurológicos, control de la temperatura
Atención	Visual, olfativa	Pigmentación, distribución del pelo, sudoración	fotoenvejecimiento, vitiligo, alopecia, halitosis, bromhidrosis
Secretora Excretora			

 **Tabla 1. Funciones cutáneas**

c. Morfología de la piel

La piel consta de tres estratos diferenciados, que de fuera a dentro son: la epidermis (capa superficial sin irrigación sanguínea), la dermis (capa irrigada de tejido conectivo) y la hipodermis (capa interna de tejido adiposo y conectivo). De ella también dependen los anexos cutáneos: glándulas sebáceas y sudoríparas, uñas y pelo.



■ **Figura 1. Histología de la piel (Pons, 2004)**

1. Epidermis

Es la zona más externa y en contacto con el exterior. Tiene un espesor no superior a los 0,2 mm y es un epitelio poliestratificado cuyas células superficiales se cornifican. De la epidermis surgen los folículos

pilosebáceos, las glándulas sudoríparas y las uñas.

La epidermis consta de cuatro tipos celulares: queratinocitos, melanocitos, células fagocíticas de Langerhans y células de Merkel (*Serna, 2007*).

La epidermis está constituida por las siguientes capas:

1. Estrato basal o germinativo
2. Estrato mucoso de Malpighio o Estrato Espinoso
3. Estrato granuloso
4. Estrato lúcido
5. Estrato córneo

Los **queratinocitos** son las células epidérmicas más numerosas, que recubren la membrana basal, donde se distribuyen a modo de empalizada y se fijan a la lámina lúcida por unas estructuras glicoprotéicas llamadas hemidesmosomas. Van germinando desde el estrato basal de la epidermis y ascendiendo, formando los estratos espinoso, granuloso, lúcido (solamente en palmas y plantas) y córneo. Conforme va ascendiendo, va aumentando su contenido en queratina hasta que la célula se aplana, muere y finalmente se desprende. Este ciclo o tiempo de tránsito epidérmico dura unos 30 días. El **estrato córneo** es una barrera importante para impedir la pérdida de agua transcutánea. Su baja proporción de agua, así como los lípidos, proteínas y su adecuada ordenación, hacen de él una barrera semipermeable muy selectiva, capaz de sufrir traumas físicos y agresiones químicas y energéticas.

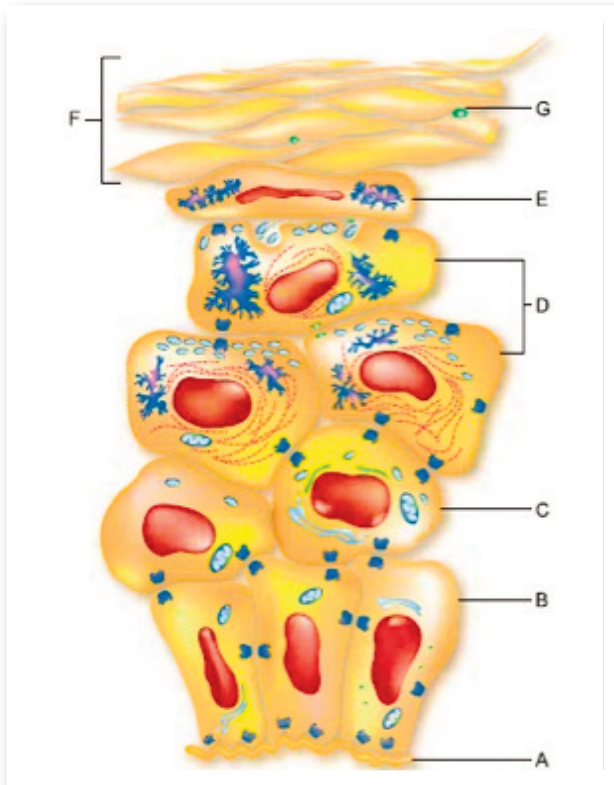


Figura 2. Morfología y distribución de los queratinocitos (Pons, 2004)

Los **melanocitos**, son células de origen neuroectodérmico, que se localizan en la capa basal de la epidermis y de los folículos pilosos. Son menos numerosos que los queratinocitos. Responden a estímulos inductores a través de unos receptores específicos de su membrana, iniciando entonces la síntesis de pigmentos melánicos. El estímulo alcanza el núcleo y comienza un proceso, al final del cual, los premelanosomas se convierten en melanosomas, que son capaces de acumular pigmentos melánicos. En este proceso interviene la enzima tirosinasa, que se activa cuando se une a una cuproproteína y recibe el estímulo necesario. La radiación UV-B desencadena la liberación de la “hormona estimulante de melanocitos”. Las melaninas, sobre todo la eumelanina) son capaces de fijar la radiación ultravioleta y secuestrar radicales libres.

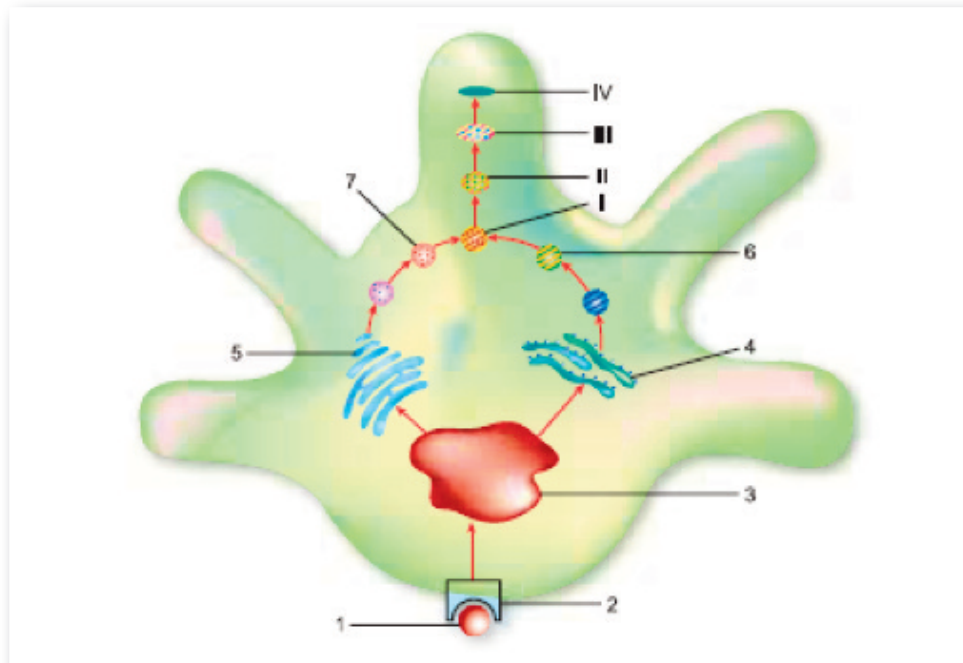


Figura 3. Melanocito (Pons, 2004)

1: estímulo inductor de la respuesta melánica; 2: receptor específico; 3: núcleo; 4: retículo endoplasmático rugoso; 5: aparato de Golgi; 6: vesículas conteniendo una trama proteica; 7: vesículas cargadas de tirosinasa. I, II, III, IV: melanosomas de nivel I, II, III, IV

Las células de Langerhans, se encuentran a nivel del estrato espinoso. Son células que tienen un papel decisivo en el sistema inmunológico cutáneo. En concreto, intervienen en reacciones inmunológicas de tipo alérgico.

Entre la epidermis y la dermis, se encuentra la **membrana basal**, que es una compleja matriz extracelular formada por dos láminas, lúcida y densa, que deben su nombre, respectivamente, a la mayor o menor facilidad con la que dejan pasar los electrones.

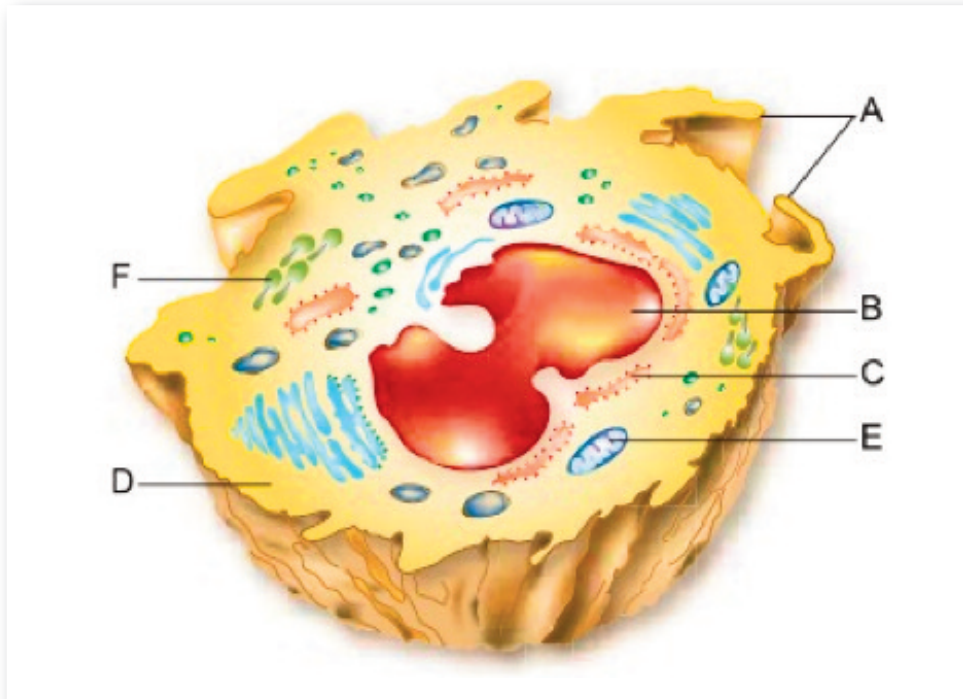


Figura 4. Célula de Langerhans (Pons, 2004)

A: contorno dendrítico; B: núcleo lobulado; C: retículo endoplasmático; D: aparato de Golgi; E: mitocondria; F: gránulos de Birbeck.

2. Dermis / tejido conjuntivo

La dermis tiene un grosor 10 veces mayor que el de la epidermis y constituye el sostén de la epidermis. Está constituida por tejido conjuntivo formado por la sustancia fundamental o intercelular, fibras de colágeno y elastina, entre las que se encuentran los fibroblastos, vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. La sustancia fundamental está compuesta por glucosaminoglicanos, ácido hialurónico, condroitinsulfato y dermatansulfato, que embeben gran cantidad de agua formando un gel. A diferencia de la epidermis, contiene menor número de células residentes, y éstas son mayoritariamente los fibroblastos, mastocitos (células cebadas) y células fagocíticas (macrófagos, histiocitos).

Histológicamente se divide en dos capas, papilar y reticular. La dermis papilar es la capa más superficial, limita superiormente con la epidermis y rodea a los anexos cutáneos. Está compuesta por tejido conectivo laxo, fibras de colágeno tipo III y asas capilares. Es la zona de mayor celularidad, donde tienen lugar a mayoría de los procesos metabólicos de la piel. La dermis reticular es la capa más profunda, está formada por haces de fibras de colágeno más gruesos que los de la dermis papilar, que sirven de soporte para los anejos cutáneos: tejido conectivo denso, fibras de colágeno tipo I, fibras elásticas y macrófagos. Limita inferiormente con el tejido celular subcutáneo, denominado también hipodermis o panículo adiposo y en su porción inferior se observa una capa de músculo liso, llamado músculo piloerector.

3. Hipodermis

Situada debajo de la dermis, es un tejido conjuntivo especializado, que contiene grandes masas de adipocitos. Puede alcanzar un grosor variable, sobre todo en algunas zonas concretas, como el abdomen y las caderas, ya que interviene en el almacenamiento y movilización de lípidos para cubrir las necesidades energéticas.

Está compuesta por tejido conjuntivo laxo y adiposo, que es el que le proporciona la capacidad de regulación térmica y de movimiento. Está constituida por ligamentos, nervios, grasa y vasos sanguíneos y linfáticos.



4. Anejos cutáneos

- 4.1. Componentes Glandulares
- 4.2. Pelo
- 4.3. Uñas
- 4.4. Vascularización Cutánea
- 4.5. Inervación cutánea

4.1. Componentes glandulares

4.1.1. *Glándulas sudoríparas ecrinas*

- Se localizan en la dermis
- Tienen aspecto tubular
- Desembocan a través de una abertura o un poro situado en el estrato córneo
- Tienen una función termorreguladora importante

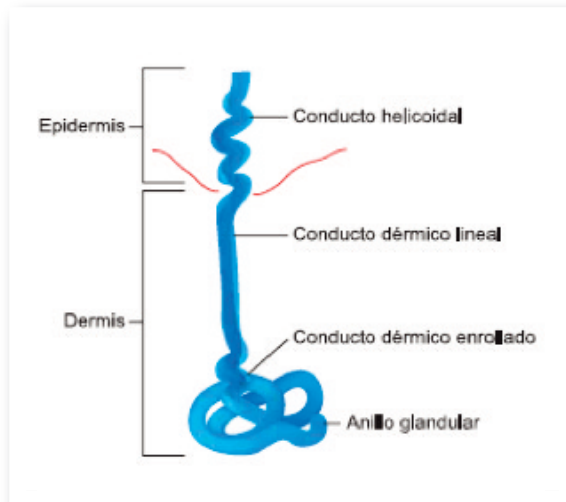


Figura 5. Glándula sudorípara ecrina (Pons, 2004)

4.1.2. Glándulas sudoríparas apocrinas

- También son tubulares
- Desembocan en el conducto de un folículo piloso

El sudor es inodoro siendo la flora saprófita la responsable del mal olor corporal.

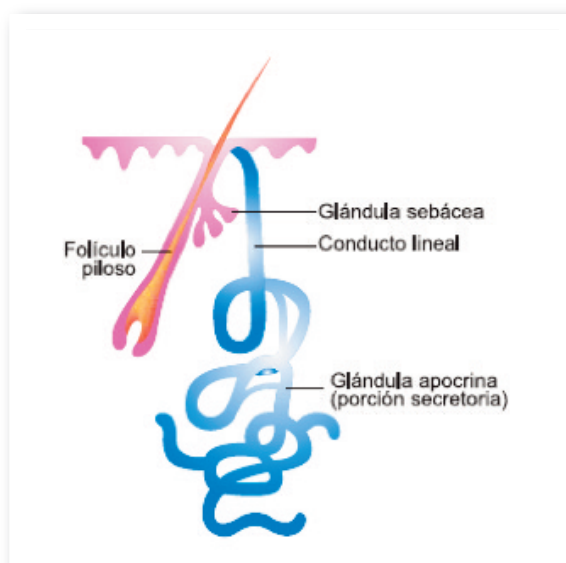


Figura 5. Glándula sudorípara apocrina (Pons, 2004)

4.1.3 Glándulas sebáceas

- Presentes en todo el tejido cutáneo
- Coincidente con las zonas cutáneas de las que emergen cabellos o vello
- La secreción sebácea sufre cambios importantes cualitativos y cuantitativos a lo largo de la vida

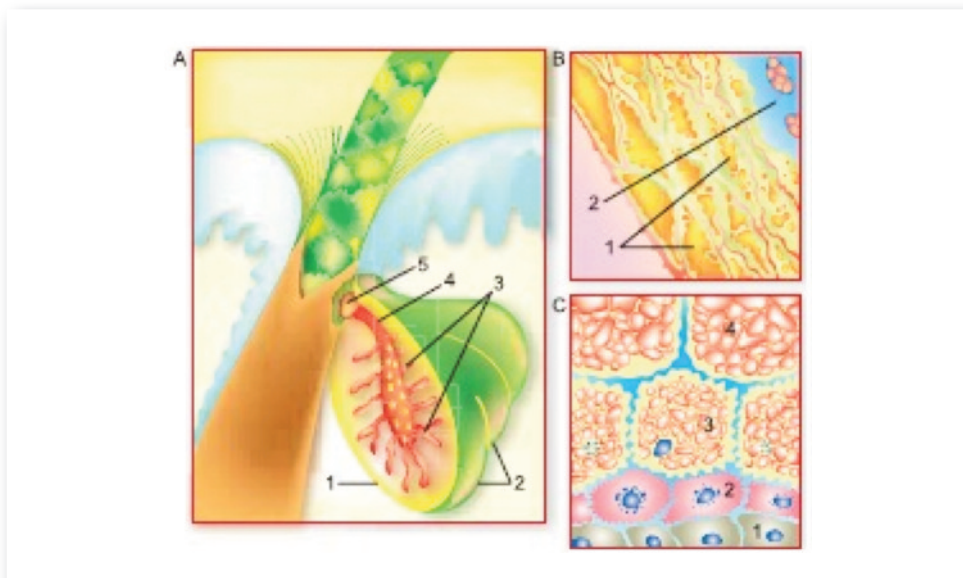


Figura 4. Célula de Langerhans (Pons, 2004)

A: Folículo piloso: 1. Glándula sebácea; 2. Lóbulos; 3. Conductos sebáceos de los lóbulos; 4. Conducto sebáceo de la glándula; 5. Abertura de secreción en el folículo. B: Estructura de la pared del poro de secreción: 1. Corneocitos con vacuolas lipídicas; 2. Células granulosas. C: Células del lóbulo sebáceo: 1. Células basales proliferantes; 2. Células sebáceas en proceso de diferenciación; 3. Células sebáceas con pequeñas vacuolas lipídicas; 4. Células sebáceas con grandes vacuolas lipídicas.

4.2. Pelos

Cada pelo está formado por una masa de células queratinizadas, compacta y cementada, producida por el folículo piloso, que es una introducción de la epidermis dentro de la dermis. Cada folículo posee aporte sanguíneo y nervioso importante y se comporta de forma diferente a las restantes estructuras epidérmicas, ya que realiza su actividad cumpliendo unos ciclos, que son los ciclos de crecimiento capilar:

- Fase de crecimiento: anagénica
- Fase de involución: catagénica
- Fase de reposo: telogénica

El periodo para que un folículo finalice el ciclo completo, puede ser muy variable, pero oscila entre los 3 y 7 años para un cabello del cuero cabelludo.

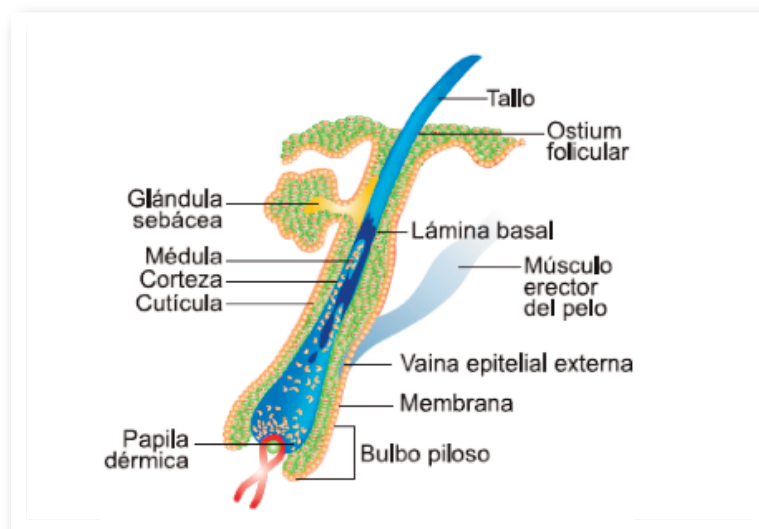


Figura 8. Estructura de un folículo pilosebáceo terminal (Pons, 2004)

Epidermis: A: estrato córneo; B: granulosa; C: glándula sebácea; D: dermis; E: músculo erector; T: tallo (corteza); M: médula. H: hipodermis y vasos.

4.3. Uñas

La uña es una estructura de queratina dura, que se diferencia de la epidermis en que no sufre descamación y con el cabello, en que no sufre el crecimiento cíclico.

Por la composición química, con escasos lípidos (0,6% en peso, que contrastan con el 10% presentes en el estrato córneo), la permeabilidad acuosa de la uña es muy elevada, ya que es 10 veces superior a la que posee el estrato córneo.

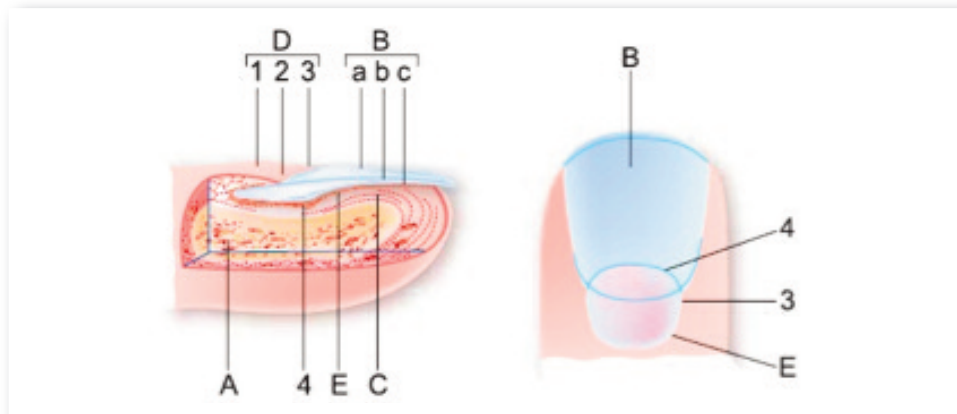


Figura 9. Uña (Pons, 2004)

A: Hueso. B: Lámina de la uña: a. Capa dorsal; b. Capa intermedia; c. Capa ventral. C: Lecho epidérmico. D: Repliegue cutáneo ungual: 1. Cara dorsal; 2. Cara ventral; 3. Cutícula. E: Matrix proliferante; 4. Lúnula.

4.4. Vascularización cutánea

La actividad metabólica el tejido cutáneo es muy intensa y necesita un correcto aporte sanguíneo, de ahí que exista una compleja irrigación vascular. El tejido cutáneo de un adulto tiene una superficie de casi 2 m² y se encuentra perfectamente vascularizado a nivel del tejido conjuntivo.

4.5. Inervación cutánea

El tejido nervioso desarrolla su función en el tejido cutáneo de forma altamente especializada. Así, las numerosas estructuras especializadas presentes en la piel, son capaces de actuar ante estímulos concretos del medio externo y originar una respuesta del organismo ante él.



B. EL SOL Y SUS EFECTOS SOBRE LA PIEL

Desde que el hombre apareció sobre la tierra, tuvo conciencia de la gran importancia del Sol en su entorno, y al sentirse atraído por esta "gran bola de fuego", lo reverenció en distintas formas. Desde los tiempos más remotos, se consideraba al Sol como fuente de vida o Dios principal, es lo que algunos antropólogos han denominado Teología Solar. Antiguo Egipto, Mesopotamia, Grecia, Roma, Persia, India, China y las civilizaciones Precolombinas ofrecieron culto al Sol simbolizándolo en diferentes divinidades que ponían de manifiesto su importancia vivificadora. El faraón Amenhotep IV (1379 – 1372 a.C.) instauró un culto monoteísta al Sol, apartando a todos los demás dioses existentes en aquel momento. Como consecuencia de ello, cambió su nombre y se llamó a sí mismo Akhenaton (el que sirve a Aton, el Sol).

Otro ejemplo de esa teocracia solar corresponde al dios Mitra de los persas (Sol invicto), que fue incorporado por los romanos y del que podemos encontrar templos o mitrarios en numerosos lugares, sobre todo en Roma. La religión mitraica fue el principal competidor del Cristianismo en los primeros tiempos. Los griegos tenían dos divinidades que representaban al sol, Helios y Apolo, éste último, padre de Esculapio, dios de la Medicina. También hay ejemplos de ritos de la adoración al sol entre los incas, los aztecas y los bramanes de la India (*Abad, 1999*).

La humanidad le debe al sol la luz, la energía, el calor, en definitiva, la vida: sin él no tendría lugar la fotosíntesis de la que dependen

las plantas y los humanos no podrían, por ejemplo, fijar el calcio en los huesos o sintetizar la vitamina D en la piel. El sol está presente continuamente en nuestro entorno: rige las horas, los días, las estaciones... e incluso influye en nuestro estado de ánimo.

Sin embargo, con los beneficios del sol también se conocieron rápidamente sus inconvenientes (Müller, 1997). Así, los egipcios se protegían del sol con un cucurucho colocado sobre la cabeza que contenía sebo y mirra y que, al fundirse por el calor, se derramaba por la cabeza y por el cuerpo, protegiendo a la piel.

Los hipocráticos consideraban la **helioterapia** como un remedio para consolidar las fracturas (es decir como un precursor de la vitamina D), pero también era útil para tratar otros males como la hidropesía, la ciática, la elefantiasis, el asma y otros males del riñón o del útero. Durante la Edad Media, Avicena fue un defensor de las propiedades curativas del Sol y de los baños en general. Existe una innumerable lista de remedios para las quemaduras solares, a base de aceites, sebo, mirra, heliotropo, vinagre, etc. Estos serían los primeros filtros solares de protección.

Con respecto al color de la piel, actualmente se asocia el bronceado con un estado de salud y bienestar social que no coincide con los cánones de belleza de siglos atrás. La pigmentación cutánea, según Nordlund (1998), tiene una gran variedad de funciones en los sistemas biológicos, que van desde las protectoras a cosméticas, incluso sociales en la especie humana, al tiempo que sirven de camuflaje para otras especies como os reptiles, aves y peces.

Durante los últimos 25 siglos, la piel blanca ha sido símbolo de belleza entre las poblaciones del hemisferio norte. Ya en la Biblia hay múltiples referencias en este sentido y hasta el siglo XVI los conocimientos del



color de la piel se basaban en los mitos del mundo antiguo (*Vicente, 1999*).

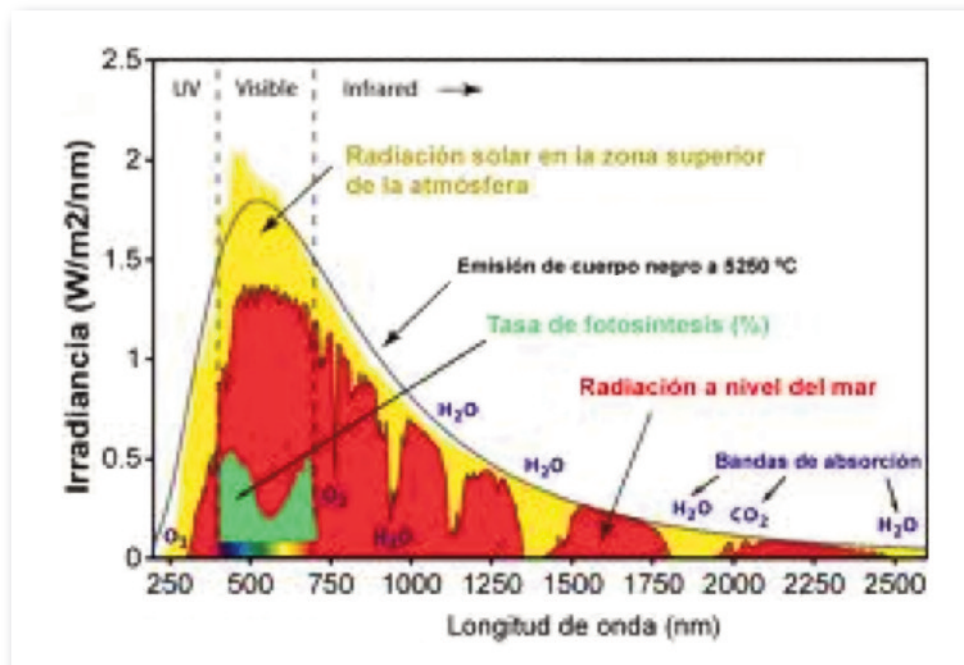
Los mitos del mundo antiguo condicionaron el conocimiento que se tenía sobre el color de la piel y existían dos teorías: la raza negra se explicaba por el efecto del calor y el sol en sus países, aunque también había otra teoría que basaba la tez blanca en un origen divino, como descendientes de Noé según el Génesis.

Dichas teorías fueron cuestionadas a partir del descubrimiento de América, cuando observaron individuos de color cobrizo; fue a partir del siglo XVI, cuando se lograron nuevos métodos de disección de la piel. En 1543, Vesalio logró separar la piel en dos capas mediante quemaduras, aunque fue Jean Riolan quien consiguió realizar un estudio exhaustivo de la piel negra: mediante abrasión de la piel con una sustancia química, obtuvo dos capas al originar una ampolla cuyo techo (cutícula), estaba pigmentado, mientras que la base (cutis) estaba blanquecina. Este hecho reforzó la idea de que el sol era la causa más importante de la coloración cutánea (*Vicente, 1999*).

Pero fue a partir de 1840, cuando el microscopio permitió conocer la estructura celular y las funciones de la piel y de la pigmentación cutánea (*Holubar, 1998*).

a. Radiación Solar

La radiación solar llega a la tierra en forma de emisiones electromagnéticas. El espectro solar está formado por radiaciones de distinta longitud de onda, cuya energía es inversamente proporcional a su longitud de onda. (Sánchez-Saldaña, 2002)



■ **Figura 10. Espectro de la radiación solar (A. Rohde, 2007)**

La radiación ultravioleta comprende aproximadamente el 5-10% de toda la energía del espectro solar, la luz visible el 50% y la infrarroja cerca del 40%. Estos porcentajes, sin embargo, varían de acuerdo con la presencia de una serie de factores como la latitud, la altitud, la capa de nubes, la polución, la concentración de la capa de ozono, la estación del año y el ángulo del cenit solar, que varía según las horas del día.

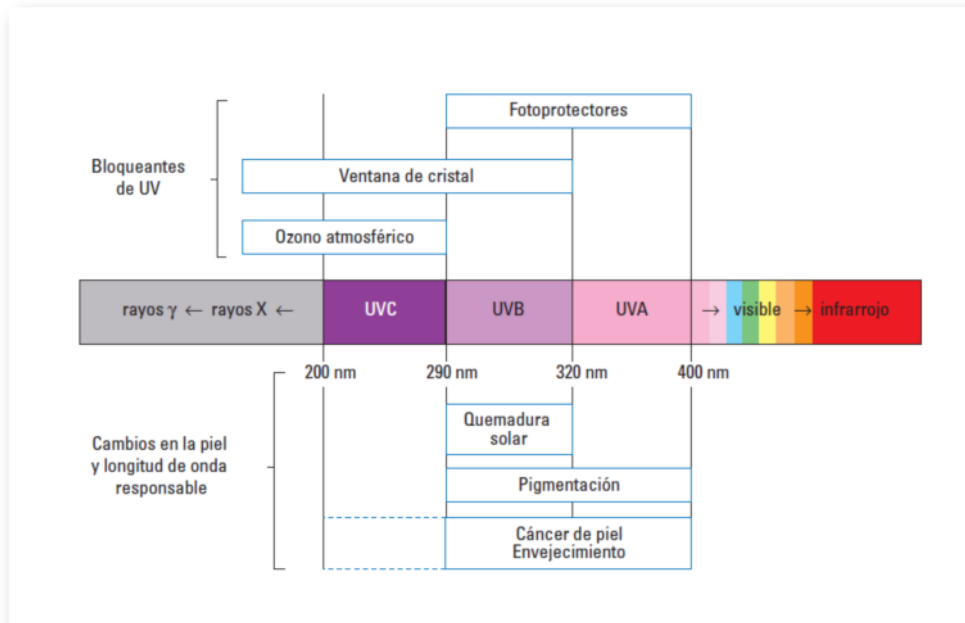


Figura 11. Espectro de emisión solar (Montero, 2008)

Las radiaciones UV que llegan a la superficie terrestre suponen un 7% del total de radiaciones. De ellas, un 6,7% son UVA y un 0,3% UVB. La radiación UVC es absorbida en su totalidad por la capa de ozono. (Montero, 2008)

Las radiaciones UV se subdividen en:

- UVA (320-400 nm), que a su vez se divide en:
 - UVA I (340-400 nm).
 - UVA II (320-340 nm).
- UVB (290-320 nm).
- UVC (100-290 nm)

La siguiente tabla, resume las características de las distintas radiaciones que compone el espectro solar (Honeyman, 2002):

Radiación		Longitud de Onda nm	Energía Kcal/Einstein
Infra rojo	Lejano	10.000 (10 micrometros)	2.86
	Cercano	1.000 (1 mcm)	28.60
Luz Visible	Rojo	700	40.8
	Anaranjado	620	46.1
	Verde	530	49.3
	Azul	470	60.8
Ultravioleta	UV-A 1	340-400	68.1-89.4
	UV-A 2	320-340	68.1-89.4
	UV-B	290-320	89.4-102.1
	UV-C	<290	>102.1

Tabla 2. Características de las radiaciones del espectro solar. (Montero, 2008)

El límite entre las diferentes partes del espectro ultravioleta ha sido determinado de la siguiente forma:

- El límite inferior de la radiación UV a 200 nm corresponde al límite de la acción ionizante sobre las moléculas.
- El límite entre UVC y UVB se sitúa según el límite de su presencia en la radiación solar a nivel de la superficie terrestre.
- El límite entre UVB y UVA se corresponde al límite de absorción de los ácidos nucleicos.
- El límite entre UVA y visible corresponde a la iniciación de las reacciones fotoquímicas en la retina ocular con la visión de los colores.

- Las diferentes bandas de la radiación visible se corresponden a los distintos colores del espectro. (Montero, 2008)

Dentro de la **radiación ultravioleta**, las distintas bandas de emisión tienen características y efectos distintos (Montero, 2008):

- **Banda UV-A (320-400 nm)**: Se denomina también región de onda larga o cercana a la infrarroja. Tiene bajo poder eritematógico, pero al mismo tiempo, posee mayor capacidad de penetración en la piel, pudiendo llegar hasta la dermis. Es la responsable de la pigmentación directa de la piel, ya que actúa oxidando la melanina, produciendo la reacción de bronceado inmediato y tardío de la piel, con o sin eritema. Asimismo, se le atribuye el fotoenvejecimiento, la fotosensibilidad cutánea y la inmunosupresión. La franja UVA I es menos eritematogénica y melanogénica que la franja UVA II. Esta última tiene efectos similares a la radiación UVB con respecto a la inducción de reacción de quemadura solar, pigmentación y proliferación de melanocitos. Esta banda se encuentra, asimismo, en fuentes de luz artificial como las lámparas de vapor de mercurio y los fluorescentes. Estos últimos se utilizan para fototerapia y fotoquimioterapia y tienen la capacidad de atravesar los cristales.
- **Banda UV-B (290-320 nm)**: La banda UVB es conocida también como radiación de quemadura solar. A dosis moderadas estimula la formación de vitamina D, pero también causa eritema solar y desencadena la verdadera pigmentación de la piel con formación de melanina o melanogénesis. Origina engrosamiento del estrato córneo, disminución de la capacidad del sistema inmunológico y cáncer cutáneo. A nivel ocular produce irritación de la conjuntiva y la córnea. Está presente en fuentes artificiales de luz como las lámparas de vapor de mercurio. Es filtrada por el cristal, pero no por el cristal de cuarzo ni el agua.

- **Banda UV-C (100-290 nm):** son las de menor longitud de onda. La banda UVC se denomina también radiación germicida. Están presentes sólo a gran altitud, pues afortunadamente son absorbidas por la capa de ozono, ya que tienen poder germicida y son letales para todos los seres vivos. Es eritematogénica, mutágena y carcinogénica en animales de experimentación. Pero al ser absorbida totalmente por la capa de ozono y filtrada por el oxígeno no llega a la superficie terrestre. Sin embargo, se produce artificialmente y se encuentra en las lámparas de xenón y las de vapor de mercurio. Por su poder germicida se utiliza en la esterilización bacteriana del aire. El personal que está en contacto con esta longitud de onda debe usar gafas de protección porque produce irritación de la conjuntiva y la córnea. Provoca eritema visible en la piel después de 6 horas, y el bronceado que produce es suave. Estas radiaciones son bloqueadas por el cristal de las ventanas.

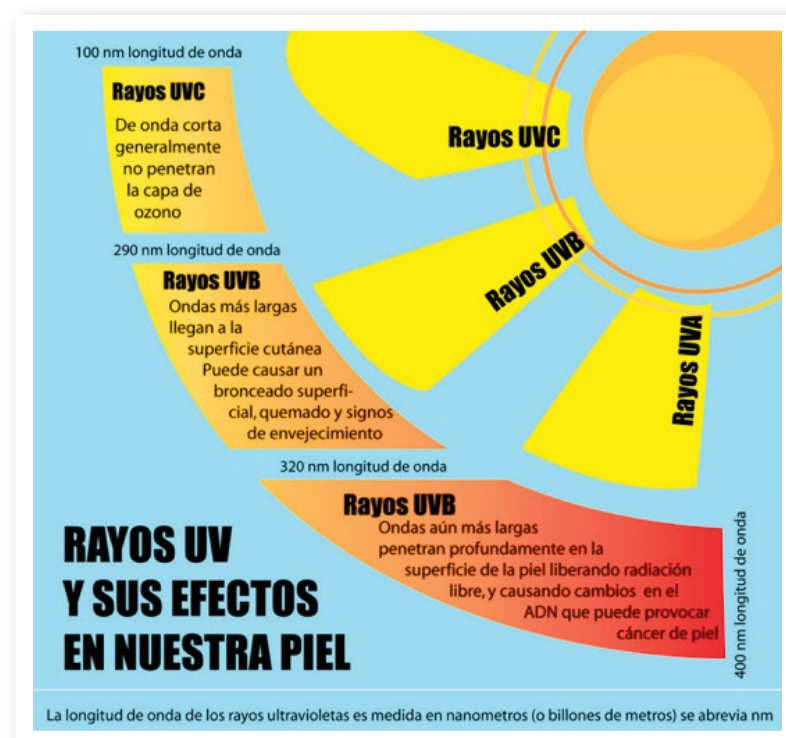


Figura 12. Efectos de los Rayos Ultravioleta sobre la piel humana



Los **infrarrojos** son las radiaciones del espectro solar responsables del efecto calórico del Sol, que además aumentan la capacidad eritemática de los UV.

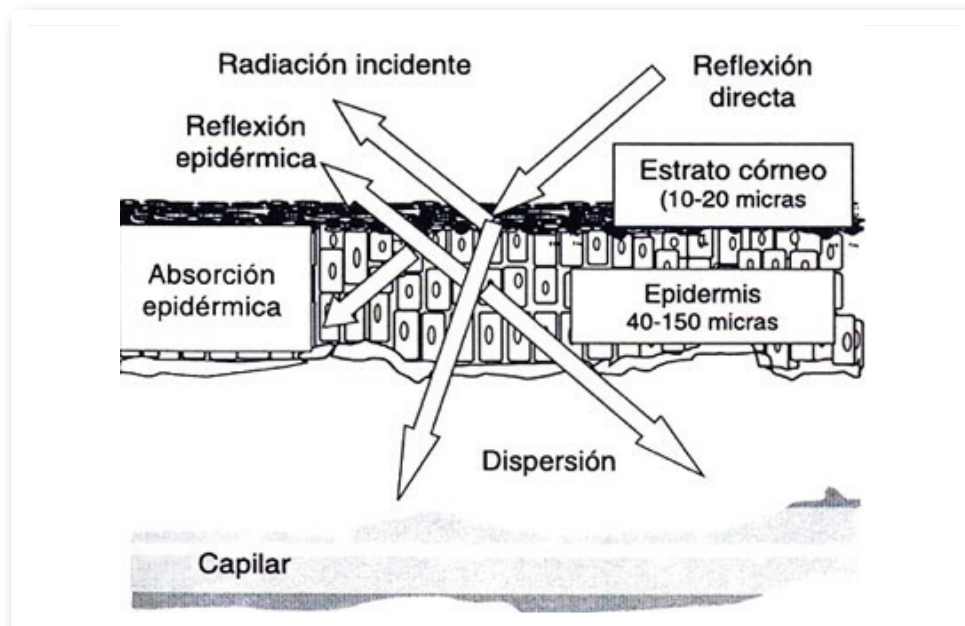
La luz solar produce daño cutáneo porque las radiaciones ultravioletas (UV) son absorbidas por el ADN, ARN, proteínas, lípidos de las membranas y organelas celulares presentes en la epidermis y dermis, incluyendo el sistema vascular. Estos efectos de las radiaciones solares son acumulativos y dosis-dependiente, que estarán en relación con la duración, frecuencia y calidad e intensidad de la radiación y conducen, como efecto inmediato, a la liberación de mediadores inflamatorios como la histamina, prostaglandinas y citocinas que causan la inflamación y como efecto tardío cáncer de piel (*Sánchez-Saldaña, 2002*).

Los UVB causan mutaciones en los oncogenes y genes supresores de tumores que llevan al cáncer de piel: carcinomas basocelulares y espinocelulares; los UVA originan daño en el ADN mediante una reacción de fotosensibilidad que produce alteraciones cromosómicas, lo que daría lugar a citotoxicidad y carcinogénesis que actualmente se consideran la causa mas importante de la presentación del melanoma, como ha sido demostrado en modelos animales y cultivo de células cutáneas humanas (*Camacho, 2001*).

La piel y los ojos son los órganos que están expuestos de modo principal a las radiaciones. Existen diversos factores que participan en la captación de dichas radiaciones, pues al llegar a la piel, dicha radiación puede sufrir **4 procesos ópticos (fig. 13)**:

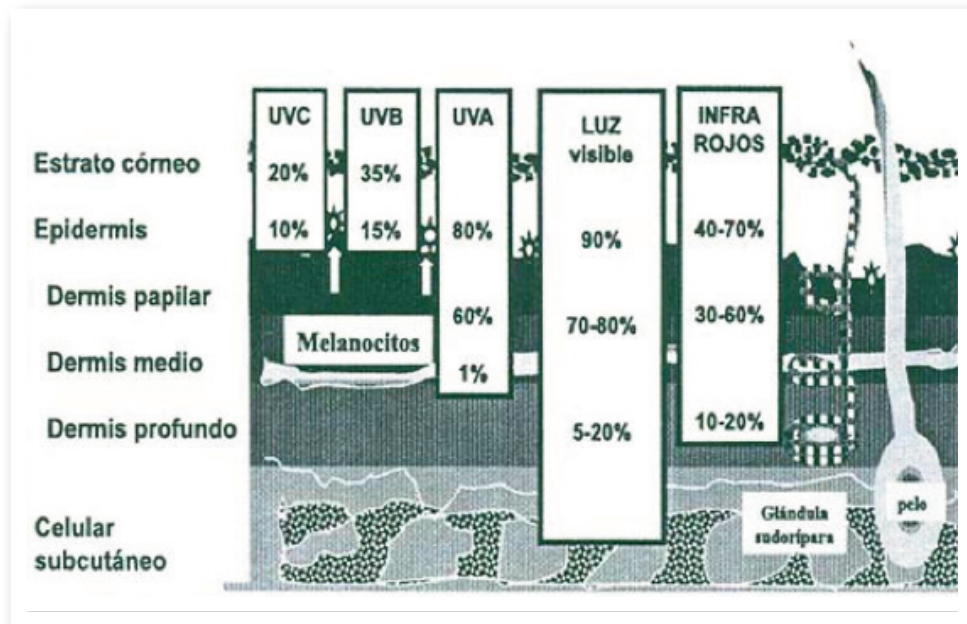
1. **Reflexión** directa y epidérmica.
2. **Dispersión** en los diferentes tejidos y células de la piel.
3. **Transmisión** directa.

4. **Absorción:** Sólo la radiación absorbida es capaz de iniciar cambios fotoquímicos que culminen en respuestas fotobiológicas.



■ **Figura 13. Captación de la radiación solar por la piel**
(Honeyman, 2002)

A su vez, cada radiación tiene un nivel de penetración diferente en su contacto con la piel humana (fig. 14):



■ **Figura 13. Nivel de penetración de las radiaciones solares (Honeyman, 2002)**

La raza humana, a lo largo de la evolución ha ido desarrollando diferentes mecanismos para adaptarse al medio ambiente. Así la piel cuenta con complejos **sistemas fisiológicos de protección** entre los que destacan:

1. **Melanogénesis:** es el proceso de síntesis y distribución de las melaninas (eumelanina y feomelanina) responsables del color de la piel y del cabello. Este proceso está regulado por diferentes factores como la radiación UV, estímulos hormonales y factores hereditarios. La eumelanina es un filtro activo contra la radiación UV, pero no así la feomelanina, característica de los pelirrojos, que no es fotoprotectora.

2. **Hiperqueratosis:** consiste en un engrosamiento de la epidermis que se produce como respuesta retardada de la epidermis ante la agresión solar. Además esta acción protectora se completa con la de los lípidos de superficie y el ácido urocánico presente en la secreción sudoral, que actúa como filtro fisiológico.
3. **Protección contra radicales libres:** el organismo cuenta con diferentes mecanismos de protección contra estas moléculas que son capaces de iniciar reacciones fotoquímicas y producir deterioro celular. Éstos son: sistemas enzimáticos, sistemas de reparación de DNA y sustancias captadoras de radicales libres como vitaminas u oligoelementos.
4. **Secreción de sudor,** que contiene ácido urocánico, con probadas características fotoprotectoras.

La gran variedad individual de la especie humana es la responsable de que no todos respondamos de igual forma ante la agresión solar, ya que los mecanismos intrínsecos de protección no son idénticos. El dermatólogo norteamericano Fitzpatrick (1975), definió **seis fototipos cutáneos** (Tabla 3), que hoy son universalmente admitidos (Honeyman, 2002).

Diversos factores genéticos son los responsables de que no todas las personas compartan los mismos riesgos de padecer cáncer de piel y las diferentes alteraciones agudas y crónicas producidas por las radiaciones solares. Es decir, que cada individuo responderá de una manera diferente ante las reacciones biológicas (eritema, quemadura solar, pigmentación, etc.) dependiendo de factores propios, como el tipo de piel y el color de la misma; y será independiente de la cantidad de energía emitida por la luz solar o fuentes artificiales (Montero, 2004).

Fototipo	Quemaduras	Bronceado	Color Piel	Grupos de individuos, etnias
I	Siempre	No	Muy blanca	Pecosos, pelirrojos, celtas
II	Muy fácilmente	Mínimo	Blanca	Nórdico europeo y centroeuropeo
III	Fácilmente	Gradual	Lig. morena	Cabello rubio/moreno
IV	Ocasionalmente	Sí	Morena	Latinos
V	Raramente	Intenso y rápido	Muy morena	Árabes, asiáticos, indios
VI	Nunca	Máximo	Negra	Negros

Tabla 3. Clasificación de los fototipos según Thomas Fitzpatrick, 1975 (Harvard Medical School)

La utilidad de clasificar a los individuos en estos seis fototipos, permite la estimación del riesgo relativo de desarrollo de alteraciones agudas y crónicas por efecto de la exposición a la radiación UV.

Montero (2008), resume las principales características de los distintos fototipos del siguiente modo:

- Los **fototipos I y II** corresponden a personas que en general presentan piel clara, con cabellos rubios o pelirrojos, ojos de color azul o avellana, con pecas (efélides) o sin ellas. Este grupo es considerado “melanocitocomprometido”. Por sus características, deben utilizar fotoprotección y evitar exposiciones solares intensas desde edad muy temprana y a lo largo de toda la vida.
- Los **fototipos III y IV** también pertenecen al grupo de población blanca o son muy ligeramente pigmentados. Son considerados

“melanocitocompetentes”; es decir, que gracias a la pigmentación constitucional o adquirida (bronceado) presentan una protección adecuada frente a los efectos perjudiciales de la radiación solar en situaciones de irradiación normal, pero su susceptibilidad al daño agudo y crónico dependerá de los hábitos de exposición solar y la latitud geográfica donde vivan.

- Los **fototipos V y VI** generan un denso filtro protector de melanina al exponerse a las radiaciones UV. Son “melanocitocompetentes” y los cambios de fotoenvejecimiento se manifiestan a partir de los 40-50 años de edad.

La tabla 4 completa las características de los fototipos cutáneos y los clasifica en función de su **reactividad a la radiación solar**:

Fototipo Cutáneo	Color natural de la piel	Sensibilidad a RUV	Quemadura Solar	Bronceado	Fotoenvejecimiento	Riesgo de cáncer de piel
I	Blanca pálida	Muy sensible	Se quema con facilidad	Nunca	Intenso, inicio temprano	Alto
II	Blanca	Muy sensible	Se quema moderadamente	Mínimo	Intenso, inicio temprano	Alto
III	Blanca	Bastante sensible	Se quema minimamente	Moderado	Moderado a intenso	Moderado
IV	Beige, leve pigmentación	Moderada	Se quema minimamente	Moderado	Moderado	Bajo
V	Morena moderada	Mínima	Rara vez se quema	Intenso marrón oscuro	Lento, gradual poco	Mínimo
VI	Morena oscura o negra	Poco	Nunca se quema	Intenso marrón oscuro-negro	Lento, gradual mínimo	Sin riesgo

Tabla 4. Clasificación de los Fototipos de piel y reactividad a la radiación solar (Montero, 2008)



La pigmentación cutánea, se debe a los melanocitos. Estos son muy escasos, se calcula que entre 1.000 y 2.000 melanocitos por m^2 de piel, lo que supone alrededor del 10% de las células epiteliales. Su masa total, que constituye el denominado sistema pigmentario melánico, pesa alrededor de 1,5 gramos pero están enormemente especializados, puesto que son los responsables últimos de la pigmentación de la piel, pelo y ojos (Quevedo, 1987).

El número de melanocitos es el mismo en todas las razas, lo que varía es la capacidad de sintetizar melanina y de transportarla a los queratinocitos adyacentes. El color de la piel va a depender, en su mayor parte, de la cantidad de melanina y su composición química (eumelanina, feomelanina, etc) y ésta a su vez, de un fenómeno de adaptación a las diferentes intensidades de las radiaciones ultravioleta ambientales (Vicente, 1999).

Por otro lado, la sensibilidad individual a la radiación UV se determina con la dosis eritematológica mínima (DEM, MED en inglés), que se define como la cantidad mínima de radiación capaz de inducir eritema en la piel de la persona estudiada. La exposición a radiaciones (flujo, dosis) se mide en julios o milijulios por centímetro cuadrado (J/cm^2). (Montero, 2004).

Para determinar en cada caso si la respuesta es normal, es necesario conocer cuál es la dosis mínima necesaria en condiciones normales para los diferentes fototipos de piel y así poder comparar (Tabla 6). Este método también se emplea para evaluar la eficacia de los protectores solares.

Existe una reserva biológica protectora individual frente al Sol, la cual disminuye a la mitad por exposiciones solares en la infancia y adolescencia. Esta reserva representa una adaptación individual determinada genéticamente para defenderse de las radiaciones solares, en especial de las radiaciones UV.

Fototipo de piel	Dosis de Eritema	
	UVA (320-400 nm)	UVB (290-320 nm)
	MED (mJ/cm ²)	MED (J/cm ²)
I	20-30	20-30
II	30-45	25-35
III	40-55	30-55
IV	50-80	45-60
V	70-100	60-80
VI	> 100	80-200

Tabla 5. Respuesta eritematosa según el fototipo cutáneo (Montero, 2008)

b. Efectos de la radiación ultravioleta sobre el organismo

Las radiaciones UV originan efectos beneficiosos y perjudiciales cuando inciden sobre el organismo. Entre los **beneficiosos** encontramos la mejoría en problemas dermatológicos, como el acné y la psoriasis y también el proceso fotoquímico de la síntesis de vitamina D.

Los **efectos perjudiciales**, dependen de numerosos factores individuales y ambientales, pero los más importantes son los siguientes (Montero, 2008):

1. Efectos agudos (quemadura solar, bronceado).
2. Efectos crónicos (fotoenvejecimiento o dermatoheliosis, desarrollo de lesiones premalignas o malignas).
3. Alteraciones inmunitarias (inmunosupresión cutánea y sistémica).
4. Daño fotoquímico ocular (cataratas, degeneración macular).

- 
-
5. Reacciones de fototoxicidad, fotoalergia, brotes de urticaria, desencadenamiento o agravamiento de enfermedades.

Para que las reacciones fotobiológicas se produzcan es necesaria la absorción de los rayos UV por moléculas específicas llamadas cromóforos. En la piel se encuentran como cromóforos el ADN, ARN, melanina, lípidos y proteínas que absorben diferentes longitudes de onda específicas y que posteriormente se liberarán, produciéndose reacciones fotoquímicas a través de un daño directo o un daño oxidativo indirecto. Este daño celular da lugar a la liberación de citocinas y mediadores inflamatorios, que modulan el comportamiento de una serie de tipos celulares (queratinocitos, células de Langerhans, fibroblastos, etc.) y que participarán en los cambios observados por acción de las radiaciones UV (*Montero, 2008*).

1. Efectos agudos: eritema – quemadura solar

La quemadura solar es la respuesta cutánea aguda más evidente y conocida por exposición a las radiaciones UV. Se acompaña de rubor, calor, dolor y tumefacción y se manifiesta principalmente en individuos de fototipos I a III. El mecanismo no está bien establecido; no se conoce con precisión cuáles son los cromóforos responsables, pero la hipótesis del daño directo de los UVB y UVA de onda corta sobre el ADN se sumaría al daño oxidativo indirecto secundario a las reacciones endógenas de fotosensibilidad.

2. Efectos agudos: bronceado

La pigmentación inmediata o bronceado inmediato se presenta pocos minutos después de la exposición y se caracteriza por ser de un

color más grisáceo que el bronceado tardío. Esta pigmentación tiende a desvanecerse en minutos; pero si la exposición es continua y prolongada, puede durar varios días y se combina con el bronceado tardío. Este bronceado sería consecuencia de longitudes de onda comprendidas entre los 320 y 450 nm, que corresponderían a UVB de onda larga, UVA y luz visible. Los cambios histológicos observados involucran la oxidación de la melanina existente y la redistribución de los melanosomas melanocíticos, desde una posición perinuclear al interior de las dendritas periféricas y luego, al citoplasma de los queratinocitos, con una disposición en casquete a nivel perinuclear.

La pigmentación o bronceado tardío se hace visible 72 horas después de la exposición a UVB, y perdura durante días o semanas. En los individuos de piel clara, los UVB inducen más eritema que bronceado, a diferencia de los UVA. Se asocia con aumento en la actividad y número de los melanocitos.

La idea de que los rayos UVA ejercen un efecto protector con respecto a los rayos UVB es errónea, ya que existe evidencia de que el uso de una onda larga de UVA, en dosis que provoca una pigmentación inmediata, aumenta el efecto eritematígeno de la radiación de onda corta y media (UVB y UVA) por suma o potenciación. Este efecto recibe el nombre de fotointensificación. Se piensa que este fenómeno, al incrementar la quemadura solar, favorece los efectos perjudiciales de las radiaciones UV, incluyendo la fotocarcinogénesis.

3. Efectos crónicos: fotoenvejecimiento

Los efectos a largo plazo de la exposición repetida a la luz ultravioleta son los factores ambientales que contribuyen al envejecimiento extrínseco o fotoenvejecimiento. El fotoenvejecimiento es un proceso



degenerativo multisistémico ,que afecta a la piel y el sistema de ayuda de la piel. Es un proceso acumulativo y depende principalmente del grado de exposición al Sol y pigmento de la piel. La epidermis y la dermis son afectados por los rayos UVB, pero la dermis también se ve afectada en gran medida por los rayos UVA. Se ha pensado durante mucho tiempo que la mayoría de las lesiones foto-inducidas en el hombre eran debidas a los rayos UVB, ahora se sabe que los rayos UVA juegan un papel fundamental en el fotoenvejecimiento. El fotoenvejecimiento afecta a las zonas expuestas al sol y se caracteriza clínicamente por arrugas finas y profundas, asperezas, sequedad, laxitud, teleangiectasias, pérdida de resistencia a la tracción y cambios en la pigmentación (Sjerobabski, 2008).

4. Efectos crónicos: fotocarcinogénesis

No se conoce con exactitud qué mecanismo es el encargado de la actividad tumoral. Se cree que existe un conjunto de factores extrínsecos (RUV) e intrínsecos de envejecimiento fisiológico que modifican la capacidad reparadora del ADN celular. La radiación UVB tiene la capacidad de dañar proteínas, ácidos nucleicos, etc., por lo que altera la capacidad reparadora del ADN a través de mutaciones de los genes que participan en los procesos de reparación celular; y, junto a la disminución de un 20-50% de las células de Langerhans, se pierde la capacidad de detectar y destruir células alteradas, permitiendo la progresión de procesos tumorales.

El uso de un fotoprotector de amplio espectro es capaz de proteger de la fotoinmunosupresión, evitando que la radiación UV dañe las células especializadas o células de Langerhans (Figura 15).

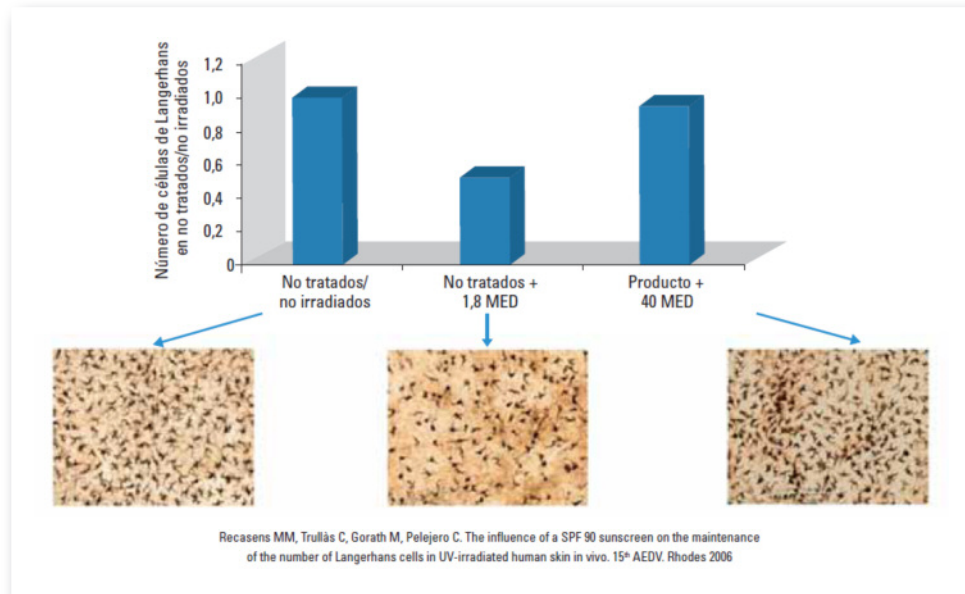


Figura 15. Influencia del empleo de un fotoprotector (FPS: 90) en el mantenimiento del número de células de Langerhans en piel humana irradiada con luz UV, in vivo.

Se ha observado que el 40% de la citotoxicidad solar corresponde a los UVB solamente, y que el 60% se debe a la acción conjunta de UVA y UVB, junto a otros factores carcinógenos. La acción de los UVA sobre el ADN se produce a través de productos intermedios reactivos al oxígeno: ROS (reactive oxygen species). Las longitudes de onda de hasta 315 nm causan daños en el ADN que son fácilmente reparables; las lesiones por longitudes de onda mayores a 345 nm son difíciles de reparar correctamente; y las longitudes de onda de entre 315 y 345 nm combinan ambos procesos. Numerosos estudios han demostrado que los rayos UVA, son responsables de los procesos de fotoenvejecimiento y además, tienen la capacidad de afectar genéticamente el ADN celular.



5. Alteraciones inmunológicas

Se ha observado que las radiaciones UV disminuyen el número de células de Langerhans; debido a esto, los macrófagos migrarían a la epidermis y cumplirían la función de célula presentadora de antígenos transitoria e inducirían células T supresoras. Éstas, junto a otros procesos inmunológicos, inhibirían las células Th-1, y esta disminución reforzaría la actividad de las células Th-2.

6. Daño fotoquímico ocular

La radiación lumínica puede producir efectos indeseables en numerosas estructuras oculares (Figura 4). Dentro de las más sensibles destacan el cristalino y la retina. Dichos efectos pueden ser agudos (queratitis, conjuntivitis) o crónicos (alteraciones sobre el cristalino y la retina).

c. Radiación Ultravioleta A vs B

La puvaterapia, es decir, el uso de la combinación de psoralenos orales más radiación ultravioleta A (PUVA) se introdujo en 1974 para el tratamiento de muchas enfermedades cutáneas, pero en especial para el tratamiento de la psoriasis extensa y de los linfomas cutáneos de células T. La pigmentación observada en los sujetos sometidos a esta terapia motivó la aparición de centros de bronceado con radiación UVA, para personas sin ninguna afección cutánea, sólo con finalidad cosmética. En

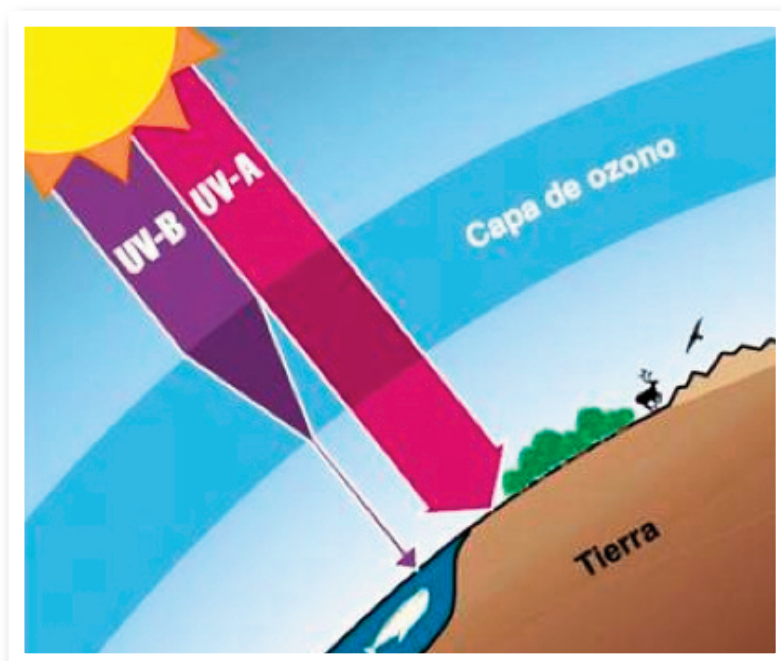
las últimas décadas, las lámparas UVA parecían la respuesta para aquellos segmentos de población que deseaban un bronceado rápido. Si bien en estos centros de bronceado UVA se insistía desde el principio en que no era nocivo para la piel, el paso de los años, la experiencia y los estudios practicados permiten poner en duda esta afirmación (*Torras, 2004*). Según Camacho (2001), hoy es ampliamente conocido que con tan sólo dos semanas de exposición a UVA artificiales, se producen las mismas alteraciones moleculares que en las personas con exposiciones frecuentes al sol, que indefectiblemente llevarán al desarrollo del cáncer de piel (*Whitmore, 2001*) e incluso melanomas (*Wang, 2001; Scherschun, 2001*). No hay "bronceado artificial seguro" puesto que, aunque las lámparas estuvieran intactas y no produjeran UV.B, 30 minutos de exposición a UV.A artificiales equivalen a todo un día expuestos al Sol de la playa, según Hanke (2000).

Pero existen además otras razones para la protección frente a los UV-A que son, según Camacho (2001):

- La cantidad de UVA que alcanza la capa basal epidérmica y la dermis es 20 veces mayor que la de UVB, ya que no se filtra por la capa de ozono de la estratosfera.
- Los UVA no se modifican por las condiciones ambientales.
- Como tienen mayor longitud de onda penetran más profundamente en la piel.
- No se bloquean, como los UV-B, por el cristal de las ventanas. Todo ello lleva a la seguridad de que los UV-A juegan un papel importante en el fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis

Se ha considerado que la radiación UVB es la única responsable del eritema por radiación ultravioleta (RUV). La radiación UVA también lo puede producir, pero se requiere una dosis de 500 a 1.000 veces superior. El eritema provocado por UVA es inmediato y máximo al final de la exposición; sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual se forma.

Para las radiaciones UVB y UVC, la forma de la acción espectro hace pensar que el ADN es el cromóforo mayor. Por tanto, el daño del ADN puede coincidir con el eritema. La radiación UVA penetra más profundamente que la radiación UVB, por lo que los cambios histológicos del eritema por UVA tienen lugar sobre todo en la dermis. La formación de "sunburn cells" es menos importante en el eritema por UVA que en el eritema por UVB y los cambios en la dermis consisten en un infiltrado perivascular mixto a veces con extravasación de eritrocitos.



■ **Figura 16. Radiación UV-A y B sobre la tierra**

Además del eritema, que aparece en un 22% de los pacientes, según algunos estudios, la radiación UVA procedente de los solárium puede producir otros efectos agudos como son prurito (27%), sequedad de la piel (15%) y náuseas (en un 4% de los casos). Además, muchas de las medicaciones que se toman habitualmente pueden producir reacciones fototóxicas y fotoalérgicas. La mayoría de las reacciones fototóxicas se activan en la banda UVA. También la radiación UVA puede exacerbar enfermedades fotosensibles como el lupus eritematoso sistémico, la erupción polimorfa lumínica (en un 10% de los casos), porfiria y rosácea y finalmente puede inducir la aparición de pseudoporfiria, la erupción polimorfa lumínica y elastólisis en la dermis media.

La fotoprotección adquirida tras repetidas exposiciones a la radiación UVB es debida a los cambios morfológicos que desarrolla la epidermis, caracterizados por una moderada hiperplasia epidérmica, hiperpigmentación de la capa basal que puede migrar a la epidermis, engrosamiento del estrato córneo y presencia de una gran número de sunburn cells. Por el contrario, la protección producida por la radiación UVA se limita a una pigmentación de la capa basal que unas veces es uniforme, otras irregular y discontinua, y en ocasiones, adopta un patrón lentiginoso. Es posible que esta pigmentación no uniforme sea uno de los motivos por los que la protección que proporciona la radiación UVA sea baja y, desde luego, mucho menor que la radiación UVB. Se ha comprobado que después de una exposición a la radiación UVA, si inmediatamente o al cabo de 3 horas se hace una exposición a la radiación UVB, no hay protección de la piel frente a la radiación UVB.

La radiación UVB es de 3 a 4 veces más eficaz que la radiación UVA para producir cáncer de piel. La cantidad de radiación UVA en la luz solar es de una a 2 veces mayor que la radiación UVB. Así pues, se desconoce el papel de la radiación UVA en la producción de tumores. Se sabe que la radiación UVA sola a grandes dosis puede inducir la aparición de tumores

en animales de laboratorio y es posible que, cuando se combina con la radiación UVB, pueda haber un efecto aditivo o aumentativo (Torras, 2004).

Por todo esto, se puede concluir que el bronceado con RUVA es nocivo para la piel, ya que tiene unos efectos dañinos variables en función del fototipo de la persona, del tipo de lámparas utilizadas, de la dosis y del ritmo de las sesiones, así como del número de sesiones acumuladas. El gobierno español reguló su utilización por los Centros de bronceado humanos, mediante el R.D. 1002 / 2002. Posteriormente la Agencia de Investigación del cáncer de la OMS, las incluyó en el grupo 1 de agentes carcinógenos (Lancet Oncol. 2009 (8):751-2).

La tabla 6 (Thomas, 2013) muestra las principales diferencias entre la radiación ultravioleta A y B:

Comparaciones	UVA (320 - 400nm)	UVB (290 - 320nm)
Niveles	Los niveles son constantes durante el año	Los niveles varía y se incrementan durante el año, al mediodía y en el ecuador.
Penetración	Penetra en la dermis inferior	La mayoría solo penetra en la epidermis
Niveles a través del cristal	Penetra el cristal	No penetra el cristal
Otros	El 95% de la RUV es UVA	Factor de protección solar (FPS) mide el bloqueo de UVB
Efectos sobre la piel	UVA (Daño acumulativo)	UVB
Nivel carcinogénesis	Puede ser causa importante de melanoma	Más cancerígeno que UVA
Cambios en la piel	- Broncean la piel (usados es estudios de bronceado) - Las arrugas, hiperpigmentación y otros efectos de envejecimiento observados en la piel	En el 85% quemadura solar
Efectos sistémicos	Inmunosupresión	Producción de Vitamina D
Otros efectos	- reacciones fototóxicas a medicamentos y productos químicos - Responsable de muchos fotodermatosis	

Tabla 6. Comparación RUVA vs RUVB (Thomas, 2013)

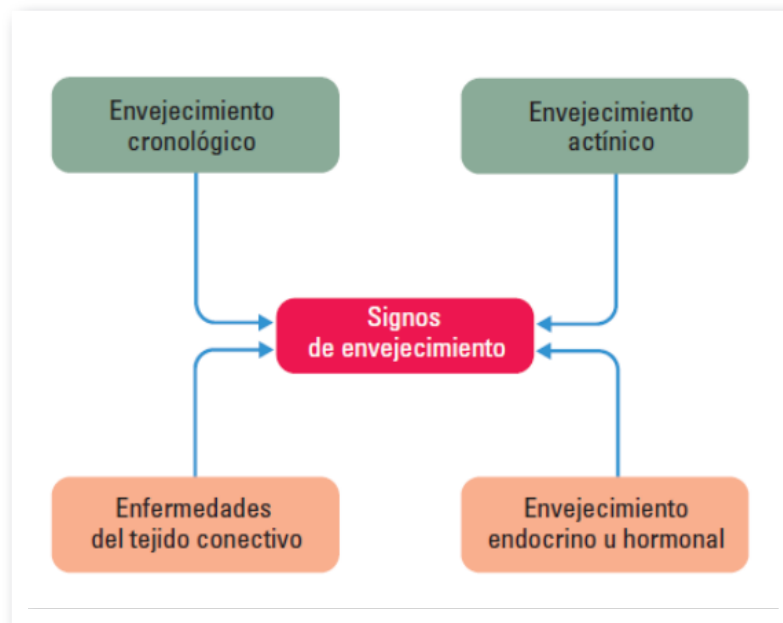
C. ENVEJECIMIENTO CUTÁNEO

Los seres humanos se hallan sometidos a un ciclo vital que afecta a la inmensa mayoría de los individuos. A lo largo del mismo se diferencian la gestación, el nacimiento, el desarrollo, la madurez y la senilidad, que finalizará con la muerte del individuo. Este ciclo vital es una realidad ineludible, en el cual el proceso de senilidad afecta a todo el organismo humano, con aparición de diversas enfermedades degenerativas, e incluye la alteración del metabolismo del tejido cutáneo, donde se manifiestan diversos problemas estéticos, una parte de los cuales son consecuencia de patologías dermatológicas.

Para muchas personas, la prolongación de la vida supone la aparición en su piel de señales del envejecimiento cada vez más inestéticas. La búsqueda de elementos que impidan o retrasen la aparición de estas señales es una constante en nuestra sociedad, y lo ha sido a lo largo de la historia (Pons, 2008).

Como el resto del organismo, la piel sufre envejecimiento con el paso del tiempo, el denominado envejecimiento cronológico o intrínseco, pero a diferencia de otros órganos también puede sufrir un envejecimiento extrínseco o fotoenvejecimiento. Este fotoenvejecimiento está ocasionado por la exposición solar y es de presentación más precoz que el anterior, así como de mayor gravedad puesto que es el responsable principal del cáncer cutáneo.

Al final de la vida, la piel será un reflejo del particular proceso de envejecimiento y sus causas.



■ **Figura 17. Factores que contribuyen a la aparición de los signos de envejecimiento (Pons, 2008)**

a. Envejecimiento cronológico o intrínseco

El **envejecimiento cronológico o intrínseco** es el que ocurre con el paso de los años en aquellas zonas que no han sido expuestas a la agresión ambiental. La piel envejecida que se ha protegido contra el Sol es delgada y menos elástica, pero, por lo demás, casi no presenta manchas y es muy suave. En realidad, este envejecimiento es un conjunto de cambios clínicos, histológicos y fisiológicos, consecuencia del paso del tiempo que afecta al recambio celular epidérmico, aclaramiento de varias sustancias de la dermis, grosor y celularidad de la propia dermis,

termorregulación, cicatrización, respuesta inmunológica, percepción sensorial, producción de las glándulas sebáceas y sudoríparas y síntesis de vitamina D. En general, en el envejecimiento cronológico o intrínseco se produce una alteración del metabolismo que se manifiesta por descenso de los procesos anabólicos e incremento de las actividades responsables del catabolismo (*Blanco, 2010*).

Existen diferentes teorías que permiten explicar este proceso del envejecimiento. Actualmente, junto a las teorías genéticas de acortamiento de los telómeros, la “Teoría de la intoxicación por sustancias intrínsecas” es una de las que mejor explica este proceso ineluctable. El acúmulo de sustancias tóxicas generadas por reacciones internas de nuestro organismo da lugar a alteraciones en el funcionamiento de los tejidos. Dentro de este tipo de reacciones endógenas, la glicación y la oxidación son las que más repercuten en el desarrollo y la amplificación del envejecimiento del organismo y, en consecuencia, en el proceso del envejecimiento cutáneo (*Prieto, 2010*).

A nivel de la piel, las consecuencias de la glicación son múltiples. La formación de los AGEs (Advanced Glycation End Products: Productos Finales de Glicación Avanzada) y la generación de especies reactivas deletéreas para el entorno celular y extracelular, da lugar a la alteración cualitativa de los tejidos dérmicos y la pérdida de funcionalidad de las fibras elásticas, fundamentalmente del colágeno y la elastina (*Suji, 2004*).

Como consecuencia, la piel pierde firmeza, elasticidad y movilidad del tejido de sostén dérmico, cuya consecuencia, a nivel superficial, es que aparecen y se agravan los signos clínicos del envejecimiento. Dado que la piel carece de la capacidad necesaria para contrarrestar los efectos de la contracción muscular, desaparecen las propiedades biomecánicas y resultado de ello es que las arrugas se acentúan y se marcan y se pierde la tonicidad de los tejidos (*Pageon, 2005*).



La formación de radicales libres está ampliamente aceptada como uno de los procesos que incide en el envejecimiento de la piel. El estrés oxidativo producido por los ROS (Reactive Oxygen Species: Especies Reactivas de Oxígeno) y otros radicales libres ataca los componentes vitales de las células, alterando las membranas celulares, las proteínas metabólicas e incluso en ADN celular (*Uribarri, 2007*).

Los radicales libres son moléculas altamente reactivas con un número impar de electrones que se generan fundamentalmente a partir de oxígeno; pueden dañar diversas estructuras celulares, tales como ADN, proteínas y membranas celulares. Además, los radicales libres pueden conducir a la inflamación, que parece desempeñar un papel adicional en envejecimiento de la piel.

La formación de radicales libres en nuestro organismo es constante y ligada a nuestra razón de existir, ya que el oxígeno es necesario para la vida. El cuerpo posee mecanismos endógenos de defensa, tales como enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa) y moléculas antioxidantes no enzimáticos (vitamina E, vitamina C, glutatión, ubiquinona) que lo protege de los radicales libres mediante la reducción y neutralización de los mismos. Algunos de estos mecanismos de defensa antioxidante pueden ser inhibidos por la radiación ultravioleta (UV).

No obstante, su formación excesiva depende de factores externos como el estrés, la fatiga, el ejercicio físico intenso, el tabaco, el alcohol, la contaminación atmosférica y las radiaciones solares. Los sistemas de defensa antioxidantes se ven desbordados, por lo que el estrés oxidativo fragiliza el sistema inmunitario, deteriora las estructuras celulares y conduce a la muerte celular, con lo que la piel pierde su capacidad de regeneración y el proceso de envejecimiento se instala y se amplifica (*Prieto, 2010*).

Los efectos dañinos de estas especies oxidativas son inducidos, internamente durante el metabolismo normal y externamente, a través de estrés oxidativo. La producción de los radicales libres se incrementa con la edad, al tiempo que los mecanismos de defensa intrínseca que lo contrarrestan, disminuyen. Este desequilibrio conduce a la lesión progresiva de las estructuras celulares y por lo tanto, da como resultado un envejecimiento acelerado.

En el envejecimiento cronológico de las zonas no expuestas a la agresión solar, el aspecto más destacado se centra en la evidente atrofia cutánea que afecta al tejido conjuntivo dérmico, empobrecido por el descenso de la síntesis de las macromoléculas y por la pérdida de las papilas dérmicas, y a la epidermis, adelgazada por su reducida capacidad de proliferación celular y por el descenso de la síntesis de queratinas y melaninas debido al escaso aporte nutricional y sanguíneo que reciben sus células.

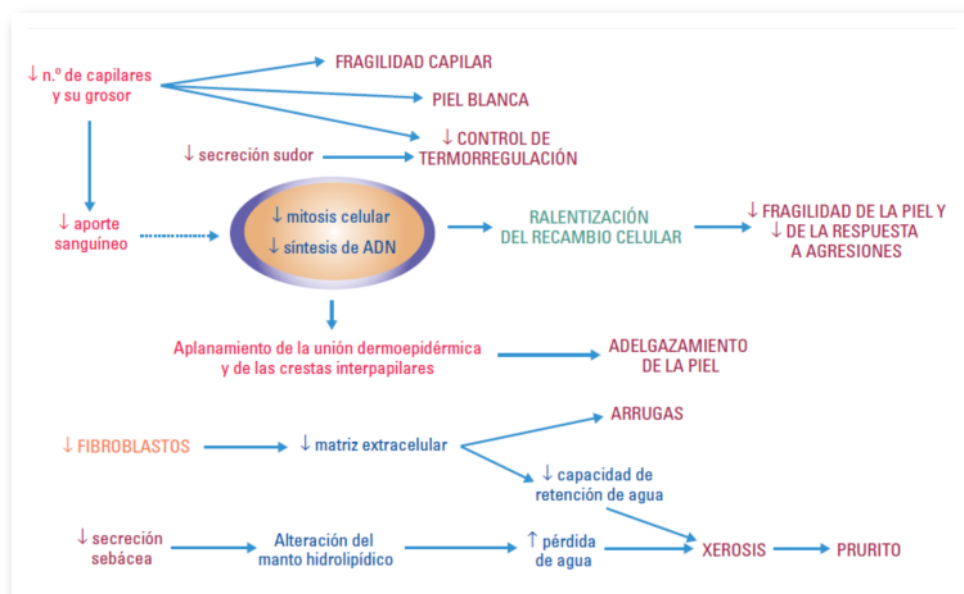


Figura 18. Renovación celular epidérmica durante el envejecimiento cutáneo (Pons, 2008)



A *nivel hipodérmico* se reduce el espesor del panículo adiposo y disminuye la vascularización, lo que comporta cierto grado de flacidez cutánea.

A *nivel dérmico* las alteraciones son muy diversas. La renovación celular de los fibroblastos decrece y simultáneamente disminuye su capacidad de síntesis. En consecuencia también se reduce el recambio de las macromoléculas que forman la matriz extracelular conjuntiva. Entre otros aspectos, se altera la polimerización de los glucosaminoglicanos, lo cual supone una pérdida de sus propiedades viscoelásticas.

En cuanto a las estructuras que componen la dermis, el colágeno representa el 80% del peso seco de la piel del adulto y gracias a su gran fuerza tensil, impide que la piel se rasgue por el estiramiento. Los 8 tipos de colágeno están compuestos por cadenas polipeptídicas. El colágeno más abundante en la piel es el tipo I (único detectado en el hueso). El siguiente en orden de frecuencia es el III y el IV es el principal componente estructural de las membranas basales y responsable de su estabilidad mecánica. Los cambios que se producen en el colágeno y su déficit se consideran las razones principales del envejecimiento cutáneo, por lo que se ha utilizado como marcador. Su cantidad y calidad está relacionada directamente con el grosor de la piel.

Parece ser que la glicosilación del colágeno puede estar implicada en la formación de enlaces transversales del mismo, dependiendo de la edad. Con el paso del tiempo, existe una disminución de la síntesis de colágeno y de enzimas implicadas en el procesamiento postraduccional del colágeno en la piel. Lo que varía no es la estructura del colágeno, de hecho la de un anciano no difiere mucho de la una persona joven, sino la cantidad. Además, la malla se puede ver alterada por el efecto de las agresiones mecánicas que se producen a lo largo de la vida. Al envejecer, el colágeno aumenta su estabilidad, pero disminuye

el espesor de la piel por reducción de células, como los fibroblastos, que son imprescindibles para la formación del colágeno.

El envejecimiento también produce una alteración en la elastina, que es la proteína elástica que representa el 5% de la dermis superior, lo que es la causa de las arrugas de la piel.

La *zona papilar* de la dermis altera su morfología, ya que disminuye de forma muy acusada el número de papilas, su profundidad y la vascularización. En consecuencia la unión dermoepidérmica se convierte en un plano, lo que da lugar a una excesiva movilidad de la epidermis, que coincide con un importante descenso del aporte nutricional y respiratorio que precisan las células epidérmicas.

A *nivel de la epidermis* este doble déficit provoca cambios importantes: se frena el “turn over” de las células basales (queratinocitos y melanocitos); los melanocitos pierden su capacidad de síntesis de melanina; las células de Langerhans reducen su función inmunitaria (disminuye la actividad ATPasa en los procesos dendríticos); en el estrato granuloso disminuye el número de gránulos de queratohialina y el número de cuerpos lamelares, responsables respectivamente de las proteínas y los lípidos funcionales que requieren las células del estrato córneo; los corneocitos pierden en parte su función de barrera y a la vez, sufren cierto grado de deshidratación y alteración de la cohesión intercelular. Como consecuencia, se produce descamación perceptible y pérdida de la capacidad tampón de la superficie cutánea.

Estas disfunciones también dependen de la disminución de la actividad glandular sebácea. Simultáneamente, se atrofia el folículo piloso provocando disminución del grosor de los pelos y del vello, que además están menos pigmentados (*Pons, 1995*).

Con la edad, se produce un adelgazamiento gradual de la piel y la atrofia. A partir de los 30 años, se inicia este proceso, que se intensifica entre los 40 y los 50, coincidiendo con la menopausia en las mujeres. En las zonas expuestas a una mayor radiación solar, los cambios son más marcados, pues el envejecimiento intrínseco se une al fotoenvejecimiento o envejecimiento extrínseco.

Estas alteraciones del envejecimiento pueden convertirse en patológicas, ya que se ocasiona un agotamiento de la inmunovigilancia, que favorece la anormal respuesta inmunológica. Mas del 60% de las personas con edad superior a los 65 años tienen una dermatosis que requiere tratamiento médico.

La tabla 7 (Glogau, 2009) resume los mecanismos y efectos del envejecimiento cutáneo:

ENVEJECIMIENTO CUTÁNEO		
Nivel	Mecanismo	Efecto
Hipodérmico	↓ el espesor del panículo adiposo y disminuye su vascularización	↑ flacidez cutánea
Dérmico	↓ renovación celular fibroblastos y su capacidad de síntesis.	se altera la polimerización de los glucosaminoglicanos, ↓ propiedades viscoelásticas.
Zona Papilar de la Dermis	↓ número de papilas, su profundidad y su vascularización	excesiva movilidad de la epidermis ↓ aporte nutricio y respiratorio de células epidérmicas
Epidermis	↓ turn-over células basales ↓ capacidad síntesis melanina ↓ inmunitaria C. Langerhans ↓ proteínas y lípidos funcionales corneocitos pierden parte función barrera Alipia Atrofia folículo piloso	Descamación ↓ capacidad tampón superficie cutánea. ↓ glándulas sebáceas ↓ grosor y pigmentación pelos y vello

Tabla 7. Envejecimiento cutáneo (Glogau, 2009)

a. Fotoenvejecimiento

El término “fotoenvejecimiento” hace referencia a la superposición del daño actínico al proceso normal del envejecimiento cutáneo. Es una de las secuelas crónicas de la exposición a las radiaciones ultravioletas y se caracteriza por sequedad de la piel con aparición de arrugas profundas, surcos cada vez más acentuados, pérdida de elasticidad, pigmentación moteada y telangiectasias, que representan cambios estructurales profundos de la dermis. Se ha especulado que, quizás hasta el 80% de los cambios inducidos en la piel por las radiaciones UV, ocurren durante los 20 primeros años de vida, a excepción de aquellas personas que por su profesión o estilo de vida, sufren una exposición intensa durante la vida adulta (*Vicente, 1999*). El fotoenvejecimiento (más que el proceso de envejecimiento intrínseco normal) puede representar el 90% de los problemas cosméticos de la piel asociados con la edad (*Guercio-Hauer, 1994*).

Las causas del fotoenvejecimiento o fotodaño son multifactoriales. La incidencia del fotodaño depende de la edad, el sexo, el fototipo de la piel, el color de la piel y la ubicación geográfica. En general, las pieles más claras y menos pigmentadas presentan mayor riesgo de fotoenvejecimiento y de otros problemas de piel inducidos por el sol, incluido el cáncer de piel. El fotodaño se observa más a menudo en individuos con piel blanca, especialmente los fototipos de piel I y II (personas con piel clara que se queman fácilmente y se broncean con dificultad). Estudios como el de Maddin (2000) demuestran que la incidencia de fotoenvejecimiento en las poblaciones europeas y norteamericanas con tipos de piel I, II y III de la clasificación de Fitzpatrick es aproximadamente del 80% al 90% (*Samuel, 2005*).

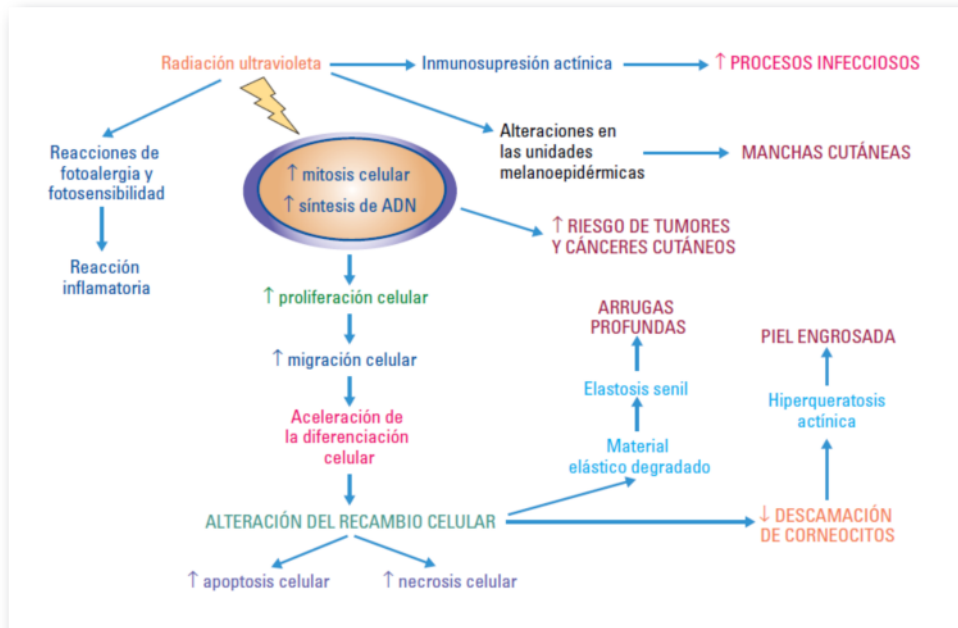


Figura 19. Envejecimiento actínico (Pons, 2008)

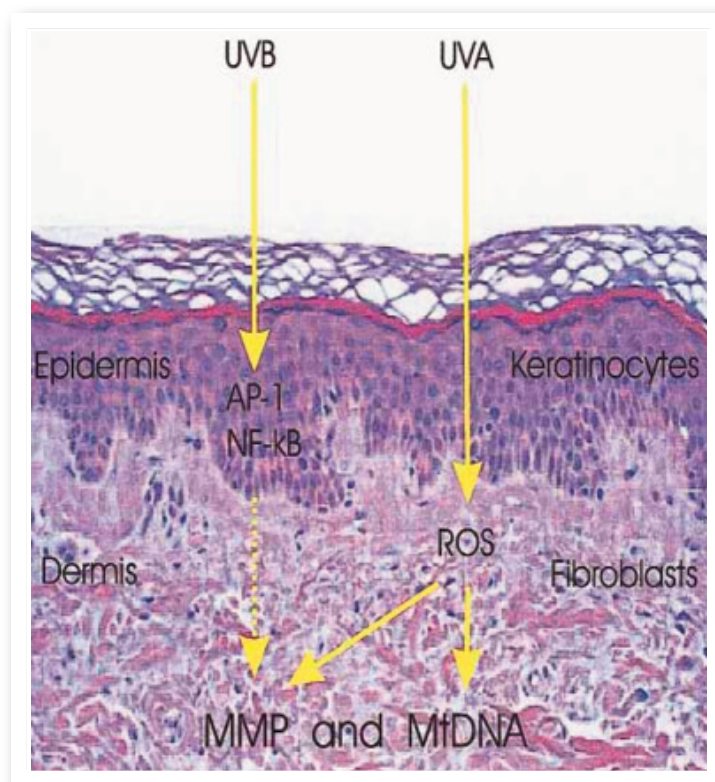
La agresión de la radiación ultravioleta a la piel altera el metabolismo cutáneo a través de diferentes vías bioquímicas, incrementando los procesos oxidativos y la liberación de especies reactivas de oxígeno (radicales libres). La reducción simultánea de los diferentes mecanismos antioxidantes que posee la piel incrementa la elastosis, que normalmente se denomina actínica. Pero no todos los daños coinciden con los déficits que se producen durante el envejecimiento intrínseco. Los acontecimientos diferenciales más significativos se relacionan con un incremento de la capacidad proliferativa de los queratinocitos, que da lugar a largo plazo a una hiperqueratosis actínica que incrementa exageradamente el grosor del estrato córneo.

La energía ultravioleta produce además, daños en el ADN (generalmente mitocondrial) y disminuye los diversos mecanismos químicos y enzimáticos capaces de propiciar su rápida reparación.

Los mecanismos por los que se produce el fotoenvejecimiento están relacionados con los efectos que produce la radiación ultravioleta a su paso por los tejidos: la irradiación ultravioleta activa el factor de crecimiento y receptores de citoquinas sobre los queratinocitos y las células dérmicas, lo que genera la transducción de señal a través de la activación de las vías de MAP-quinasa. Estas vías de señalización convergen en el núcleo de las células para inducir c-Jun, para formar complejos activados del factor de transcripción AP-1. En la dermis y la epidermis, AP-1 induce la expresión de metaloproteinasas de la matriz de colagenasa, gelatinasa de 92 kDa y estromelisina, que degradan el colágeno y otras proteínas que comprenden la matriz dérmica extracelular. Se planteó la hipótesis de que la degradación dérmica es seguida por la reparación que, como toda reparación de heridas, es imperfecta. La reparación imperfecta produce un déficit en la integridad estructural de la dermis, una cicatriz solar. La degradación dérmica seguida de esta reparación imperfecta, se repite con cada exposición intermitente a la radiación ultravioleta, lo que lleva a la acumulación de la energía solar en las cicatrices y en última instancia, en un fotoenvejecimiento visible. Se ha descrito que el ácido retinoico trans actúa para inhibir la inducción de la proteína de c-Jun por la irradiación ultravioleta, impidiendo con ello el aumento de metaloproteinasas de la matriz y la consiguiente daño dérmico (*Fisher, 1998*).

La piel fotoenvejecida muestra alteraciones en el componente celular y la matriz extracelular con la acumulación de elastina desorganizada y su fibrilina, componente microfibrilar, en la dermis profunda, junto con una pérdida grave de colágenos intersticiales, las principales proteínas estructurales del tejido conectivo dérmico. Los agentes patógenos responsables de estos cambios son especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas por la RUV, que agotan y dañan los sistemas de defensa antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos de la piel. Además

de causar cambios genéticos permanentes, las especies ROS activan las vías de transducción de señales en los fibroblastos residentes que están relacionados con el crecimiento, la diferenciación, la senescencia y la degradación del tejido conectivo. Una disminución en la carga total de ROS por los filtros solares eficientes u otros agentes de protección, puede representar estrategias prometedoras para prevenir o al menos minimizar el fotoenvejecimiento inducido por ROS (Wlaschek, 2001).



■ **Figura 20. Fotoenvejecimiento en la piel humana**

Por todo lo anteriormente expuesto, se podría afirmar que en personas predispuestas y de piel muy blanca, el riesgo de cáncer cutáneo es importante. El envejecimiento actínico además es responsable de que las arrugas sean más profundas, las manchas cutáneas de tipo melánico más frecuentes y diversas, la sequedad más pronunciada, la inmunosupresión más acusada y los cambios en el cabello (en especial alteraciones de la cutícula y de la pigmentación) más visibles. (Pons, 1995).

El fotoenvejecimiento se produce por un conjunto de **cambios a distintos niveles** (Glogau, 2009):

1. Clínicos
2. Funcionales
3. Histológicos
4. Patológicos

1. Clínicos

Según la edad, aparecen distintos cambios:

- De 30 a 50 años, se considera un fotoenvejecimiento moderado, con arrugas finas y paralelas, sobre todo en las comisuras de los labios y ojos, léntigos incipientes, queratosis actínicas no palpables, no visibles y alopecia temporal y occipital.

- De 50 a 60 años, suele existir un fotoenvejecimiento importante, con arrugas estables en la frente, de expresión, peribucales y periorbitarias. También se intensifica el patrón geométrico y aparecen discromías, manchas lentiginosis, sequedad y descamación, telangiectasias, queratosis visibles y canicie.
- En los mayores de 60 años, se trata ya de un envejecimiento severo, con arrugas en la totalidad de la cara y partes descubiertas, gran profundidad de los surcos cutáneos, piel engrosada, irregular, granulosa y nodular. El color es amarillento-grisáceo con léntigos e hipocromías. Presenta lagos sanguíneos (hematomas), así como queratosis que pueden transformarse en carcinomas. Normalmente hay crecimiento del pelo en las cejas, fosas nasales y conducto auditivo y las uñas se alteran, siendo más frágiles, con estrías, de color amarillento o grisáceo.

2. Funcionales

Entre los cambios funcionales, el más destacado es la disminución del recambio celular, lo que se denomina senescencia. Como consecuencia, la piel cumple sus misiones con menos eficacia: se altera la función barrera de la piel, con disminución de la eliminación de los productos de degradación, la percepción sensorial, la protección mecánica, la secreción de sudor, sebo y vitamina D, los niveles hormonales y la elasticidad y flexibilidad. Por el contrario, aumenta la fragilidad (abrasiones, ampollas) y el riesgo de infecciones. La piel fotoenvejecida ocasiona los retrasos en la curación de heridas y tiene alterados los

mecanismos de reparación de DNA, respuesta inmunológica y termorregulación.

3. Cambios Histopatológicos

En la *Epidermis*, encontramos un grosor variable (acantosis, atrofia). La epidermis adquiere un aspectouelto, debido a que la densidad de las papilas dérmicas disminuye y con ello su función de anclaje. La capacidad de multiplicación de las células basales disminuye y así se ralentiza el proceso de renovación celular epidérmico. El estrato córneo es estable, aunque aumenta el volumen de los corneocitos. Presenta pleomorfismo de los queratinocitos y atipia nuclear ocasional. Disminuyen también los melanocitos (un 10% cada 10 años a partir de los 30), así como las células de Langerhans (20-50%) y existe un aplanamiento de la unión dermo-epidérmica (50% papilas), con abrasiones y ampollas.

En la *Dermis* hay una disminución del espesor (de hasta el 20%) y también de la elasticidad, por lo que se adelgaza. La red de fibras de colágeno localizada en la dermis disminuye, el colágeno se dispone en acúmulos compactos de forma irregular con grandes espacios entre los mismos. A lo largo de la evolución del fotoenvejecimiento, la cantidad de elastina dérmica disminuye en gran medida en la superficie dérmica y en la profundidad de la dermis se encuentra en acúmulos gruesos, desordenados y poco elásticos. Todo ello conduce a que la piel tenga más tendencia a arrugarse.

Las glándulas sudoríparas tienden a desaparecer o a volverse inactivas y con ello se afecta la capacidad cutánea de la termorregulación. Las glándulas sebáceas y las glándulas apocrinas disminuyen su capacidad de producción, los poros aumentan de tamaño y el pelo cambia de vello a pelo terminal en áreas no deseadas, lo que confiere a la piel una apariencia más gruesa.



A nivel Hipodérmico, existe un proceso de atrofia que disminuye sus funciones de reserva calórica y termorregulación y también facilita la aparición de arrugas. La atrofia de la hipodermis no es generalizada, aparece más en cara, manos y pies.

Todo lo anterior conlleva la aparición de arrugas inducidas por la disminución de las papilas dérmicas, la alteración de las fibras de elastina de la dermis y la pérdida de la función de sostén y relleno de la hipodermis. La pérdida de la almohadilla hipodérmica, la disminución de la elasticidad y la ruptura de la unión dermoepidérmica, junto con la disminución de la masa muscular contribuye a la pérdida de firmeza que, favorecida por la fuerza de la gravedad o la fuerza de la mímica, hace que se marquen las arrugas (*Restrepo, 2010*)

4. Cambios Patológicos

Suelen ocurrir con cierta frecuencia:

- Prurito
- Asteatosis
- Eccema
- Penfigoide
- Herpes zoster
- Queratosis seborreica
- Queratosis actínica
- Carcinomas basocelular y espinocelular
- Léntigo maligno / Léntigo maligno melanoma

D. FOTOPROTECCIÓN

Aunque esté claro que la mejor protección solar es evitar el sol, eso no quiere decir que no se pueda tomar el sol, sino que debemos fotoprotegernos. Hoy existe un convencimiento de que hay que protegerse del exceso de radiaciones solares, ya que éstas provocan lesiones precancerosas y cáncer de piel, especialmente en personas de edad media y ancianos que tienen una piel clara y que han vivido y trabajado en climas soleados. Pero no hay que olvidar que la "dermatoheliosis" se produce también en personas jóvenes que se exponen caprichosamente a la luz solar, sin preparación, o a fuentes de luz ultravioleta artificial buscando un bronceado rápido, generalmente mujeres jóvenes (Camacho, 2001).

Durante las últimas décadas, la exposición solar ha sufrido un aumento considerable, sobre todo la intermitente o de tipo recreativo. La exposición crónica de la piel a las radiaciones ultravioleta provoca una inflamación crónica secundaria al paso de éstas a través de los tejidos, que a su vez origina estrés oxidativo. Este estrés genera una serie de cambios genéticos (dímeros de pirimidina, mutación de protooncogenes, etc.) que condicionan la degeneración de distintas estructuras cutáneas e inmunosupresión (Gómez, 2007).

Cuando la radiación solar incide sobre la piel, ésta pone en marcha todos estos mecanismos para reparar la agresión sufrida. Sin



embargo, exposiciones prolongadas o en condiciones extremas, hacen que estos mecanismos se sobrepasen, siendo entonces necesaria la fotoprotección externa.

La fotoprotección externa está centrada en el uso de **FOTOPROTECTORES**, sustancias en cuya composición incluyen filtros solares que, usados tópicamente, cumplen la misión de prevenir los daños actínicos causados por la radiación solar. Es de señalar que, en contra de la opinión popular, los fotoprotectores permiten el proceso natural del bronceado, evitando sus riesgos y secuelas.

Antes de entrar en detalle con los fotoprotectores, es preciso recordar los **principios generales de la fotoprotección**:

- **Absorción y disminución de la transmisión de UV:** Se realiza en el estrato córneo, mediante el uso de sustancias químicas absorbentes de UV.B (290-320 nm) y UV.A (320-400 nm).
- **Aumento de la dispersión de UV:** Se produce en el estrato córneo y la epidermis, mediante el uso tópico de partículas micronizadas de dióxido de titanio, óxido de zinc o melanina.
- **Inactivación de los radicales libres y formas reactivas de oxígeno** (singlet, anión superóxido, radical hidróxilo...): Se producen en las células viables de la epidermis y dermis. Son inhibidos por antioxidantes y supresores de radicales libres. Al contrario de lo que sucede con los anteriores, este tipo de fotoprotección es de efectividad variable.

- **Bloqueo físico de los UV:** Se produce en la superficie cutánea y se realiza mediante sombrillas, sombreros y vestidos de nilón, poliéster y algodón, con efectividad de buena a excelente.

Existen diferentes tipos de fotoprotectores en función del **tipo de filtro y su mecanismo de acción** (Montero, 2008):

1. Filtros Químicos

Los filtros solares más usados son los filtros químicos u orgánicos. Son sustancias químicas de síntesis que actúan como cromóforos absorbiendo la energía transportada por un fotón incidente; posteriormente, las moléculas vuelven a su estado inicial, liberando el exceso de energía en forma de calor imperceptible, radiación fluorescente o

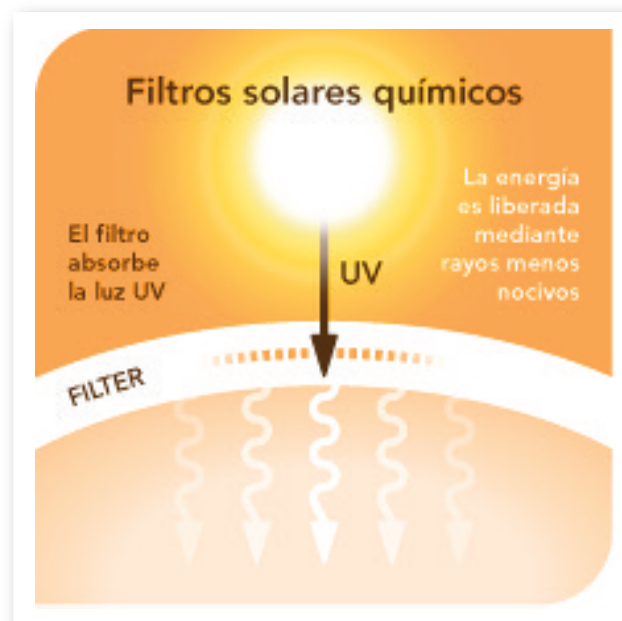


Figura 21. *Efecto filtro químico*



transformación química en un isómero o fotoproducto potencialmente reactivo. El número de filtros solares disponibles depende de la legislación en cada país. En Estados Unidos, la introducción de un filtro solar requiere la aprobación de la Food and Drug Administration (FDA), como si fuera un medicamento. La reglamentación de la Unión Europea determina la lista de sustancias autorizadas con su concentración máxima. A diferencia de las pantallas físicas, cada filtro químico tiene un espectro de absorción determinado. Los filtros que absorben predominantemente UVB son los que se utilizan con mayor frecuencia: PABA, octocrylene, homosalate, 4-methylbenzylidene, camphor, ethylhexyl methoxycinnamate, phenylbenzimidazole sulfonic acid, etc. El espectro de absorción de otros filtros, que actualmente se emplean en combinación con los anteriores y que los están sustituyendo progresivamente en el mercado, incluye tanto los UVB como los UVA (con un pico de absorción en este rango): benzophenone-3, butylmethoxydibenzoyl methane, terephthalidene dicamphor sulfonic acid, drometrizole trisiloxane, bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb® S), methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol (Tinosorb® M), entre otros. No existen filtros que absorban exclusivamente UVA. de alta energía (longitud de onda corta) con excitación a un estado de energía superior. Al retornar al estado basal, la energía liberada es de menor magnitud (longitud de onda más larga) e inocua.

2. Filtros Físicos

Las pantallas físicas son polvos inorgánicos inertes formados por pequeñas partículas de 180-190 nm de diámetro, compuestas por dióxido de titanio, óxido de zinc, óxido de hierro, óxido de magnesio, mica o talco. Actúan reflejando todas las radiaciones solares con independencia de su longitud de onda. Estas pantallas minerales se utilizan cada vez con mayor frecuencia, puesto que no generan energía ni fotoalergia



■ **Figura 22. Efecto de filtro físico**

por contacto. Sin embargo, presentan el inconveniente de formar una máscara blanca, especialmente inestética a concentraciones superiores al 5%. Si se disminuye la concentración, el aspecto cosmético mejora, pero a costa de una disminución en el coeficiente de protección. Con el fin de optimizar el empleo de pantallas solares, se ha reducido el tamaño de las partículas. La reflexión de la luz visible es menor en las formas micronizadas o ultrafinas, en las que el diámetro de las partículas varía entre 20 y 50 nm, lo que les confiere un aspecto más transparente, mejorando asimismo sus propiedades cosméticas. En la actualidad, el dióxido de titanio microfino se formula en forma de rutilo recubierto con óxido de aluminio, zirconio o sílice, lo que le confiere menor tendencia a la formación de microagregados, que disminuyen el efecto fotoprotector; por otra parte, puede combinarse con otros filtros físicos o químicos, lo que aumenta tanto el FPS como el espectro de la fotoprotección (Montero, 2008). Son eficaces tanto para UV como IR. (Sánchez-Saldaña, 2002).

3. Filtros Biológicos

Los filtros biológicos son sustancias que penetran más allá de la superficie y refuerzan a las células para que se defiendan mejor de la radiación. Tienen actividad antioxidante y, aplicadas tópicamente, disminuyen el estrés oxidativo inducido por la radiación ultravioleta. Potencian, por lo tanto, la protección conferida por los filtros solares convencionales, y disminuyen el consiguiente daño celular que podría ser origen de fotoenvejecimiento y cáncer de piel. Entre estos filtros biológicos se encuentran sustancias que, como diversas vitaminas, presentan actividad antioxidante directa. Sin embargo, también existen otras sustancias que ejercen esta actividad antioxidante a través de su capacidad quelante del hierro (diferentes flavonoides) y sustancias que aumentan la actividad de las enzimas antioxidantes de la piel (algunos oligoelementos). Estos filtros han demostrado su eficacia frente a los efectos de los rayos ultravioleta, pues son antioxidantes que evitan la formación de radicales libres y, por lo tanto, potencian el subsistema inmunológico cutáneo. Se están utilizando cada vez con más profusión, siendo las vitaminas A y E las más utilizadas en forma de palmitato o acetato, así como la vitamina C en sus diferentes variedades.

Administrados sistémicamente, los filtros biológicos tienen la ventaja de proporcionar una protección basal beneficiosa y permanente, que actúa independientemente del uso de la fotoprotección tópica. Afectan a la piel por completo y constituyen una reserva antioxidante que protege a medida que la fotoexposición va agotando los antioxidantes naturales de la piel. Además evitan los problemas inherentes a la fotoprotección tópica, como la aplicación insuficiente de producto, poco respeto a los tiempos de reaplicación o la influencia del roce, agua o sudor. Pero en ningún caso sustituyen a los fotoprotectores tópicos, sino que los complementan. Por ejemplo, la ingesta de beta-carotenos, debe ir unida al uso de fotoprotectores tópicos.

4. Filtros Organominerales

Son el futuro de la “fotoprotección total”. Se trata de filtros capaces de actuar tanto por absorción como por reflexión e incluso, por una combinación de ambos: dispersión o scattering. Son filtros químicos pero insolubles, con lo que así adquieren a la vez las ventajas de los químicos (cosmeticidad) y de los físicos (seguridad), siendo además de gran capacidad filtrante en el UVA. Por ejemplo, derivados del benzo-triazol (Tinosorb® M).

$$FPS = \frac{MED_{con\ proteccion}}{MED_{sin\ proteccion}}$$

De la combinación de estos tipos de filtros se puede obtener un fotoprotector cuya capacidad protectora viene determinada por el **Factor de Protección Solar (FPS)**. La actual definición del factor de protección solar, en la que están basados la totalidad de los métodos de evaluación hoy conocidos, se fundamenta en los trabajos de Schulze (Montero, 2008). En 1956, definió el FPS como la ratio entre la **mínima dosis eritemática (MED)** de la piel protegida con el producto y sin él a las 24 horas de la irradiación (Schulze, 1956).

El FPS es un índice que nos da idea del tiempo que podremos permanecer expuestos al sol sin riesgo de quemadura. Cuanto mayor sea el FPS, más alta será la protección frente al Sol. Por ejemplo y dependiendo de su tipo de piel, si un individuo es capaz de permanecer el primer día de exposición 20 minutos bajo el sol sin quemarse (dosis mínima eritemática, MED), la elección de un fotoprotector factor-8 le proporcionaría una protección 8 veces superior.



Actualmente, y en base a los nuevos conocimientos, algunos autores prefieren utilizar el término factor de protección eritemático en vez de factor de protección solar, debido a que en el cálculo y determinación del FPS sólo se considera la respuesta eritemática (es decir, la respuesta al UVB) a las 24 horas (*Pons, 1995*).

Los protectores solares no evitan el daño solar, ya que se ha demostrado que las dosis suberitematosas de RUV causan una variedad de cambios moleculares (incluyendo daños en el ADN) en estas células. Lo que si que es claro, es que el espectro de la radiación UV que llega a las células viables se ve alterado por el protector solar aplicado tópicamente. Aunque no puede haber ninguna duda acerca de la eficacia de los protectores solares para la prevención del eritema, se plantea la cuestión de los posibles efectos acumulativos de dosis suberitematosas crónicas y el aumento de la exposición de las células de la piel para las longitudes de onda más largas de RUV. El reto principal de los protectores solares tiene que ver con su capacidad de proteger las células de la piel contra los efectos de la radiación UVA. Estos efectos UVA pueden ser los daños directos (oxidaciones de bases) o los efectos sobre el sistema inmunológico de la piel, sin embargo, no existe un método aceptado de manera uniforme para la evaluación de la protección UVA (*Gasparro, 2010*).

Los recientes avances tecnológicos han producido una nueva generación de filtros solares UVA estables de espectro completo, que usados con regularidad pueden reducir el riesgo de fotoenvejecimiento y cáncer cutáneo (*Thomas, 2013*):

- Avobenzona es probablemente el fotoprotector con el más amplio y eficaz espectro UVA. Sin embargo, por sí mismo es inestable cuando se expone a la luz solar. Por consiguiente,

varias empresas diferentes desarrollaron sistemas para estabilizarlo. Una combinación de dietil 2,6 - naftalato, avobenzona y oxibenzona se ha formulado bajo el nombre Helioplex TM (de Neutrogena [®] / Johnson & Johnson).

- Otro ejemplo es ecamsule Mexoryl SX TM, L'Oreal), un derivado de bencilideno, que tiene un pico de absorción en el espectro de los rayos UVA a 345 nm .

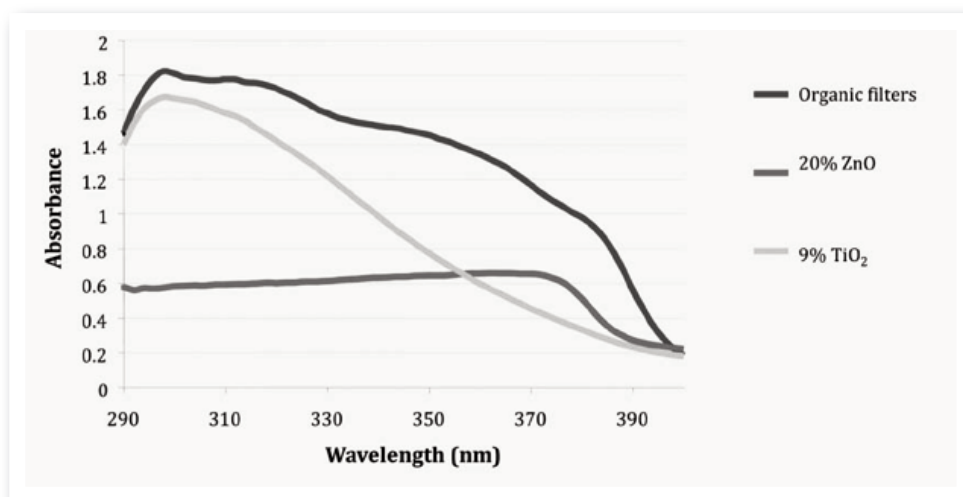


Figura 23. Espectro de avobenzona de la protección en comparación con pantallas físicas (Thomas, 2013)

Para la elección el fotoprotector más adecuado se deben tener en cuenta varios **factores**:

1. **Factores individuales:** Fototipo cutáneo (Fitzpatrick), edad, situaciones especiales (embarazo, patologías, tratamientos farmacológicos, antecedentes familiares con melanoma).

2. **Factores medioambientales:** horario, latitud, altitud, climatología, reflexión.
3. **Factores dependientes del producto:** formulación galénica.

1. Factores Individuales

Entre los factores individuales, el más importante es el *Fototipo*, en función del cual se determina el FPS solar (*Fitpatrick, 1975*). Recordamos que la raza humana se divide en seis grupos, de características similares en su respuesta a la radiación solar.

Fototipos cutáneos			
Fototipo	Características	Reacción ante RUV	Protección necesaria
Fototipo I	Piel clara, ojos azules, pecas. Sin sol piel blanco-lechosa.	Intensas quemaduras, no se pigmentan nunca	Ultraprotección >15
Fototipo II	Piel clara pelo rubio, ojos azules y pecas. Sin sol piel blanca.	Se queman fácilmente, pigmentan ligeramente	Ultra-Máxima (15-8)
Fototipo III	Razas caucásicas. Piel blanca no expuesta al sol	Se queman moderadamente y se pigmentan.	Máxima - Extra (6-8)
Fototipo IV	Piel blanca o ligeramente amarronada (razas mediterráneas y orientales). Habitualmente morenos.	Se queman moderada o minimamente. Se pigmentan con facilidad.	Extra - Moderada (4-6)
Fototipo V	Amerindios, indostánicos hispanos. Piel amarronada	Se queman raras veces y se pigmentan con facilidad e intensamente.	Moderada - Mínima (2-4)
Fototipo VI	Razas negras	No se queman nunca. Se pigmentan intensamente.	Mínima - No (2-0)

Tabla 8. Fototipos cutáneos

Además del fototipo cutáneo existen otros factores individuales que se deben considerar:

- **Edad:** se deberá extremar la precaución en niños, ya que su característica principal es la inmadurez de sus funciones cutáneas que pueden originar con frecuencia procesos de insolación y deshidratación. Por tanto, necesitarán reforzar la fotoprotección externa.
- **Embarazo:** se deberán aumentar la protección para evitar las alteraciones pigmentarias de la piel.
- **Pacientes en tratamiento farmacológico:** para evitar posibles reacciones de fotosensibilización es necesario reforzar la protección cuando estos pacientes se expongan al sol.
- **Algunas patologías** que empeoran con el sol: varices, cicatrices, rosácea, etc.
- **Individuos con antecedentes familiares de melanoma.**

2. Factores medioambientales

No es lo mismo tomar el sol en la playa que en la montaña, a las 11 h. o las 15 h. o en invierno o verano. Los factores que se deben tener en cuenta son:

2.1 **Horario:** la radiación es más intensa en la franja horaria de 12-15h.



2.2 **Latitud:** en el ecuador los rayos inciden sobre la Tierra de forma perpendicular, luego la radiación será más intensa a medida que nos acercamos a los polos.

2.3 **Altitud:** a mayor altitud mayor intensidad de radiación.

2.4 **Estación del año:** en verano estamos más cerca del sol que en invierno, por tanto la radiación será mayor.

2.5 **Climatología:** las nubes dejan pasar el 90 % de la radiación UV pero no IR. Por tanto, aunque desaparece el efecto calórico (no "notamos el sol") hay que seguir las normas básicas de la fotoprotección, aun en días nublados.

2.6 **Reflexión:** el agua, la nieve y la arena reflejan la radiación solar por lo que en estas condiciones, además de la radiación que nos llega de forma directa del sol habrá que sumar la reflejada.

3.- Factores dependientes del producto

Además de los factores dependientes del producto y de la forma galénica que se recomendarán según el tipo de piel (crema, loción, gel, gel-crema, stick, spray, Dry-oil, espuma, compacto) influirán otros aspectos como su inocuidad, estabilidad, resistencia y acción prolongada (Water-resistant, Waterproof y Sweatproof). Pero sobre todo, lo que es más importante es elegir aquel fotoprotector que asegure una buena absorción de las radiaciones nocivas a las que se vaya a exponer.

La protección proporcionada por la protección solar se relaciona con la cantidad de producto aplicado, así como la correcta selección del fotoprotector. La mayoría de las personas se aplican sólo el 25-50%

de la cantidad correcta de protector solar necesario, lo que significa que no tienen el nivel de SPF ni la protección indicada en la etiqueta. La aplicación de una cantidad adecuada de protector solar es, con mucho, el factor más importante que influye en su eficacia (*Thomas, 2013*).

El factor de protección solar de los filtros solares es examinado usando un espesor de 2 mg/cm², pero las investigaciones muestran que la protección solar en condiciones naturales se aplica de manera insuficiente con cantidades aproximadas de 0,39 a 1,0 mg/cm², lo que disminuye considerablemente el factor de protección. Se ha demostrado que una nueva aplicación temprana o el uso de muy alto FPS (70-100) pueden compensar en parte la discrepancia entre la cantidad de protector solar aplicado durante la prueba y en la realidad y que la aplicación de la protección solar puede ser mejorada por la educación de los consumidores (*Petersen, 2013*)

A modo de resumen, es necesaria una protección frente a la radiación solar, pues tanto a corto como a largo plazo y con exposiciones más o menos prolongadas, se pueden producir daños irreversibles. El sol tiene un efecto acumulativo y la piel tiene memoria y no olvida los daños que ha sufrido, de ahí que sea tan importante la educación sobre fotoprotección desde edades tempranas. Será necesario elegir el fotoprotector más adecuado según los diferentes factores indicados, aplicar la cantidad necesaria y sólo entonces se podrá disfrutar del sol sin peligro.

E. SUSTANCIAS CON PROPIEDADES ANTIENVEJECIMIENTO

A lo largo de la historia, se han buscado “fórmulas” que ayudaran a retrasar o mejorar la importancia de los problemas estéticos que ocurren durante el proceso del envejecimiento.

Se puede actuar a nivel tópico aplicando sustancias activas antiglicantes y antioxidantes que consigan disminuir de forma significativa el acúmulo de sustancias tóxicas, para devolver la funcionalidad a la piel y contribuir a romper y frenar el tan temido proceso del envejecimiento cutáneo (*Prieto, 2010*).

En 1950, Harman fue el primero en proponer la “Teoría del envejecimiento celular inducido por radicales libres”. Desde entonces, el desarrollo de productos farmacéuticos que los contienen, principalmente enfocados hacia el tratamiento del envejecimiento cutáneo, ha tenido un crecimiento acelerado. Existe, sin embargo, un número considerable de estudios que proporcionan evidencia de sus beneficios, tales como capacidad fotoprotectora y anticarcinogénica (*Ramos, 2010*)

Actualmente, los principales activos empleados en las fórmulas antienvjecimiento son los siguientes (*Pons, 2008*):

- Antioxidantes y secuestradores de radicales libres
- Quelantes de iones ferrosos
- Regeneradores y reparadores
- Enzimas y antienzymas
- Protectores inmunológicos
- Activos antiglicosilación
- Aceites esenciales
- Hidratantes y fotoprotectores

En el mercado existen distintos elementos antienvjecimiento. Hoy día, en las formulaciones cosméticas, los esfuerzos deben dirigirse a la incorporación de moléculas reductoras o antioxidantes.

Los antioxidantes son sustancias que pueden proteger del estrés oxidativo endógeno y exógeno al eliminar los radicales libres. Existen antioxidantes tópicos disponibles en productos para la piel que están destinados a prevenir los signos clínicos del fotoenvjecimiento. La mezcla de antioxidantes de vitamina C, vitamina E, Pycnogenol y aceite de onagra inhibe significativamente la formación de arrugas por UVB crónica, a través de una inhibición significativa de la actividad de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) y aumento de la síntesis de colágeno (*Cho, 2007*)

Además, el uso de antioxidantes puede ser particularmente bueno para mejorar los signos del envjecimiento producido por UVA, el cual se cree que está inducido en gran parte por los procesos oxidativos. Se ha demostrado que la aplicación tópica de antioxidantes aumenta la dosis mínima de UVA requerida para provocar aumento de la pigmentación y disminuye la seriedad de las fotodermatosis inducida por UVA (*Allemann, 2009*)

Según el mecanismo de acción de los radicales libres, se podría pensar que la aplicación tópica de antioxidantes pueden neutralizar algunos de estos radicales libres resultantes y en consecuencia disminuir o prevenir los signos del envejecimiento de la piel. En la actualidad, se comercializan los antioxidantes tópicos para prevenir daño en la piel inducido por UV y el envejecimiento, así como para tratar las arrugas y eritema debido a la inflamación.

La formulación de estas fórmulas antioxidantes se basa principalmente en la utilización del bloqueador del primer radical de oxígeno superóxido dismutasa (SOD), que se forma en el tejido cutáneo y actúa sobre el radical superóxido, convirtiéndolo en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Este bloqueador puede encontrarse en forma pura (se incorpora entre el 0,1 y 0,5% en las fórmulas cosméticas) y encapsulado en liposomas (se utiliza entre el 5 y el 10%). También es frecuente la utilización de una coenzima de la cadena respiratoria, la ubiquinona coenzima Q10, cuya aplicación tópica produce un potente efecto anti-eritematígeno capaz de reducir la formación de radicales libres. Para ciertos formuladores parece ser mucho más interesante la incorporación a las fórmulas cosméticas de ingredientes que posean una actividad antielastasa y antihialuronidasa (en el caso de este último, se utiliza el extracto de vid y el extracto de mimosa tenuiflora a dosis comprendidas entre 3 y 5%). Hay trabajos relativamente recientes en los que se considera la posibilidad de utilizar, por vía tópica, endonucleasas mediante liposomas cargados con esta enzima, cuya función es reparar los daños que la radiación solar provoca en el ADN de las células cutáneas irradiadas.

En cualquier caso, la formulación de los antioxidantes administrados tópicamente deben cumplir dos requisitos:

- El producto debe ser estable, ya que los antioxidantes pueden oxidarse e inactivarse antes de llegar al órgano diana.
- Deben ser adecuadamente absorbidos por la piel, llegar a su tejido objetivo en la forma activa y permanecer allí el tiempo suficiente como para ejercer los efectos deseados.

Es importante tener en cuenta también los productos o moléculas con propiedades antioxidantes que pueden ser utilizadas como ingredientes cosméticos antienvjecimiento. El grupo más importante corresponde al formado por los antioxidantes fenólicos, como son el x-tocoferol o vitamina E y sus derivados, como acetato de tocoferol, nicotinato de tocoferol, acetyl salicilato de tocoferol, dioleil tocoferil metil silanol, tocoferil ascorbil fosfato, liposomas cargados con x-tocoferol y ácido úrico. De igual forma, cabe destacar la importancia antioxidante de diversos flavonoides extraídos del mundo vegetal, como son la rutina, miricetina, kaempferol y quercetina, entre otros. También se pueden citar, dentro de este grupo, extractos vegetales, como *Mimosa tenuiflora*, *Silybum marinum*, *Medulata prele*, *Medulata auberpine* y finalmente, la vitamina C y sus derivados, como el palmitato de ascorbilo, linoleato de ascorbilo, ácido ascórbico oxietilenado, que son obtenidos para una mejor estabilidad de la mencionada vitamina C.

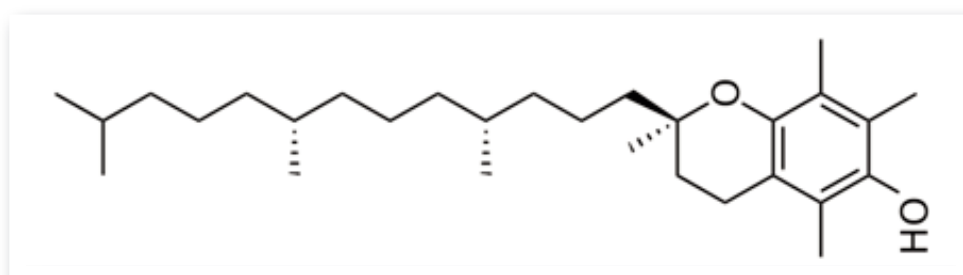
La vitamina A y sus derivados son esenciales para el desarrollo, crecimiento y mantenimiento del tejido epitelial. Ayudan a mantener las condiciones normales de la piel y tienden a normalizar la sequedad cutánea. Además, parece que ingredientes de origen marino pueden mejorar el relieve cutáneo o reducir la profundidad de las arrugas, como es el caso de un complejo formado por extracto de pescado + extracto de mejillón + extracto de microalgas (*Spirulina*, *Chlorella*, *Scenedesmus*). Otros compuestos importantes a tener en cuenta en las formulaciones antienvjecimiento son los quelantes, como el ácido

etilendiamino tetra acético (EDTA), que secuestran los iones de hierro y cobre y, por tanto, bloquean la reacción oxidativa.

Son muchos los antioxidantes que se han utilizado durante siglos en las culturas antiguas y modernas para las diversas enfermedades. Además de su actividad antioxidante, la mayoría de ellos poseen numerosas propiedades biológicas, como efecto anticancerígeno y antiinflamatorio. A continuación se citan los antioxidantes que más frecuentemente comercializados en formulaciones cosméticas, centrándonos en sus actividades antioxidantes (*Allemann, 2009*)

Vitamina E

La Vitamina E (tocoferol) es un antioxidante soluble en lípidos que se encuentra presente en la piel y se encuentra en diversos alimentos, tales como vegetales, semillas y carne. Hay 8 isoformas activas que se agrupan en tocoferoles y tocotrienoles.



■ **Figura 24. Estructura química de la Vitamina E**



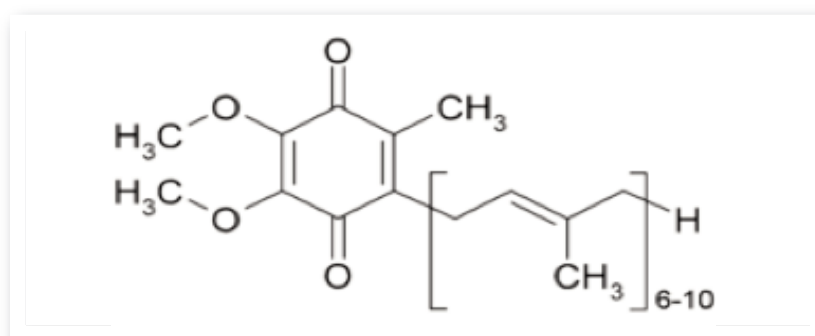
De los cuatro tocoferoles (α , β , γ , δ), el α -tocoferol (AT) tiene la mayor actividad. En animales, la aplicación tópica de un tocoferol ha demostrado que ejerce efectos fotoprotectores mediante la reducción del número de células de quemaduras solares, la reducción del daño inducido por ultravioleta B (UVB) y la inhibición de la fotocarcinogénesis. En los seres humanos, el tocoferol al 5% - 8 % en crema que se aplica a la cara mejora los signos de fotoenvejecimiento cuando se compara con placebo. (Yaar, 2007). En ratones sin pelo HR-1, la administración de tocotrienol oral (T3) suprime los cambios inducidos por UVB en el espesor de la piel, la expresión proteica de COX- 2, y la hiperplasia. Estos resultados sugieren que T3 tiene uso potencial para proteger contra la inflamación de la piel inducido por UVB (Shibata, 2010).

Además, la aplicación de vitamina E (5%) a la piel humana, 24 horas antes del tratamiento bajo oclusión hermética a la luz UV, ha demostrado inhibir la metaloelastasa de los macrófagos humanos, un miembro de la familia de las metaloproteinasas de matriz implicadas en la degradación de la elastina. Estudios más recientes sugieren que la aplicación combinada de varios antioxidantes puede aumentar su potencia cuando se compara con un solo antioxidante, y por consiguiente, puede proporcionar fotoprotección superior, como se ha demostrado para la combinación de vitaminas E y C. La aplicación tópica de vitamina E se ha asociado con varios efectos secundarios cutáneos, incluyendo la dermatitis de contacto.

Coenzima Q10

La Coenzima Q10 (CoQ10), o ubiquinona, es un antioxidante soluble en grasa que se encuentra en todas las células humanas como un

componente de la cadena respiratoria, así como en los alimentos, como pescados y mariscos. Hasta el 95% de las necesidades energéticas del organismo parecen ser proporcionado por la CoQ10. Estudios in vitro mostraron que el CoQ10 suprimió la expresión de colagenasa tras la exposición a la radiación de ultravioleta A (UVA). En la piel humana hay pocos estudios sobre el efecto tópico de CoQ10. Sin embargo, la CoQ10 es un antioxidante muy popular tópico incluido en varios productos cosméticos. No se han descrito hasta la fecha efectos secundarios a la aplicación tópica de CoQ10. (Allemann, 2009)



■ **Figura 25. Estructura química de la Coenzima Q10**

Idebenona

El análogo sintético de la coenzima Q10 se llama idebenona, que ha demostrado ser más fuerte que la CoQ10 y otros conocidos antioxidantes (McDaniel, 2005). En los seres humanos, un estudio de formulación tópica que contienen idebenona demostró efectos positivos sobre la piel dañada por la luz (es decir, reducción en aspereza de la piel, sequedad, reducción de arrugas, etc.). Sin embargo, los efectos sobre las

arrugas fueron más probable debido a la irritación de la piel o a la hidratación. Hay otro estudio de dermatitis de contacto atribuido a la idebenona al 0,5% en crema. Sin embargo, los autores han visto muchos pacientes que desarrollaron dermatitis de contacto por productos del cuidado de la piel que contienen idebenona (*Allemann, 2009*).

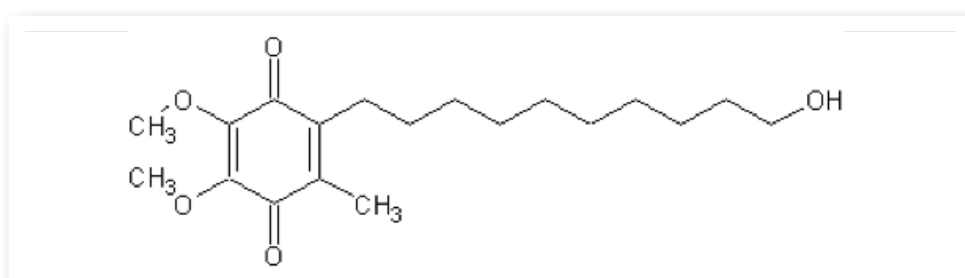


Figura 26. Estructura química de la Idebenona

Licopeno

El licopeno, es un carotenoide que se encuentra en las frutas rojas y en algunos vegetales y de hecho, es el responsable de su color rojo. Presente bajo la membrana lipídica y la cubierta de la piel, no es simplemente un pigmento, sino un poderoso antioxidante, que neutraliza los radicales libres, especialmente los derivados de oxígeno, reduce la peroxidación lipídica, y evita el eritema causado por la radiación UV en la piel. El licopeno puede reducir el efecto perjudicial que la RUV tiene sobre la piel y aumentar la protección a corto plazo (quemaduras solares) y los efectos acumulativos de la exposición al sol (*Goswami, 2013*).

Vitamina C

En los seres humanos, la vitamina C (ácido ascórbico) puede obtenerse únicamente a partir de los alimentos, tales como frutas cítricas. La luz del sol y la contaminación ambiental pueden agotar la vitamina C presente en la epidermis y dado que la vitamina C es un potente antioxidante, mejorar sus niveles en la piel parece razonable. La vitamina C existe predominantemente en su forma reducida, el ácido ascórbico.



Figura 31. Fuente natural de Vitamina C

Su forma oxidada, dehidro-L-ácido ascórbico se puede encontrar en cantidades de trazas y puede volver de nuevo a ácido ascórbico. Sin embargo, si el anillo de lactona se abre irreversiblemente, se forma ácido dicetogulónico, que ya no está activa. Esto sucede cuando los preparados de vitamina C se oxidan, que quedan sin efecto e inservibles. Por esta razón, las formulaciones de vitamina C debe mantenerse en envases resistentes a la luz y herméticamente cerrados, para evitar la exposición a los rayos UV o al aire.

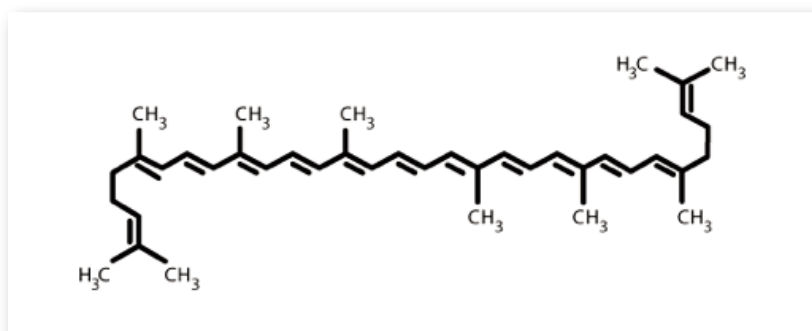


Figura 29. Estructura química del licopeno Semilla de Uva

La acción de la vitamina C tópica como fotoprotector se ha estudiado tanto in vitro como in vivo, lo que demuestra sus efectos en la prevención de los daños del sol mediante la reducción de células de quemaduras solares y la disminución de eritema por UVA y UVB. La adición de vitamina C tópica a cualquier protector solar UVA o UVB ha demostrado mejorar la protección contra el sol cuando se compara con la protección solar individualizada (Allemann, 2009).

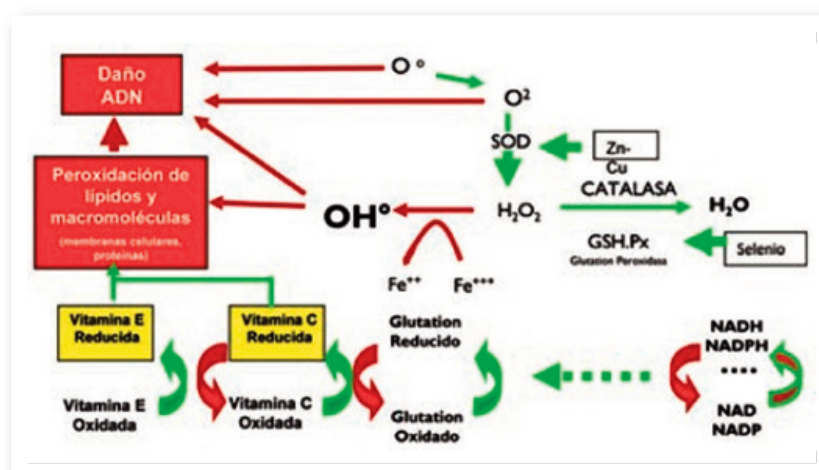


Figura 31. Fuente natural de Vitamina C



Además, la adición de vitamina C tópica a productos para después del sol (aftersun) ha demostrado que es útil para secuestrar las especies oxidativas inducida por la radiación ultravioleta. El ascorbato se requiere para la síntesis del colágeno y la adición de ácido ascórbico aumenta la producción de colágeno en los fibroblastos de la piel humana. Al mismo tiempo se puede reducir la producción de elastina por un mecanismo desconocido. Diversos estudios en humanos han demostrado una mejora en la apariencia de las arrugas después de la aplicación tópica de vitamina C (*Allemann, 2009*). Sin embargo, son necesarios más ensayos clínicos para desentrañar todos los efectos de la vitamina C en la piel y el envejecimiento. Los preparados de vitamina C son útiles en la prevención o disminución de los efectos perjudiciales de la radiación UV, aunque algunos pacientes experimentan molestias mínimas (escozor e irritación leve) a partir de la aplicación tópica (*Allemann, 2009*).

Té Verde

El té verde es una bebida muy popular, así como un antioxidante, que se extrae de la planta *Camellia sinensis*. Existen 4 catequinas polifenólicas principales, de los cuales, la 3-galato epigallocatequina (EGCG) es la más abundante y biológicamente activa. Los polifenoles del té verde (GTP) no sólo poseen actividad antioxidante, sino que también actúan como agentes anti-inflamatorios y anticancerígenos (*Wang, 1991*). GTP se puede administrar bien por vía oral o tópica. Con diversos estudios in vitro e in vivo, el té verde es probablemente el antioxidante más estudiado (*Afac, 2006*).

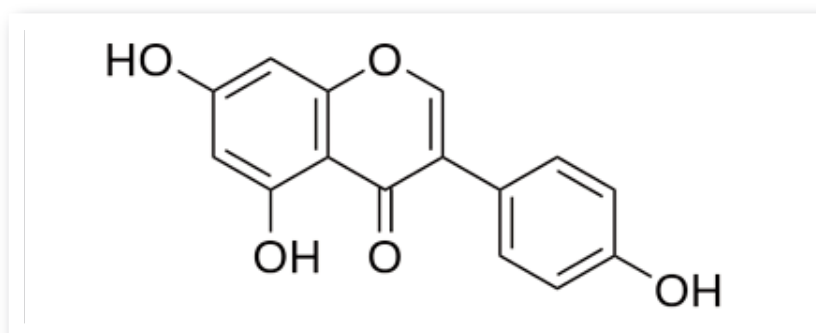


Figura 31. Fuente natural de Vitamina C

En aplicación tópica in vivo, los GTP ha demostrado que suprimen la quimio y fotocarcinogénesis en ratones y que contribuyen a evitar el daño oxidativo inducido por RUV y la inducción de la matriz de las metaloproteinasas. En la piel humana, los GTP reducen el eritema inducido por UV, el número de células de quemaduras solares, la inmunosupresión, y daño del ADN. A pesar de los pocos datos que existen sobre su aplicación en seres humanos, existen numerosos productos de venta libre que contienen té verde, y el uso de ellos cada mañana para la fotoprotección en combinación con un filtro solar tiene sentido. Como con la mayoría de los antioxidantes, no existen ensayos clínicos controlados y la concentración de fenoles en los diferentes productos no está estandarizada. Existen en el mercado distintos tipos de formulaciones cosméticas según su forma farmacéutica o galénica.

Silimarina

La silimarina, derivado de la planta de cardo mariano, *Silybum marianum*, es un flavonoide polifenólico natural. Su componente principal silibina (silibinina), se considera que es la más activa biológicamente con potentes propiedades antioxidantes. Estudios in vivo han demostrado efectos fotoprotectores con silibina aplicado tópicamente antes o inmediatamente después de la radiación UV. Así, hay pruebas razonables para incluir el compuesto en protectores solares. (Allemann, 2009)



■ **Figura 33. Estructura química de la Silimarina**

CoffeeBerry®

CoffeeBerry® (FutureCeuticals VDF) es el nombre propio para un antioxidante extraído de la fruta de la planta de café arábica *Coffea*. Se ha demostrado que es un antioxidante más fuerte que el té verde, extracto de granada, vitaminas C y E.⁴¹ Contiene polifenoles, que son bien conocidos por sus propiedades antioxidante. En 2007, fue lanzado un producto que contiene polifenoles CoffeeBerry® 1% (Revaléskin™, Laboratorios Stiefel).



■ **Figura 34. Fuente natural de CoffeeBerry®**

La compañía afirma que su uso durante un período de 6 semanas puede resultar en una mejora significativa de la hiperpigmentación, líneas finas, arrugas y aspecto general. Además, no ha habido informes de irritación en los pacientes con piel sensible. Sin embargo, son necesarios estudios aleatorios y controlados en humanos para evaluar los efectos antioxidantes de los preparados tópicos que contienen extracto de CoffeeBerry® (Allemann, 2009).

Resveratrol

El resveratrol es un compuesto antioxidante polifenólico fitoalexina que se encuentra en las uvas, nueces, frutas y vino tinto, entre otros. Estudios in vitro e in vivo han demostrado que, cuando se aplica tópicamente, el resveratrol protege contra el daño cutáneo e inhibe el estrés oxidativo mediados por UVB. No obstante, no existe demostración

científica de sus efectos sobre la piel humana y el fotoenvejecimiento, aunque se incluye en algunos productos que dicen tener beneficios anti-envejecimiento (Afac, 2006).

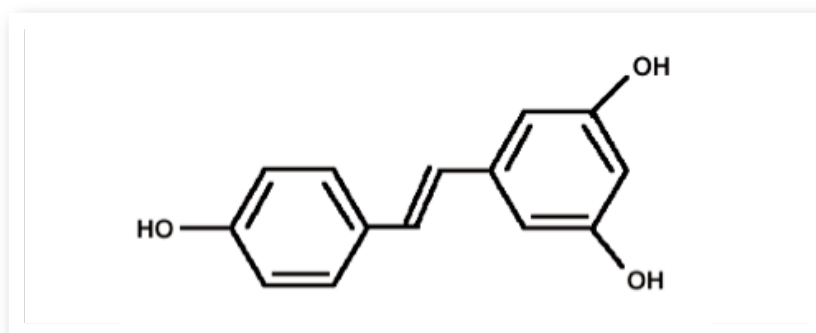


Figura 35. Estructura química del Resveratrol

Semillas de uva

Las semillas de uva se extraen de *Vitis vinifera* y son ricas en proantocianidinas, que pertenecen a la familia de los flavonoides. Las proantocianidinas son potentes antioxidantes, con fuerte inhibidor de la actividad de radicales libres, más incluso que las vitaminas C y E.

Mittal, et al. (2003), sugirieron un posible mecanismo antioxidante de la fotoprotección de las proantocianidinas de semillas de uva (SGP) que han demostrado su capacidad de inhibir la depleción de los componentes antioxidantes que induce la radiación de UVB. La aplicación tópica de extracto de semilla de uva parece mejorar el factor de protección solar en humanos si se incluye en formulaciones tópicas cosméticas para anti-envejecimiento.



■ Figura 36. *Semilla de Uva*

Granada

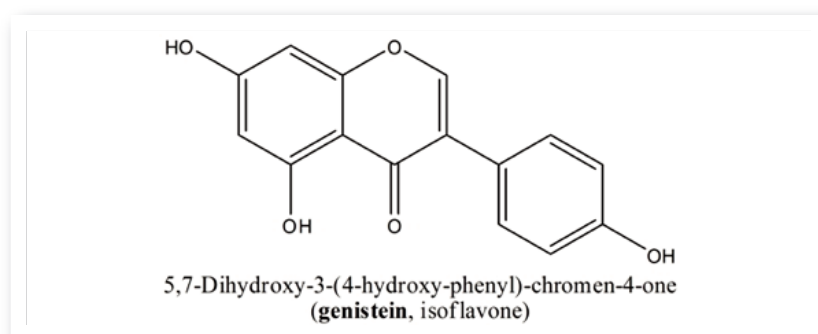
Los extractos de granada se pueden conseguir de varias partes de la fruta *Punica granatum*, tales como el zumo, las semillas, y la cáscara. En particular, los componentes fenólicos tienen potente actividad antioxidante. La aplicación tópica del extracto de cáscara in vivo, demostró su capacidad de restaurar las actividades enzimáticas de la catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa. In vitro, el extracto de fruta ha demostrado mejorar el daño mediado por UVA y proteger contra los efectos adversos de la radiación UVB. El extracto de granada está disponible en diversos productos de cuidado de la piel (Afac, 2006). Se ha demostrado que su incorporación a fórmulas fotoprotectoras mejora el daño de las quemaduras solares frente a los grupos patrón (Goswami, 2013). Existen estudios que demuestran los efectos protectores de la granada contra el daño celular inducido por UVA y UVB y el uso potencial de los polifenoles de la granada en aplicaciones tópicas (Pacheco-Palencia, 2008)



■ **Figura 37. Granada**

Genisteína

La genisteína es una isoflavona derivada de la soja con capacidad para inhibir el daño oxidativo de ADN inducido por RUV. La genisteína, ya sea aplicada por vía tópica o suplementado por vía oral, ha demostrado proteger eficazmente la piel humana contra el fotodaño inducido en la piel por RUVB. Se incluye en diversos productos como cremas hidratantes faciales, protectores solares y otras formulaciones de cuidado de piel que pretenden proveer efectos anti-envejecimiento (*Afac, 2006*).



■ **Figura 38. Estructura química de la Genisteína**

Pycnogenol

El Pycnogenol® es el nombre registrado de un extracto estandarizado extraído de la corteza del Pino marítimo francés (*Pinus pinaster*). El uso terapéutico del extracto de la corteza de pino ya fue descrito en el Siglo IV, y usado desde Hipócrates en la medicina para enfermedades inflamatorias y cicatrización de heridas.



■ **Figura 37. *Pinus pinaster* es fuente natural de Pycnogenol**

Posee una acción anti radicales libres muy potente, fruto de su composición en la que más de un 65% de sus componentes son polifenoles y procianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides. Entre sus ácidos fenólicos, destacan los derivados del ácido benzoico (ácido vainílico, ácido gálico...), ácido cinámico, ácido paracumárico, ácido cafeico y derivados tanto del ácido cafeico como el ferúlico. El mayor componente del Pycnogenol® son las catequinas (Prieto, 2010).

La aplicación tópica de pycnogenol al 0,05%-0,2% demostró reducción de la reacción de quemadura solar inflamatoria en ratones. El potencial de pycnogenol para proporcionar fotoprotección para los seres humanos ha sido investigado en administración oral, demostrando que se necesitaba un nivel de radiación RUV significativamente elevado para alcanzar un mínimo de la dosis eritematosa (*Allemann, 2009*)

Niacinamida

Niacinamida, o nicotinamida, es la amida biológicamente activa de la vitamina B3. Además de su actividad antioxidante, también ha demostrado que presenta actividad anti-inflamatoria, despigmentante y propiedades inmunomoduladoras. El uso de niacinamida se ha demostrado que mejora la textura y el tono de la piel y reduce las líneas finas, arrugas, e hiperpigmentación. La niacinamida tópica se tolera bien y se pueden encontrar en varios productos de cuidado de la piel.

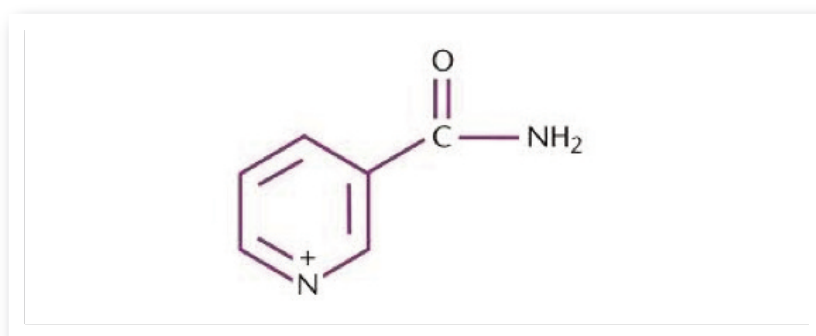


Figura 40. Fórmula Niacinamida

Aloe vera

Las hojas de *Aloe vera* y *A. barbadensis* son el origen de gel de aloe vera. El gel de aloe vera se utiliza ampliamente en cosmética para hidratación y revitalización. Bloquea los rayos UVA y UVB y contribuye a mantener y equilibrar la humedad natural la piel. La bradiquiinasa es la enzima en el aloe que detiene las quemaduras de sol al estimular la intervención del sistema inmune. Acemannan que es el D- isómero de mucopolisacárido, inicia la fase de reparación y el aumento de la producción de fibroblastos y el colágeno. Los extractos de Aloe y aloína de la planta suelen tener picos espectrofotométricos a aproximadamente 297 nm y por lo tanto, puede actuar como un filtro solar para la piel así como el pelo (Goswami, 2013).

Con respecto a la **formulación**, existen en el mercado distintos tipos según su forma farmacéutica o galénica.



■ Figura 41. *Aloe Vera*



Emulsiones

Las emulsiones son las fórmulas cosméticas más adecuadas para los productos antienvjecimiento. Dado que la piel senil es casi siempre alipídica, puede ser adecuado realizar fórmulas que posean la fase externa grasa, pero para evitar su adherencia se ha seleccionado como fórmula base una emulsión de fase externa silicona, cuya elaboración puede realizarse en frío y que puede contener o no glicerina. La selección de ingredientes es una tarea complicada, ya que la oferta es muy amplia. A título orientativo, se considera importante la presencia de un filtro solar y un antioxidante en la fase oleosa, y de un secuestrador de radicales libres y un extracto acuoso de actividad regeneradora en la fase acuosa.

Geles

Los geles han perdido algo de aceptación, aunque su posible formulación en frío facilita la estabilidad de la fórmula. Se ha seleccionado como fórmula base un gel realizado con un polímero acrílico que incorpora un tensioactivo y un hidrocarburo, para ofrecer el aspecto de una emulsión.

Para seleccionar los ingredientes se puede recurrir a un lipoaminoácido adecuado para secuestrar radicales libres e impedir la peroxidación de los lípidos cutáneos y la oxidación de las proteínas cutáneas, filtro solar y liposomas.

Aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas, que dan el aroma característico a algunas flores, árboles, frutos, hierbas, especias, semillas y a ciertos extractos de origen animal (almizcle, civeta, ámbar gris).

Un aceite esencial está constituido por cientos de sustancias distintas. Generalmente los componentes mayoritarios son hidrocarburos terpénicos (sin aroma o con poco aroma) y los minoritarios son los responsables del aroma característico del aceite esencial y quedan englobados en distintas familias químicas. Estos son: hidrocarburos terpénicos (terpenos y terpenoides) aldehídos (aldehído benzoico, aldehído cinámico, butanol, propanol), ácidos (acético, palmítico), alcoholes (linalol, geraniol, mentol); fenoles (anetol, eugenol), ésteres (acetato de linalilo, acetato de geraniol), cetonas (tuyona) y otros componentes (como éteres, derivados nitrogenados, sulfuros, tioéteres, tioésteres).

En menor concentración se encuentra un número no muy alto de sustancias químicas volátiles, que son las responsables principales del aroma global del aceite esencial. Por último, tenemos gran cantidad de sustancias a muy baja concentración que presentan la característica de “redondear” el aroma global.

Otros componentes del aceite esencial no están relacionados con su aroma (ceras, ácidos...), pero sí pueden tener su importancia para determinadas aplicaciones y pueden actuar como conservantes, antibióticos o fijadores del aroma en el aceite esencial. Se trata de productos químicos intensamente aromáticos, no grasos (por lo que no se enrancian), volátiles por naturaleza (se evaporan rápidamente) y livianos

(poco densos). Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. Se oxidan por exposición al aire. Se han extraído más de 150 tipos, cada uno con su aroma propio y “virtudes curativas únicas”. Proceden de plantas tan comunes como el perejil y tan exquisitas como el jazmín. Para que den lo mejor de sí, deben proceder de ingredientes naturales brutos y quedar lo más puro posible.

En nuestro estudio, hemos utilizado dos aceites esenciales, el aceite de almendras dulces y el aceite de crisálida del gusano de seda.



Figura 42. *Aceite esencial*

1. Aceite de almendras dulces

El almendro es un árbol de la familia de las Rosáceas (*Prunus Dulcis*). Tiene su origen en las regiones de Asia Central, donde es cultivado desde hace siglos.



■ **Figura 43. Almendro en flor**

Hay almendras dulces y amargas: las dulces son las que presentan mayores beneficios para el organismo, son nutritivas y de sabor agradable, y contienen gran cantidad de aceite fijo, goma y mucílago (azúcar) y además no presentan toxicidad, a diferencia de la variedad de almendras amargas.



Figura 44. Flor del almendro

El aceite de almendras dulces se usa en cosmética como aceite refinado, aunque puede obtenerse también con la técnica de prensado en frío. La diferencia es que en el proceso de refinado pierde la intensidad del aroma, que sí se presenta en el prensado en frío; ésta es la razón por la que se prefiere el uso del primero en el ámbito de la cosmética. Sin embargo, la ventaja del aceite de almendras dulces prensado en frío, es que conserva todas sus propiedades.

Los beneficios de su uso son los siguientes:

- Suaviza todo tipo de piel, incluyendo pieles secas y escamosas. Por sus propiedades emolientes, suavizantes e hidratantes, se usa mucho en la industria cosmética.
- Es ligero y con un nivel de viscosidad adecuado para los masajes, por eso se usa en spas.

- Se utiliza en aromaterapia como aceite portador de otros aceites esenciales.
- Proporciona brillo y suavidad a los cabellos estropeados.
- Tiene propiedades antiinflamatorias y se utiliza mezclado con aceites vegetales para despejar la mucosidad de los tejidos.
- Posee efecto laxante, útil para dolencias del sistema digestivo.



■ **Figura 45. *Aceite de Almendras dulces***

El análisis cromatológico señala como ácidos grasos predominantes el ácido oleico con una fracción del 60%, el ácido linoleico con una fracción del 20% y el ácido palmítico con una fracción del 4%. Por su origen natural y vegetal, presenta una estupenda compatibilidad con la piel y una escasa posibilidad de reacción. Por esta razón, es ideal para reparar y enriquecer el manto hidrolipídico de la epidermis.

2. Aceite de crisálida del gusano de la seda (*bombix mori*).



■ **Figura 46. Aceite de crisálida de gusano de la seda**

2.1. Origen

El gusano de seda también es conocido como la larva de la polilla de la seda doméstica común. Natural de China, esta especie fue introducida en Europa y Asia occidental en el siglo VI d.C. En la actualidad ya no existe en estado silvestre y se cría con fines económicos.

Existen distintas variedades y la más importante produce tres generaciones al año. El color de la polilla adulta surgida del gusano de seda es amarillo o blanco amarillento. Tiene el cuerpo grueso y peludo y una envergadura de 3,8 cm. La polilla adulta tiene piezas bucales rudimentarias y no come nada durante su breve fase de madurez. La hembra

deposita unos 300-400 huevos azulados en cada puesta, que se adhieren a la superficie plana por medio de una sustancia gomosa segregada por la propia hembra. Tras la puesta, la hembra muere y el macho poco después.

A los 10 días las larvas salen del huevo. Miden unos 0,6 cm de longitud y alcanzan los 7,5 cm cuando llegan a la madurez y también un color gris amarillento o gris oscuro. Se alimentan de hojas de morera blanca, lechuga o de naranjo de Luisiana. Las que son alimentadas con hojas de morera son las que producen seda de mayor calidad.



■ Figura 47. XXXXXXXXX

A las seis semanas de salir del huevo, el gusano de seda común deja de comer y empieza a tejer su capullo. Teje una única fibra que forma el capullo, cuya longitud va de 300 a 1.500 metros. Una vez tejido, el gusano de seda atraviesa una fase de pupa de unas dos semanas de

duración. Si se le permite llegar a término, emerge en forma de polilla adulta. Sin embargo, al salir la polilla del capullo, lo desgarrar, de forma que lo inutiliza para su uso comercial. Esta es la razón por la que en la producción comercial de la seda, sólo se permite que salgan del capullo el número de polillas necesarias para perpetuar la especie. Al resto, se les da muerte mediante calor, por hornos o hirviéndolos.

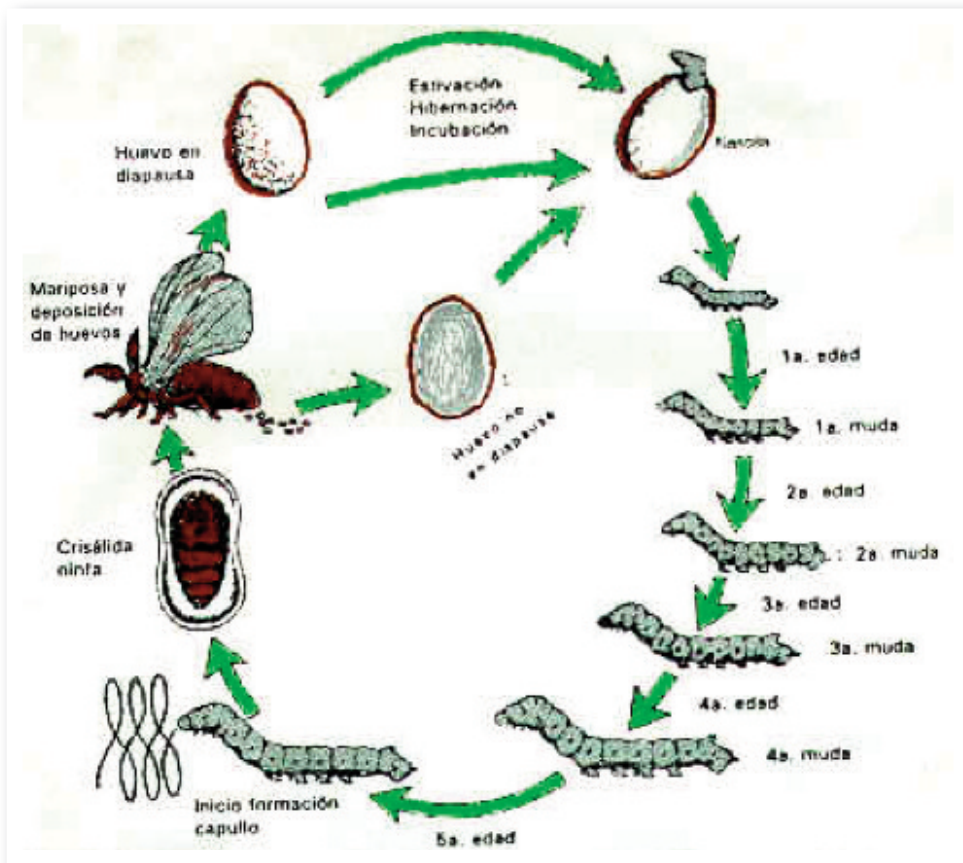


Figura 48. Ciclo del Gusano de Seda

La sericultura a partir de los gusanos de seda *Bombyx* se extendió a través de China, convirtiendo la seda en un artículo muy apreciado, también en otros países.



Figura 49. Orígenes de la sericultura

En el año 139 a.C. se abrió la mayor ruta mundial de comercio, que abarcaba desde el este de China hasta el mar Mediterráneo y durante miles de años, largas caravanas de asnos o camellos recorrieron los caminos comerciando con Oriente, la India y Arabia. Por esta “Ruta de la Seda” llegaban las especias y la seda de China. En el año 300 d.C. el secreto de la producción de seda se había transmitido por los mercaderes a la India y a Japón, extendiéndose después por Asia, pero durante tres milenios China exportó este tejido precioso con exclusividad.

En la Edad Media comenzó a extenderse el uso de la seda en la Europa occidental, mientras que en China se convirtió en un don preciado y los campesinos no tuvieron derecho a utilizarla hasta la dinastía Qing (1644-1911). A Europa llegaron huevos de los gusanos de seda Y semillas de moreras y se inició su producción que, después, se extendió a los Estados Unidos. En el siglo XVIII, Inglaterra lideraba la producción europea, gracias a las innovaciones en su industria textil, entre ellas contar con mejores telares de seda, telares mecánicos y con el estampado con rodillos. El proceso de industrialización alcanzó su cúspide en el siglo XIX. Entre 1855 y 1865, una epidemia, la enfermedad de Pébrine, causada por un pequeño parásito, provocó grandes estragos en la in-

dustria y fue el gran científico Louis Pasteur quien descubrió que se podía prevenir a través de un simple examen microscópico de las polillas adultas.

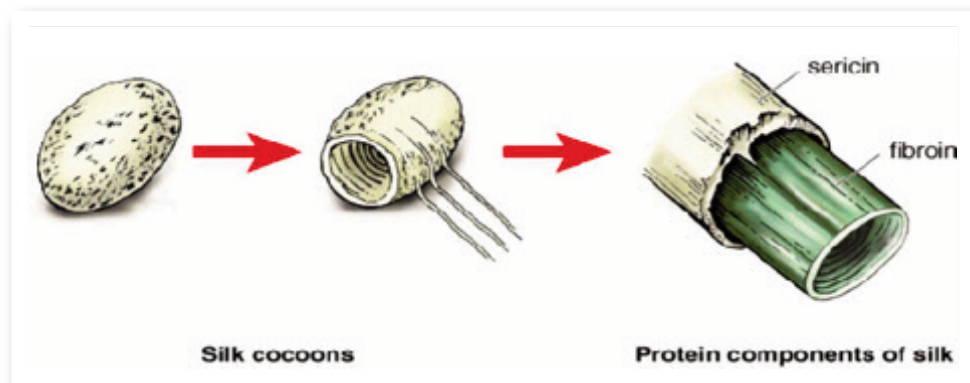


Figura 50. Ruta de la seda

Aunque otras alternativas favorecieron su decline, la producción de seda hoy en día es una combinación entre técnicas antiguas y modernas y sus características únicas están sirviendo para reactivar su investigación y uso industrial en aplicaciones biotecnológicas. China vuelve a ser el principal productor de seda natural mientras que en América es Brasil quien ocupa el lugar preponderante. http://cienciay-salud.laverdad.es/6_3_48.html

La seda, es segregada por las glándulas sericígenas del gusano de seda (*Bombyx mori* L.), que la utiliza para elaborar el capullo, una estructura cerrada de protección en la que realiza la metamorfosis de

larva a adulto. Antes de que el gusano de seda pase del estado de oruga al de crisálida o ninfa, segrega alrededor de sí mismo un capullo oval de unos 2,5 cm de largo, que consiste en un hilo de seda, que es continuo y puede medir hasta 1.500 metros.



■ **Figura 51. Componentes estructurales de la Seda (So-**

Este hilo se compone de dos proteínas: una de ellas es la **fibroína**, que es una proteína polimérica y lineal, que alterna dominios amorfos y otros de lamina beta. Constituye el 70% del peso del capullo. La otra proteína es la **sericina**, hidrosoluble y de estructura globular, que mantiene unidos los filamentos de fibroína (Cenis, 2008).

La proteína **fibroína** consta de capas de láminas beta antiparalelas. Su estructura primaria se compone principalmente de la secuencia de ácido amino recurrente (Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala). La proporción grande de glicina y alanina hace posible el embalaje hermético de las hojas, lo que contribuye a la estructura rígida de seda, que no se puede estirar (resistencia a la tracción).

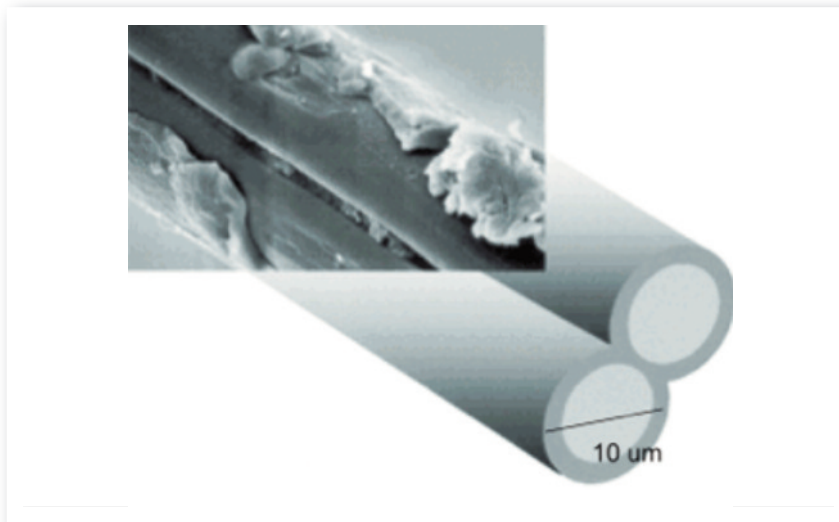


Figura 52. Fibra de seda formada por dos filamentos de fibroína unidos por sericina

La fibroína se dispone en tres estructuras llamadas seda I, II y III. La seda I es la forma natural de la fibroína, tal como es emitida desde las glándulas de seda de *Bombyx mori*. La seda II es la disposición de las moléculas fibroína de seda hilada, que tiene una mayor resistencia y se utiliza a menudo en diversas aplicaciones comerciales. La seda III es una estructura recién descubierta de fibroína. Se forma principalmente en soluciones de fibroína en una interfaz (de aire y agua, de agua y aceite, etc.).

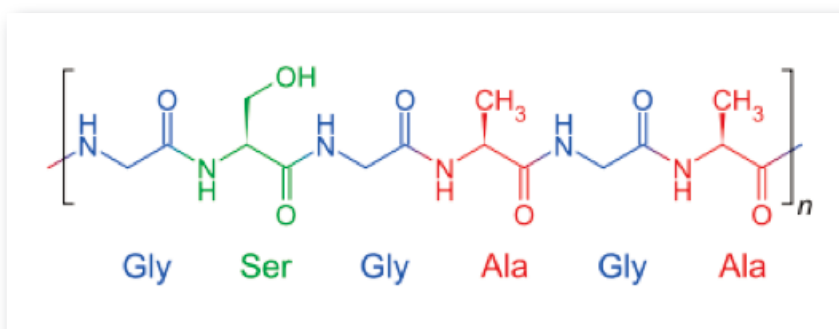


Figura 53. 53 Estructura de la Fibroína

La seda es mucho más resistente que un cable de acero de similar grosor y muchísimo más elástica. Se dice que un cable de seda del grosor de un lápiz sería capaz de detener a un Boeing 747 en pleno vuelo. La combinación de rigidez y resistencia hacen que el material sea aplicable en varias áreas, incluyendo la biomedicina y la fabricación textil. Además, presenta características que la hacen muy interesante como biomaterial (*Cenis, 2008*):

- a) Es un material de naturaleza proteica, altamente biocompatible. No se verifica rechazo ni respuesta inflamatoria en los tejidos donde se injerta. El rechazo ocasional que se ha reportado con algunas suturas, se atribuye a la contaminación de la fibroína con sericina.
- b) Presenta una gran resistencia mecánica a tracción, junto a una gran flexibilidad.
- c) Es biodegradable, pero a un ritmo mas lento que en otros biomateriales orgánicos, lo que permite una mejor consolidación de los tejidos. En dos años se reabsorbe totalmente y no se encuentran rastros de la misma en los tejidos.
- d) Puede elaborarse en diferentes configuraciones, según las necesidades: geles, films, matrices porosas 3D, microfibras y microesferas.
- e) Su producción es sencilla y sostenible. La cría del gusano de seda es sencilla y de bajo coste, si se dispone de moreras y la elaboración de los materiales se hace predominantemente en medio acuoso con técnicas relativamente simples. ´
- f) Presenta la interesante propiedad de tener una superficie altamente reactiva. Su superficie presenta grupos carboxilo terminal a los que se pueden unir de forma covalente péptidos tales como el motivo RGD (8), hormonas, tales como la PTH (8), y



factores de crecimiento, tales como la BMP-2 (bone morphogenetic protein-2) (4, 5, 7). Estas proteínas favorecen, de forma muy significativa, tanto la adhesión como el desarrollo de los cultivos celulares implantados sobre la matriz.

La Sericina es un albuminoide proteico, insoluble en agua fría, que recubre los dos filamentos sencillos de fibroína de la seda cruda. Se descomponen fácilmente en varios aminoácidos (como todas las proteínas), siendo los más importantes la alanina, la tirosina, la glicocola y la leucina. La fórmula empírica dada por Grover es la de $C_{15}H_{25}N_5O_6$.

La **sericina** es normalmente desechada en el proceso textil, aunque tiene diversas aplicaciones en medicina y sobre todo en cosmética. La sericina es especialmente rica en serina, un aminoácido capaz de retener el agua y de regular el grado de hidratación de la piel y del cabello.

F. MODELOS EXPERIMENTALES DE FOTOENVEJECIMIENTO

Existen numerosas evidencias epidemiológicas y clínicas que relacionan las radiaciones ultravioleta solares con el fotoenvejecimiento **cutáneo o dermatoheliosis** como ha sido denominado también por Oppel (2004). A su paso a través de los tejidos, estas radiaciones pueden originar estrés oxidativo, que sería el responsable de las alteraciones tisulares que tendrán lugar tanto en la epidermis como en la dermis, pues van a afectar a las membranas celulares y a las de los orgánulos, así como a la síntesis de aminoácidos (Lavker, 1995) y a la inmunosupresión (Wlaschek, 2001; Nishigori, 2004).

Asimismo, pueden provocar la dimerización de las bases pirimídicas del ADN (Ananthaswamy, 1998) generando mutaciones. Estas alteraciones constituyen la base patogénica del espectro de las lesiones que caracterizan al denominado fotoenvejecimiento y a la fotocarcinogénesis cutáneos (Matsumura, 2002; Gómez, 2007)

Aunque tanto por motivos metodológicos como por motivos éticos, es imposible demostrar que la RUV, especialmente la RUVB, es capaz de ocasionar cáncer cutáneo en el ser humano, hay suficientes datos clínicos, epidemiológicos y modelos experimentales en animales para poder afirmar que la RUV es la causa más importante de la presencia de cáncer cutáneo no-melanoma en la raza blanca (Borrego, 2008).

La exposición crónica a las radiaciones solares provoca también el envejecimiento patológico de la piel (fotoenvejecimiento) y es uno de los principales factores etiológicos implicados en el desarrollo del



cáncer cutáneo. Debido a la gran similitud de las lesiones desarrolladas por los animales, con las que tienen lugar en la piel humana tras la exposición crónica a las radiaciones ultravioleta, consideramos estos modelos experimentales, idóneos para el estudio del fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis, así como para el ensayo de sustancias antioxidantes y fotoprotectoras (Cano, 2010).

Existe numerosos estudios en la bibliografía sobre modelos experimentales en diferentes animales: miniature pigs (Kligman, 1982), cobayas (Kreuzmann, 1990), ratas (Nakamura, 1968), ratón Swiss (pelo blanco), ratón hairless (HR-1, SKH1, SKH2 y CBA) e incluso peces (xiphophorus, medaka y oez cebra) (Kurita, 2004). A continuación se incluye un **resumen cronológico de los estudios más relevantes encontrados en la bibliografía**, que confirman la validez de los modelos animales experimentales para el estudio del fotoenvejecimiento:

La mayoría de los experimentos utiliza roedores (Rodentia), porque poseen las características necesarias para los estudios de envejecimiento de la piel. Los ratones y ratas, en particular, son un buen modelo para muchas enfermedades humanas, incluyendo los desórdenes de la piel (Flores, 2010).

En 1960, Winkelmann y colaboradores informaron acerca de unos **ratones sin pelo** que, como los humanos, desarrollaron carcinomas de células escamosas como resultado de la exposición crónica a la RUV. A partir de entonces, el ratón sin pelo se convirtió en el animal de elección para los estudios de carcinogénesis por RUV.

En el primer intento para observar los daños del tejido conectivo por efecto de la radiación ultravioleta se utilizaron los **ratones Dublin Imprinting Control Region (ICR) Albino Random Bred**. Sam et al. (1964)

afeitaron los lomos de los ratones y los sometieron a una exposición a largo plazo con UV, siendo los primeros en describir la proliferación de elastosis. Este estudio no diferenciaba entre la radiación UVA y UVB, pero sirvió para recrear el efecto de la exposición al sol de los humanos, algo que tampoco había logrado otro modelo animal, como los que utilizaban cobayas. Sin embargo, el estudio usó dosis de radiación ultravioleta que excedía la normalmente experimentada por los humanos, por lo que se creyó que los tumores desarrollados por los ratones eran diferentes de los producidos en el hombre. Por tal motivo, concluyeron que el ratón albino no era el modelo más apropiado para la elastosis y volvieron al estudio con ratón sin pelo. Debido a esto y a un informe de Winkelmann (1960), en el cual se discutía sobre otro experimento que produjo en ratones sin pelo los mismos tumores que los observados en humanos, se eligió el ratón sin pelo, **Hairless mouse**, como el animal de elección para estos modelos experimentales (Flores, 2010).

En otro estudio, diseñado fundamentalmente para evaluar los efectos de un protector solar, Snyder y May (1975) observaron que el ratón sin pelo y sin protección desarrolló elastosis. No obstante, el primer estudio diseñado específicamente para inducir elastosis en un ratón sin pelo fue realizado en 1980 por Berger. Estos investigadores utilizaron ratones albinos desnudos (NGI), un animal que normalmente tiene poco desarrollada la red de fibras elásticas y los folículos pilosos, que no son completamente activos (Kligman, 1991).

Desde entonces, numerosos experimentos han producido elastosis a partir de la exposición a la radiación ultravioleta.

Para evaluar la capacidad de los protectores solares sobre el daño actínico del tejido conectivo, fueron irradiados grupos de ratones sin pelo con lámparas solares Westinghouse FS20, tres veces por se-



mana durante 30 semanas (*Kligman, 1982*). Cada exposición, constituida principalmente por los rayos UV-B y los menos energéticos UVA, fue de aproximadamente 6 dosis de eritema mínima en humanos. Un grupo de animales recibió sólo la irradiación. Los otros 2 grupos se trataron, antes de la irradiación, con protectores solares de factores de protección solar bajo o alto (SPF 2 y SPF 15, respectivamente). Las biopsias de piel se tomaron a intervalos de 10 semanas y se tiñeron con diversas tinciones histoquímicas para revelar cambios en la dermis. Los animales irradiados no protegidos mostraron un gran aumento de fibras de reticulina, fibras elásticas, mucopolisacáridos neutros y ácidos y la producción de melanina. El SPF 15 impidió los daños actínicos, mientras que el protector solar SPF 2 fue menos eficaz. Estos efectos fueron corroborados por microscopía electrónica. Un hallazgo histológico sorprendente fue la capacidad de reparación de la dermis en el período posterior a la irradiación.

Johnston (1984) expuso a los ratones sin pelo a radiación UVA y UVB para valorar los efectos de la exposición. Los cambios en el tejido conectivo fueron monitorizados mediante el ensayo de hidroxiprolina y desmosina como una indicación de las concentraciones de colágeno y de elastina, respectivamente. Las actividades de la prolil-hidroxilasa y colágeno glucosil-transferasa, enzimas que participan en la biosíntesis de colágeno, también se ensayaron. La concentración de elastina se incrementó significativamente en los ratones tratados con RUVA o RUVB. La concentración de colágeno no se vio afectada por los tratamientos, pero la actividad de la prolil hidroxilasa, que refleja la capacidad sintética de colágeno, se redujo en los ratones tratados con RUVA, mientras que la actividad glucosil-transferasa colágeno se mantuvo sin cambios. La irradiación de la prolil-hidroxilasa humana purificada con RUVA *in vitro* originó disminución de la actividad enzimática a dosis más altas, mientras que la RUVB no tuvo ningún efecto. Los resultados indican que

los cambios definitivos en la bioquímica de los tejidos conectivos dérmicos pueden ser inducidas por la exposición de los ratones a la RUV.

Otro modelo correspondió al **ratón sin pelo ligeramente pigmentado (Oslo/BOM cepa endogámica)** que fue utilizado por Poulsen en 1984 para estudiar la elastosis con diferentes combinaciones de UV-B y UV-A. Se observó ausencia de elastosis significativa cuando se aplicaba exclusivamente RUV-A durante 3 ó 6 meses, mientras que cuando se aplicaba solo la RUV-B, se desarrollaba una elastosis moderada después de 3 meses. Por otra parte, la exposición secuencial a la radiación RUVB y una gran dosis de RUVA produjo una elastosis severa y una dosis moderada de RUVA, administrada simultáneamente con RUVB, produjo una ligera reducción del grado de elastosis frente a los RUVB individualizada.

Los **miniature pig** (cerdos miniatura) fueron utilizados también como modelo animal para el estudio del fotoenvejecimiento (*Fourtarnier, 1989*). Los animales se expusieron tres veces por semana durante un período de 14 meses con dosis suberitogénicas de rayos UVB y UVA. Mostraron engrosamiento del estrato córneo, aumento de las fibras elásticas y de los glicosaminoglicanos en la dermis superior, aumento de la laxitud con mayor extensibilidad, aumento de la densidad de los vasos y disposición más desordenada de haces de colágeno, con pequeñas alteraciones en la bioquímica del colágeno. Estos cambios son similares a los de la piel humana fotoenvejecida, aunque más leves en grado, atribuible a la baja dosis total de radiación ultravioleta, lo que valida el modelo experimental animal.

En la actualidad, los ratones sin pelo más utilizados en modelos de fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis son los **SKH-1 (albino)** y **SKH-2 (ligeramente pigmentada)**. Criados originalmente en Skin and Cancer Hospital of Temple University Health Sciences Center en Filadel-



fia, las colonias de ratones son ahora mantenidos en los laboratorios y establecimientos comerciales en todo el mundo. El SKH-1, es el más ampliamente utilizado (*Kligman, 1982*).

El ratón de laboratorio, como se ha mencionado, se ha convertido en el mamífero de elección para el estudio de la mayoría de sistemas biológicos y patológicos. Esta elección se basa fundamentalmente en su pequeño tamaño, la facilidad de mantenimiento, alta fecundidad, bajo coste y otras consideraciones logísticas; además, estas consideraciones han sido superadas por la gran cantidad de datos genéticos disponibles en esta especie y los numerosos métodos que se han desarrollado para manipular el genoma del ratón.

La mutación del ratón que personifica un defecto en el ciclo del cabello es el sin pelo (HR) del ratón y sus alelos rinoceronte (hrrh). Estos ratones tienen un alelo mutado en el gen “sin pelo” (hr), hairless gene, que se encuentra en la posición 70 Mb del cromosoma 14 (Benavides, 2009) Los restos foliculares también se convierten en quistes dérmicos profundos que pueden romperse causando granulomas a cuerpo extraño y la cicatrización (*Sundberg, 2001*).

La radiación UV produce cambios en estos ratones, que son comparables a los de la piel humana y por tanto, son muy relevantes. El espectro de acción de la respuesta aguda a la RUV en el ratón sin pelo es comparable a la del eritema solar en los seres humanos y los cursos de tiempo para ambas respuestas son similares (*Cole, 2010*). Además, el daño producido en el tejido conectivo, también es análogo al sufrido por el hombre (*Kligman, 1982*).

Schwartz (1988) estableció un modelo experimental en el que irradiaron ratones sin pelo tres veces a la semana, durante 10 semanas,

con RUVA y RUVB, estudiando la piel con técnicas inmunohistoquímicas y bioquímicas. La inmunofluorescencia indirecta se realizó con anticuerpos dirigidos contra la elastina, proteínas microfibrilar y fibronectina, observándose aumento de la fluorescencia en la piel actínica dañada. Los componentes de las fibras elásticas, elastina y proteínas microfibrilar, fueron aislados y cuantificados. La piel de control contenía aproximadamente 0,1 % de componentes de fibras elásticas de peso en seco, mientras que la piel actínica dañado contenía 0,2 % de peso en seco. Estos datos coinciden con las observaciones anteriores de la hiperplasia de fibras elásticas en los ratones irradiados RUV. Además, la piel irradiada contenía 1,12 mg de fibronectina extraída por gramo de peso en húmedo, en comparación con 0,59 mg en la piel del control, así como mayores cantidades de ácido hialurónico y sulfato de condroitina (contenido de ácido urónico). Esos estudios corroboran la validez de la RUV sobre ratones sin pelo como modelo de fotoenvejecimiento dérmico.

Hirose (1988) describió las fibras elásticas normales de un ratón hairless y su degeneración progresiva con el aumento de la exposición a la radiación ultravioleta. El estudio establece las diferencias y similitudes de las fibras elásticas animales y humanas. Asimismo, se ha demostrado ampliamente que este ratón sin pelo es un modelo relevante para el estudio sistemático del fotoenvejecimiento (Kligman, 1989). Al igual que en los seres humanos, con la radiación ultravioleta crónica, estos ratones desarrollan hiperplasia de fibras elásticas, seguida de elastosis y degradación de la ultraestructura. El colágeno está dañado y su metabolismo se altera, mientras que los bajos niveles de proteoglicanos y glicosaminoglicanos aumentan de forma importante en situación basal. Con este modelo, Kligman describió los efectos sobre el tejido conectivo dérmico de RUVB (290-320 nm) y RUVA (320 a 400 nm), así como la combinación de los dos. También se evaluaron los efectos de los protectores solares, encontrando que un porcentaje significativo de



daño solar se reparó cuando acababa la irradiación ultravioleta. Por debajo de la epidermis, en una zona de elastosis, se observaba una banda de nueva dermis. Además, la mejora de la reparación se logró con todas las formas tópicas del ácido trans-retinoico en un tiempo y modo dosis-dependiente.

Schwartz (1989) demuestra en la piel de ratones, mediante técnicas inmunohistoquímicas y bioquímicas que la exposición crónica de la piel a la luz del sol ocasiona un grave daño tisular en la dermis, que se caracteriza por la degeneración basófila del colágeno y la acumulación de material derivado de la elastosis.

También en 1989, Bissett desarrolló los protocolos y métodos para el uso del ratón sin pelo (SKH: HR-1) como modelo animal para evaluar agentes fotoprotectores contra el daño solar crónico. Desarrolla papilomas y carcinomas en respuesta a la exposición a la radiación ultravioleta crónica (RUV) y, por lo tanto, es una herramienta valiosa para la evaluación de agentes potenciales contra el cáncer.

Por otra parte, existen estudios que demuestran que los polifenoles del té verde (GTP) poseen actividad antigenotóxica significativa y están provistos de una protección contra hidrocarburos policíclicos aromáticos relacionados con la inducción de tumores de piel en ratones. Wang (1991) evaluó el efecto de la alimentación oral y la aplicación tópica de GTP en la carcinogénesis por ultravioleta B (RUVB) en hembras de ratones SKH-1 sin pelo.

Moloney (1992) definió los cambios cuantitativos y cualitativos en el colágeno y la elastina dérmica que se producen en respuesta a la radiación ultravioleta crónica (RUV). Para ello, utilizó un modelo experimental con ratones SKH-1, ratones sin pelo, que fueron irradiados con

dosis suberitematosa de UVB, tres veces a la semana, durante un máximo de 20 semanas. El engrosamiento dérmico fue evidente después de 10 semanas de irradiación, así como cambios en la elastina dérmica y el contenido de colágeno; sin embargo, la formación de arrugas precedió a dichos cambios, por lo que este estudio no pudo establecer una relación causal entre la formación de arrugas y cambios en el contenido de proteínas dérmicas estructurales en SKH-1 ratones sin pelo.

Existen diversas publicaciones del equipo de investigación liderado por Schwartz (1995), que han utilizado el ratón sin pelo SKH-1 para diferentes estudios: en anteriores, se había demostrado que el tratamiento con tretinoína tópica en ratones sin pelo fotoenvejecidos era útil para estimular la formación de una zona subepidérmica de nuevo tejido conectivo caracterizado por la síntesis de colágeno mejorada. En 1995, se publicó este estudio sobre ratones sin pelo (SKH-1), que se irradiaron tres veces por semana, durante 10 semanas, con dosis gradualmente crecientes de radiación ultravioleta (hasta 4,5 dosis mínima de eritema por la exposición) por bombillas Westinghouse FS-40. Se dividieron en diferentes grupos según el tratamiento recibido 5 veces a la semana, durante otras 10 semanas: tretinoína al 0,05%, etanol, vehículo de glicol de propileno. Los controles incluyeron ratones sacrificados después de 10 semanas de tratamiento ultravioleta y los animales no tratados fueron emparejados por edad. La distribución de la elastina y fibronectina se examinó por microscopía de inmunofluorescencia, que reveló fibrillas finas. En la zona subepidérmica, en el grupo tratado con tretinoína, un ensayo de inmunounión ranura-blot cuantitativo mostró que la tretinoína indujo una cantidad tres veces mayor de tropoelastina en comparación con los controles. El contenido de elastina insoluble (niveles desmosina) fue similar en todos los grupos. El contenido de fibronectina se aumentó por la radiación ultravioleta y el tratamiento con tretinoína indujo el mayor aumento. En contraste, la cantidad de glico-



saminoglicanos, aunque aumentó por la radiación UVB, se redujo mediante el tratamiento tretinoína.

Bernstein (1995) investigó en una línea de **ratón transgénico** que expresa el promotor de elastina humana, ligada a un gen acetil- transferasa de cloranfenicol, los efectos de la radiación ultravioleta A y ultravioleta B sobre la actividad del promotor de elastina humana in vivo e in vitro. La irradiación de ratones con una sola dosis de ultravioleta B (491,4 mJ/cm²) ocasionó un aumento de hasta 8,5 veces en la actividad del promotor, mientras que un aumento más modesto de 1,8 veces se midió con ultravioleta A (38,2 J/cm²). Además, los estudios in vitro revelaron a largo plazo un aumento en la actividad del promotor de la elastina, en respuesta a la radiación ultravioleta B (55 mJ/cm²), mientras que no se observó ningún cambio en la respuesta a la radiación ultravioleta A (2,2 J/cm²). Estos resultados confirman el papel de la radiación ultravioleta B en la activación del promotor de elastina en el fotoenvejecimiento.

Takema (1996) describió un modelo experimental sobre hembras de ratones albinos sin pelo, que fueron irradiados crónicamente con dosis suberitémáticas de la radiación RUVB. El colágeno se extrajo de la piel dorsal de los ratones y fue fraccionado en (NSC), fracciones solubles en ácido (ASC) e insoluble neutros sal soluble (ISC). En cada grupo, se encontró una disminución exponencial relacionada con la edad en el contenido y la proporción de colágeno soluble en ácido. El contenido y las proporciones de ASC de ratones irradiados fueron siempre significativamente más bajos que los de los animales de control. Se observaron ligeras disminuciones relacionadas con la edad en el contenido (por peso fresco de los tejidos) de NSC, ISC y el colágeno total en el grupo control. Una disminución dramática en la ASC se produjo casi de forma concomitante con la formación de arrugas en los ratones

irradiados. La disminución de colágeno de la piel soluble en ácido en ratones irradiados puede desempeñar un papel en la formación de arrugas en la piel dorsal del ratón sin pelo.

Chaour (1996) investigó el efecto del ácido trans-retinoico (t-RA) sobre el colágeno y la expresión génica de colagenasa en la piel de ratón sin pelo, demostrando que puede reparar algo del daño tisular causado por la exposición crónica de la piel a la radiación UV, concluyendo de que el t-RA tópico ejerce efectos directos y/o indirectos en la expresión de genes de colágeno, en la piel de ratones sin pelo irradiados y no irradiados.

Estudios bioquímicos y moleculares posteriores han revelado que la activación de la expresión del gen elastina, con aumento de la actividad transcripcional de otros genes de la matriz extracelular, es un evento temprano en el fotoenvejecimiento. Partiendo de esta premisa, Uitto (1997) desarrolló una línea de investigación con ratones transgénicos, que expresan el promotor de la elastina humana, ligado a un gen reportero de la cloranfenicol acetiltransferasa, de una manera regulada por el desarrollo y específica de tejido. La exposición de la piel de estos animales a la RUV, especialmente UVB, resultó en la mejora de la activación del promotor de elastina.

La formación de arrugas causadas por fotoenvejecimiento implica claramente cambios de los componentes de la matriz extracelular y las propiedades mecánicas de la piel. Fujimura (2000), desarrolló un modelo experimental con ratones sin pelo (HR/ICR), en el que se analizaba la formación de arrugas tras la aplicación tópica de 1α , 25-dihidro-xivitamina D3. El elemento de elasticidad de la piel se mantuvo sin cambios, pero el elemento de viscosidad aumentó significativamente. Histológicamente, la epidermis se volvió muy gruesa, pero no se observaron cambios notables en la dermis. Los cambios en las propiedades



mecánicas de la piel después del tratamiento con 1 α , 25-dihidroxitamina tienen lugar a través de la variación física de la epidermis, especialmente los cambios de elementos de viscosidad. Se sugiere que las propiedades visco-elásticas de la epidermis también son atribuibles a la morfología, así como las propiedades mecánicas de la piel.

Por otro lado, se han estudiado los efectos del envejecimiento intrínseco de la piel en **ratones CBA** (*Bhattacharyya, 2004*). Estos ratones muestran modificaciones histológicas de la piel, relacionadas con la edad, que son diferentes de otras especies de roedores. En este estudio, se seleccionaron ratones CBA de 3 grupos de edad (jóvenes, adultos jóvenes y viejos) para investigar el estado histológico y morfométrico de la piel en función de la edad, como paso previo a los estudios ultraestructurales y posteriores manipulaciones experimentales y farmacéuticas.

En los últimos años se están desarrollando varios modelos animales, principalmente de ratones hairless y Swiss (*Kambayashi, 2001; Mitani, 2004; Reeve, 2005; Gómez, 2010*), con el objetivo de reproducir experimentalmente los efectos de las radiaciones ultravioleta y ensayar tratamientos preventivos frente a las mismas.

Cho y cols. (2007) examinaron el efecto de la administración oral de la mezcla antioxidante de vitamina C, vitamina E, Pycnogenol y aceite de onagra en la formación de arrugas inducidas por UVB. Además, se investigó el posible mecanismo molecular de fotoprotección contra los rayos UVB a través de la inhibición de la actividad de MMP - colágeno degradantes o mediante el aumento de la síntesis de procógeno en la piel dorsal de ratón. Para ello, a hembras de ratones sin pelo SKH - 1 se administró por vía oral la mezcla de antioxidante (grupo de prueba) o vehículo (grupo de control) durante 10 semanas, la irradiación UVB tres veces a la semana. La intensidad de la irradiación se

incrementó gradualmente entre 30 y 180 mJ/cm². Microtopografía y la evaluación histológica de las pieles dorsales se efectuó a cabo al final de 10 semanas para evaluar la formación de arrugas, así como análisis de transferencia Western y la EMSA para investigar los cambios en el equilibrio de la síntesis de colágeno y la degradación del colágeno. Esta mezcla antioxidante reduce significativamente la formación de arrugas inducida por UVB, acompañado de una reducción significativa del espesor de la epidermis, y la hiperplasia inducida por UVB, acantosis, y hiperqueratosis. Esta mezcla antioxidante previno de manera significativa las expresiones inducida por UVB, de las MMP, proteína activada por mitógeno (MAP) quinasa y la activación de la proteína activadora (AP)-1, factor de transcripción, además de una mayor expresión de procógeno de tipo I y factor de crecimiento transformante - β 2 (TGF - β 2).

Estos modelos descritos utilizaron ratones, normalmente sin pelo, Hairless para el estudio de los efectos de la irradiación crónica con radiación ultravioleta, con lesiones cutáneas similares a las humanas en el fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis (*Kambayashi, 2001; Mitani, 2004; Reeve, 2005*). Asimismo existen referencias bibliográficas de **ratones Swiss** (*Gómez, 2007*) y **SKH1/CRL** (*Kolappaswamy, 2009*).

Por otra parte, también existen publicaciones sobre otras líneas con pelo como el **ratón Balb/c**, depilando la zona del dorso que se expondrá a la irradiación UV (*Concepción, 2004*). Este estudio permite definir, sobre la base de los resultados alcanzados, especialmente desde el punto de vista histopatológico, las características antifotoenvejecimiento de diferentes cremas. Se muestran y comparan cortes de piel de ratón, en situación experimental, con empleo de un gel de origen natural derivado del extracto de la planta *Mangifera indica*, de la cual se habían descrito previamente sus propiedades antioxidantes y protectoras.



Asímismo, en el trabajo de Gómez (2007), se estableció un modelo experimental de fotoenvejecimiento cutáneo en los animales de los grupos expuestos a radiación UVA. En ambos grupos aparecieron áreas de displasia epitelial de alto grado en todos los animales y además, en el grupo irradiado y tratado con el promotor tumoral se desarrollaron varios carcinomas en la mitad de los animales (fotocarcinogénesis), a pesar de la menor duración del tratamiento. Estos hechos confirman la importancia de la exposición crónica a las radiaciones UVA en el origen del fotoenvejecimiento cutáneo, puesto que han originado todo el espectro de signos clínicos e histopatológicos descritos previamente por diversos autores (Bernstein, 1996; Reeve, 2005), consistente en: 1) eritema y telangiectasias superponibles a las lesiones agudas observadas en humanos tras la exposición prolongada al sol (Diffey, 1998); 2) múltiples áreas de engrosamiento cutáneo, que corresponderían a las lesiones de presentación subaguda en humanos y 3) aparición progresiva de arrugas profundas y de lesiones similares a las queratosis actínicas, que semejarían a las lesiones por exposición crónica en humanos (Ananthaswamy, 1998).

En el modelo experimental establecido por Cano en 2010 (“Modelo de fotocarcinogénesis cutánea en ratones SKH-1 por radiación ultravioleta”) se comprobó el efecto patológico de la exposición crónica a las radiaciones ultravioleta, puesto que todos los animales tratados desarrollaron arrugas longitudinales profundas, engrosamientos, queratosis y telangiectasias, así como displasia de diferente grado, carcinomas «in situ» y carcinomas invasores. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores en los últimos años, en estudios similares realizados sobre ratones Swiss y hairless. Debido a la gran similitud de las lesiones desarrolladas por los animales de forma experimental, con las que tienen lugar en la piel humana tras la exposición crónica a las radiaciones ultravioleta (signos del fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis), conside-

ramos el modelo establecido sobre ratones desnudos SKH-1, idóneo para el estudio de estas patologías, así como para el ensayo de sustancias antioxidantes y fotoprotectoras frente a las mismas (Cano, 2010)

También hemos encontrado referencias de otro protocolo experimental desarrollado, en el cual se irradiaron lotes de animales (**ratas hairless**) de forma aguda, crónica o bien tratados con filtros solares (Mullero, 2005) y se determinaron parámetros bioquímicos reflejo de los radicales libres tanto en sangre como en epidermis. Asimismo, se examinó el daño producido sobre el material genético y el número y capacidad funcional de las células inmunitarias de la piel (células de Langerhans), con varias conclusiones: la RUV determina pérdida de la inmunidad cutánea y alteraciones indicativas de desequilibrio oxidativo. Estos cambios se producen a partir de dosis equivalentes a la dosis eritemógena mínima y también por dosis suberitemógenas y repetidas de RUV, asimilables a las que recibe una persona sometida a exposiciones moderadas al sol. El número de células de Langerhans de la epidermis se correlaciona con diversos parámetros sanguíneos y epidérmicos relacionados con el estrés oxidativo. El hecho de que la actividad de la glutatión peroxidasa y la concentración de glutatión reducido eritrocitarios sean predictores del número de células de Langerhans, sugiere la posibilidad de que dichos parámetros constituyan una alternativa válida para evaluar indirectamente la capacidad inmunitaria cutánea. La determinación del factor de protección solar, basado exclusivamente en la capacidad de prevención del eritema, no ofrece las garantías necesarias para una fotoprotección segura frente a la RUV. Es necesario adoptar nuevos criterios de fotoprotección, basados en indicadores más sensibles y precoces que el eritema. Puesto que muchos de los efectos de la RUV derivan del estrés oxidativo, es muy recomendable desarrollar nuevas fórmulas fotoprotectoras que incluyan principios activos capaces de restaurar el equilibrio oxidativo y de neutralizar los efectos de los radicales libres.



III. OBJETIVOS

1. Establecer un modelo de fotoenvejecimiento cutáneo en ratones SKH-1, mediante la exposición crónica a Radiación Ultravioleta.
2. Estudiar los efectos de los aceites de almendras dulces y de la crisálida del gusano de la seda, sobre el citado modelo de fotoenvejecimiento.
3. Determinar el comportamiento biológico y la capacidad de invasión de los tumores desarrollados, mediante técnicas inmunohistoquímicas (marcador de proliferación celular PCNA, metaloproteinasa-9 e inhibidor de metaloproteinasas TIMP-1).



IV. MATERIAL Y MÉTODOS

A. MATERIAL

a. Animales

Hemos utilizado **60 ratones SKH1/CRL**, hembras de cuatro semanas de edad al principio del experimento. Los animales procedían del Servicio de Animales de Laboratorio (SAI, nº REGAES 300305440012) de la Universidad de Murcia. Los ratones pertenecen a la cepa SKH1/CRL; son ratones eutímicos e inmunocompetentes.

Todos los animales han sido mantenidos en habitación con fotoperiodo luz-oscuridad 12-12 horas y aporte de comida y bebida “ad libitum”. Han sido tratados según las normas de la Unión Europea sobre la protección de animales utilizados en experimentación (2010 / 63 / UE). Asimismo, el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia ha aprobado todos los experimentos.



■ **Figura 54.**
Ratón
SKH1/CRL

Los ratones se dividieron en tres grupos:

- **Grupo I** Control (n=21): Irradiados con radiación ultravioleta (RUV).
- **Grupo II** (n=18): RUV + aceite de almendras dulces.
- **Grupo III** (n=21): RUV + aceite de la crisálida del gusano de la seda.

Grupo	Nº Ratones (n)	Irradiados RUV	Agente
Grupo I (Control)	21	Sí	Ninguno = Control
Grupo II	18	Sí	Aceite Almendras Dulces
Grupo III	21	Sí	Aceite de la crisálida del gusano de seda

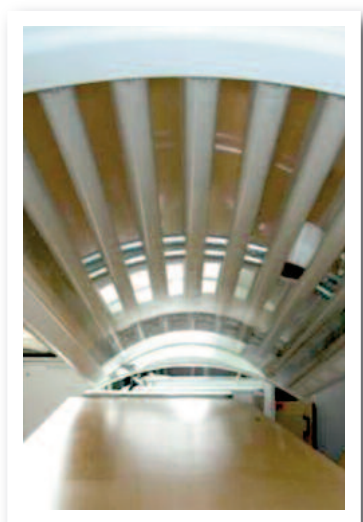
Tabla 9. Distribución de los grupos y tratamiento

b. Lámpara

Para la irradiación de los animales se ha utilizado una lámpara Philips Type HB 554/01/A con 8 tubos Philips ISOLDE 100 W-R35. Esta lámpara emite en un espectro de 220-425 nm y un pico máximo de 364 nm (98,6% UVA y 1,4% UVB).



■ **Figura 55. Lámpara Philips Type HB 554/01/A**



■ **Figura 56. Interior de la lámpara, donde se observan los 8 tubos**

c. Compuestos

Los agentes ensayados en nuestro modelo experimental, aceite de almendras dulces y aceite de crisálida del gusano de la seda, han sido proporcionados amablemente por el Laboratorio PRONAMED (Productos Naturales del Mediterráneo, S.L), de Murcia.



Figura 57. *Gusano de seda*

1. Aceite de almendras dulces

1.1. Composición:

- Distribución de ácidos grasos:
 - **Saturados:** (6-11%): de cadena inferior a C16:0 (<0,1%), C16:0 palmítico (4-9%), C17:0 margárico (<0,2%), C18:0 esteárico (<0,3%), C20:0 araquidónico (<0,2%), C22:0 gadoléico (<0,2%).

- **Monoinsaturados:** (omega-9) (63-87%) C16:1 palmitoleico (<0,6%), C18:1 oleico (62-86%), C20:1 eicosanoico (<0,3%) y C22:1 erúxico (<0,1%).
- **Poliinsaturados:** (10-30%) omega-6: C18:2 linoleico (10-30%); omega-3: C18:3 alfa-linoleico (<0,5%).
- Punto de solidificación: en torno a -18°C
- Densidad relativa (20°C); 0,91-0,92 (g/ml).
- Acidez (mg KOH/g) aceite virgen: máximo 2,0; aceite refinado: máximo 0,5.
- Índice de peróxidos (máx. meq O₂/Kg); aceite virgen: máximo 15,0; aceite refinado: máximo 5,0.
- Insaponificable: 0,5% - 0,7%.
- Otros componentes: tocoferoles (como alfa-tocoferol; vitamina E 0-30 mg/100 mg) y otros esteroides (sobre todo beta-sitosterol 73-87%), glucosidos, oleína, minerales, vitaminas A y B y proteínas.
- Aspecto: líquido amarillento.
- Solubilidad: insoluble en agua.

2. Aceite de crisálida del gusano de la seda (*bombix mori*).

2.1. Componentes

El aceite de crisálida es un extracto graso y como tal, sus principales componentes son los ácidos grasos, saturados e insaturados, de los que destacan:

- ácido linoleico (55,4%)
- ácido palmítico (18,4%)
- ácido oléico (18%)
- ácido esteárico (8,2%)

Además contiene aminoácidos (288 mg/100 g) como la treonina, valina, ácido glutámico, fenilalanina, serina, alanina y lisina, y oligoelementos como fósforo (232 ppm), zinc (207 ppm), sodio (79 ppm), potasio (375 ppm), magnesio (3 ppm), calcio (12 ppm). También vitaminas A y D.

2.2. Extracción con acetato de etilo:

El extracto de la crisálida del gusano de seda se obtiene mediante extracción con acetato de etilo, con el siguiente procedimiento:

1. En un recipiente cerrado, se deja macerar la crisálida en acetato de etilo a temperatura ambiente durante 24-48 horas.
2. Se realiza un filtrado para eliminar restos.
3. El producto filtrado se destila para eliminar el disolvente.
4. El resto purificado que queda en el depósito del destilador se mantiene unos 8 días en autoclave Machatan con vacío, a unos 40°C aproximadamente, para que no quede ningún resto de disolvente. Se obtiene una pasta cerosa que se disuelve en aceite de almendras en distintas proporciones en el momento de su utilización. Esta forma de extracción está destinada sobre todo a su uso disuelto en aceite de almendras.

2.3 Fórmula:

Aceite de almendras dulces	36,45%
Vaselina líquida / parafina líquida	30,00%
Miristato de isopropilo	15,00%
Aceite del gusano de la seda al 20%	8,00%
Estol 1527	5,00%
Vitamina F	5,00%

Alfa-bisabobol	0,30%
Vitamina E	0,25%

2.4. Estudio de la estabilidad térmica del aceite de crisálida de la seda:

El índice de estabilidad del aceite se define como el punto de cambio máximo de la tasa de oxidación. En el caso del aceite de crisálida, el punto terminal se determinó a los 222 °C para la muestra sin antioxidante y a 239°C en el caso de la muestra con vitamina E. Por tanto, el antioxidante provee al aceite de 17 grados más de estabilidad cuando se somete a un aumento de temperatura.

Además, durante el calentamiento del aceite de crisálida, se ha demostrado que éste sufre una variación positiva de $8,24\% \pm 1\%$ de promedio en su densidad. El índice de refracción por su parte, presenta una variación de $0,0155 \pm 0,005$ unidades, siendo estos valores de incremento en el caso del aceite con vitamina D, similares dentro del error evaluado.

En cuanto a los parámetros de acidez y peróxidos, el aceite de crisálida solo o con antioxidante, es estable tras el calentamiento. Esto nos indica su estabilidad a la hidrólisis y a la peroxidación lipídica hasta los 200 °C por el periodo de 2 horas de calentamiento. El análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases - espectrometría de masas es un indicador fundamental para demostrar que los ácidos grasos no sufren variación significativa durante el calentamiento en todos los casos $\pm 1\%$.

En el caso del aceite de crisálida, la adicción de vitamina E como antioxidante sí tiene su influencia en la estabilidad térmica. La muestra con vitamina E incrementa desde los 222 °C a los 239 °C, demostrando así que el antioxidante provee al aceite de mayor estabilidad al someterlo a un aumento de temperatura.

B. MÉTODOS

a. Procedimiento experimental

Los animales se dispusieron en jaulas de metacrilato transparente de 40x30 cm, con cubierta metálica de rejas y con espacio para alimento y agua.

La irradiación UVA se ha realizado 3 veces por semana, con una duración de 60 minutos por sesión, durante un total de 80 sesiones. Para ello, se situaba a los animales en jaulas de PVC con separadores individuales para cada ratón y una cubierta de celosía metálica y se colocaban bajo la lámpara de luz ultravioleta a una distancia foco/piel de 20 cm.

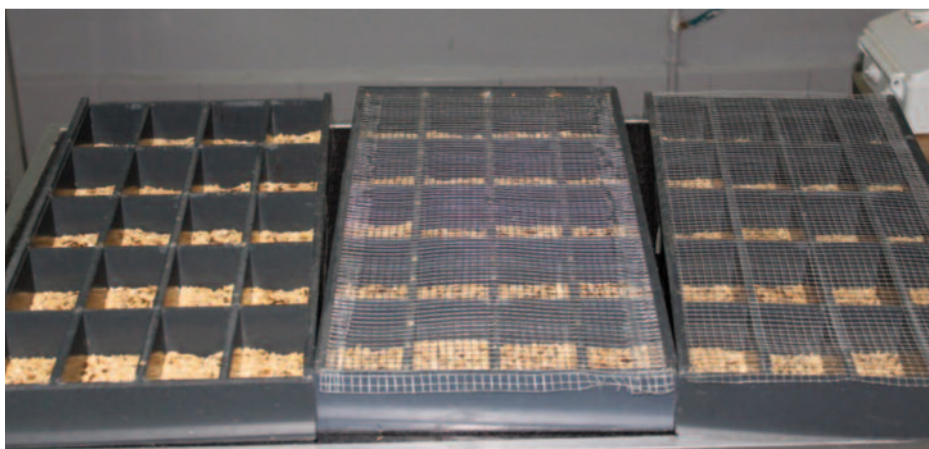


Figura 58. Jaulas donde se disponían los animales durante las sesiones

La energía absorbida por sesión fue de $21,1 \text{ J/cm}^2$, por lo que al final de las 80 sesiones, la energía total absorbida por cada animal fue de 1.688 J/cm^2 .

La aplicación tópica de los aceites de almendras dulces y de crisálida del gusano de la seda se realizó inmediatamente antes de la exposición a las radiaciones, pincelando la piel del dorso de todos los animales irradiados, con un pincel de uso cosmético.

b. Estudio macroscópico

Durante cada aplicación tópica de los agentes, se observaba con detenimiento la piel del lomo de los animales en busca de cambios tisulares macroscópicos.

Además, siguiendo el procedimiento utilizado por Feng (2006), registramos el tiempo en semanas en el que el 50% de los animales de cada grupo había desarrollado tumores.

Al finalizar el experimento, realizamos fotografías digitales de los animales junto a papel milimetrado, que fueron estudiadas mediante análisis de imagen.

Tras realizar un calibrado morfológico, dibujamos manualmente una línea para obtener la medida en milímetros, del diámetro mayor de las lesiones.

c. Método anatomopatológico

Tras el proceso experimental, se procedió a la eutanasia de todos los animales del estudio mediante exanguinación total por punción cardíaca, previamente anestesiados con isofluorano. A continuación se realizó la necropsia extirpando la piel del lomo, así como las

vísceras (pulmones, riñones e hígado). Las muestras recogidas fueron fijadas en formal neutro tamponado al 10%, al menos durante 48 horas, e incluidas en parafina por el método habitual:

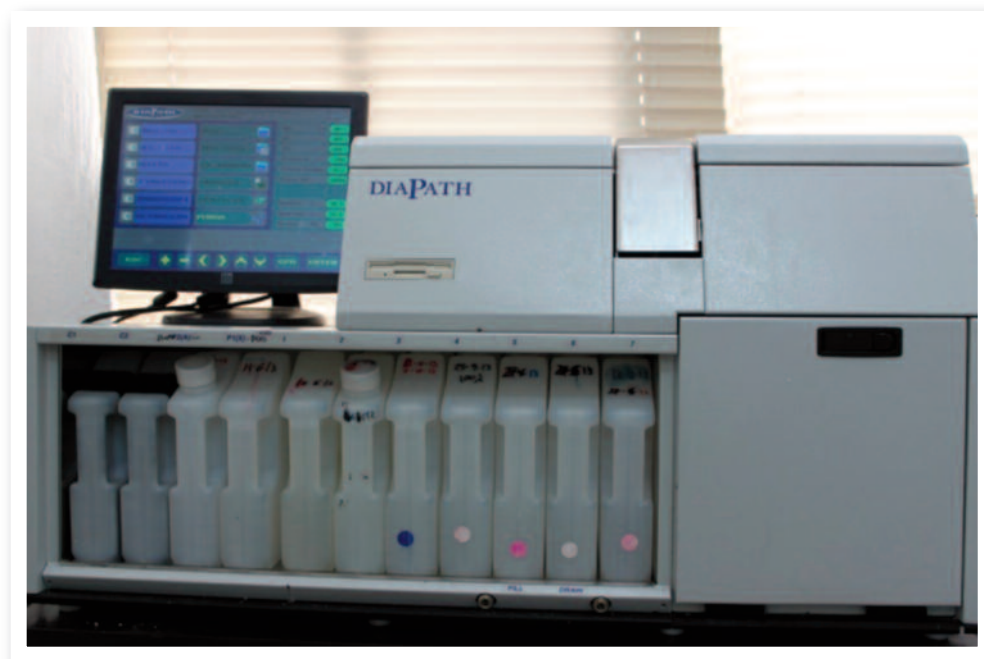


Figura 59. *Incluidor automatic DiaPath*

De los bloques de parafina se realizaron secciones histológicas de 3 μ que fueron teñidas con Hematoxilina-eosina (H&E) y Ver Hoeff-Van Hienso



■ **Figura 60. *Microtomo Thermo HM 355S***

El estudio microscópico y microfotográfico se realizó con un microscopio LEICA DM 4000 B.Wetzlar. Alemania:



■ **Figura 61. *Microscopio Leica DM 4000B***

ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Fue realizado en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Reina Sofía de Murcia.

Realizamos el estudio inmunohistoquímico de las pieles en todos los animales tratados y control con los siguientes anticuerpos: Anti-PCNA, Anti-MMP-9, Anti-TIMP y Anti-CD3/CD20. Los reactivos procedían de la casa comercial Dako (Dako Diagnósticos, S.A., Barcelona, España). Para la realización de la inmunotinción se procedió de la siguiente forma:

Después de desparafinar y bloquear la peroxidasa endógena con agua oxigenada al 3% durante 30 minutos, se desenmascaró el antígeno de las muestras con tampón citrato (Panreac) a pH=6 en microondas, a potencia 1 durante 10 minutos, y se dejaron enfriar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después, se lavaron con PBS y se incubaron los tejidos con suero normal de cabra (Millipore) al 10% durante 1h a temperatura ambiente. Después se incubaron las secciones con el anticuerpo monoclonal primario correspondiente a dilución 1:200 (PCNA y CD20) ó 1:400 (CD3, MMP-9 y TIMP) durante toda la noche a 4°C. Entonces, se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario Goat anti-mouse biotinado (Dako), durante 1h a tª ambiente, y finalmente se incubaron con el complejo avidina-biotina- peroxidasa (Cultek) a dilución 1:100 durante 1 h más a tª ambiente. El relevado de la inmunotinción se hizo con diaminobenzidina (Sigma-Aldrich) durante 3,5 minutos y las muestras se contrastaron con Hematoxilina de Mayers.

El estudio semicuantitativo de la expresión de los diferentes anticuerpos se realizó mediante la visualización de las preparaciones histológicas con el equipo Leica SCN400F, por dos observadores experimentados, blindados a los resultados del estudio. Se determinó

la intensidad del marcaje de cada anticuerpo en el estroma, vasos, glándulas sebáceas y epitelio, otorgando la puntuación 0 cuando no existía marcaje, 1 cuando la intensidad de éste era leve, 2 cuando era moderado y 3 cuando era severo.

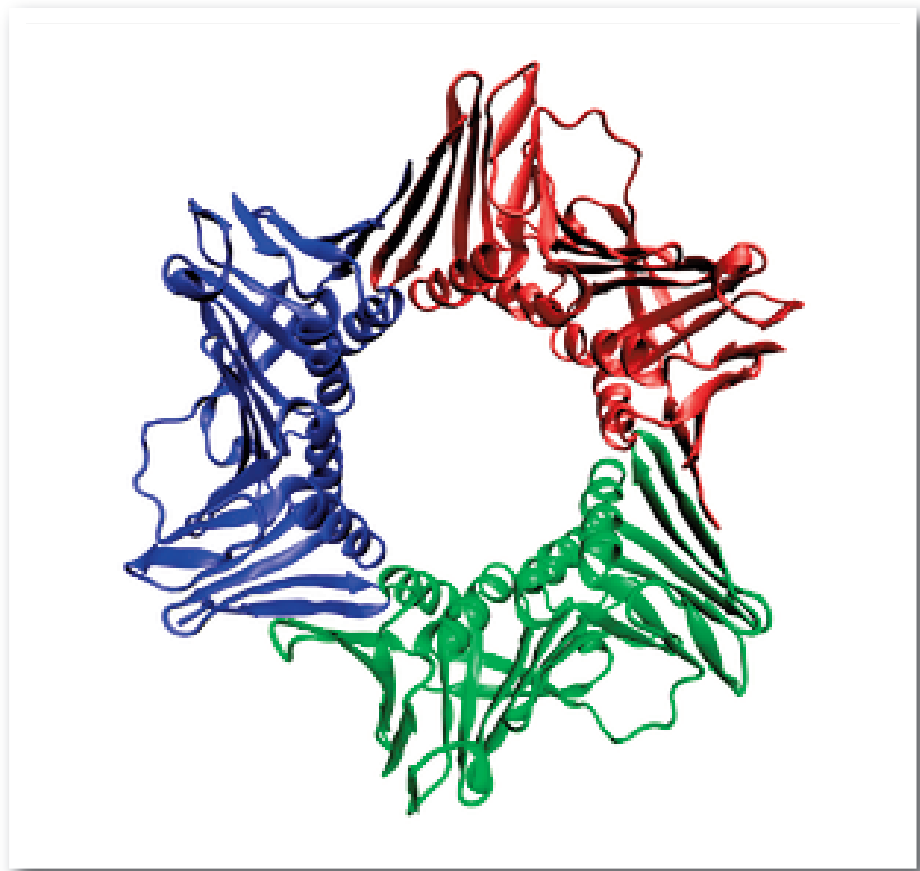


Figura 62. *Proteína PCNA*

Evaluación e interpretación de los resultados

En las muestras teñidas con H.E., se ha evaluado la presencia de hiperplasia, displasia (I, II y III), carcinoma in situ y carcinoma invasor, para posteriormente, semicuantificar la cantidad de la inmunotinción dependiendo de la lesión observada. La semicuantificación se ha hecho a ciegas por triplicado utilizando un microscopio óptico Axioscope (Zeiss) acoplado a una cámara AxioCam MRc5 (Zeiss), haciendo una evaluación subjetiva utilizando una escala de 0 (ausencia) a 3 (máxima intensidad observada).



Figura 63. Microscopio óptico Axioscope (Zeiss) acoplado a una cámara AxioCam MRc5 (Zeiss)

Análisis de imagen

Para el análisis de los resultados, determinamos tres variables en cada uno de los cuatro grupos experimentales:

1. El número de lesiones que presentaba cada animal.
2. El tamaño medio de la lesión.
3. Semana de aparición de la primera lesión.

Para la cuantificación de la primera y segunda de las variables, con el objetivo de medir el área de la piel del lomo ocupada por lesiones macroscópicas (sin hacer distinción de su morfología), tras la última sesión de radiación UV, realizamos fotografías digitales en color a todos los animales (cámara Canon EOS 500D), colocándolos junto a un papel milimetrado. Utilizamos una aplicación del programa de análisis de imagen Leica Qwin, dibujando una máscara binaria de las áreas de lesión, que posteriormente se midieron individualmente.

Para la tercera utilizamos las anotaciones que se habían realizado con periodicidad semanal, a la vez que eran pesados los animales, determinando la presencia o ausencia de lesión, cuando se observaba macroscópicamente abultamiento en la piel del ratón; a continuación se fotografiaba con cámara Canon EOS 500D y con el software mencionado anteriormente se realizaba la medición. Establecimos como el criterio para la determinación de la presencia de lesión, el que ésta tuviera las siguientes medidas: área mayor o igual a 1 mm² y perímetro mayor o igual 3,5 mm.

d. Método Estadístico

Se realizó en colaboración con la Cátedra de Bioestadística de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, a través del software *ANOVA SPSS® v12.0 (SPSS® Inc, Chicago, USA)* mediante el que efectuamos los siguientes procedimientos estadísticos:



Para el análisis descriptivo de las variables observadas y para medir la distribución de las frecuencias entre los grupos, se han calculado los parámetros característicos: media, desviación típica y los valores máximos y mínimos.

En segundo lugar para determinar el grado de asociación estadística entre las variables en estudio, se realizó el análisis de varianza de una vía, complementando con el contraste de igualdad de pares de medias, con el método de la mínima diferencia significativa y con la corrección de Bonferroni, junto con el *t-student* previa conversión a logaritmo neperiano en el las áreas de lesión. Consideramos como estadísticamente significativos los valores de *p* iguales o inferiores a 0,05.



V. RESULTADOS

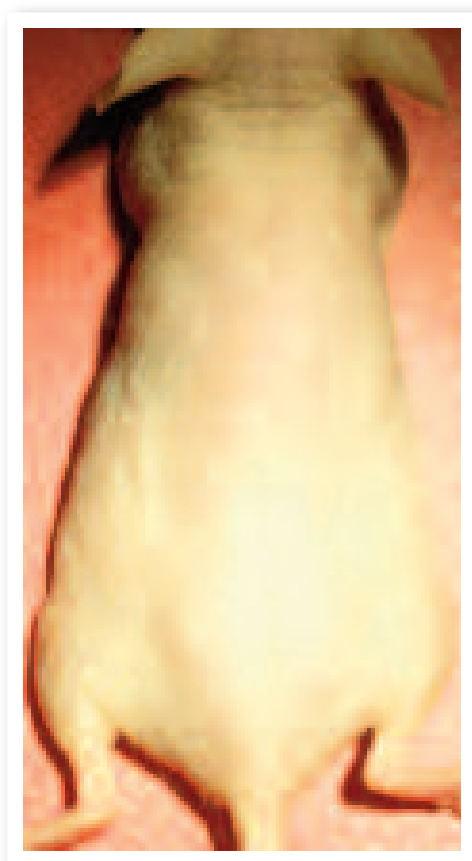


Figura 65. *Ratón SKH-1 sano no sometido a radiación ultravioleta*

Todos los animales sometidos a la exposición de las radiaciones ultravioleta presentaron a lo largo del experimento múltiples lesiones; no obstante, existían diferencias entre las lesiones de los animales de los diferentes grupos, en relación con el tiempo de presentación de las mismas, su extensión, intensidad, etc.

La presentación de los resultados la realizaremos desde los tres enfoques analizados: macroscópico, microscópico e inmunohistoquímico.

A. ESTUDIO MACROSCÓPICO

a. Grupo I – Control (RUV)

Los primeros cambios observados en los animales expuestos exclusivamente a la radiación ultravioleta (RUV) correspondieron a la presentación de eritema difuso, con predominio en toda la zona del dorso: lomo, cabeza y orejas. Se presentaba desde la primera sesión y era pasajero durante las tres o cuatro primeras semanas, ya que desaparecía entre treinta y sesenta minutos después de acabar la exposición a la radiación.

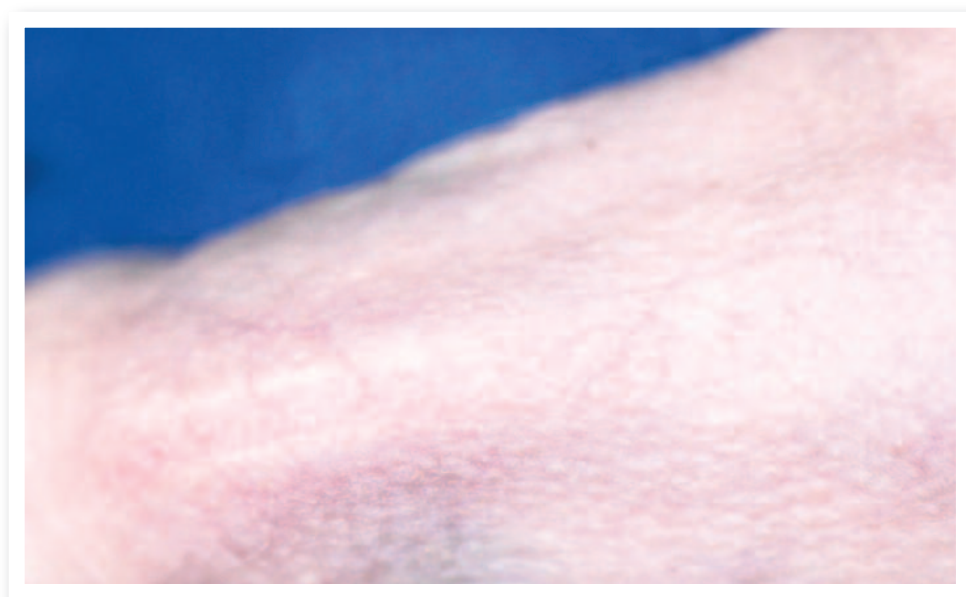
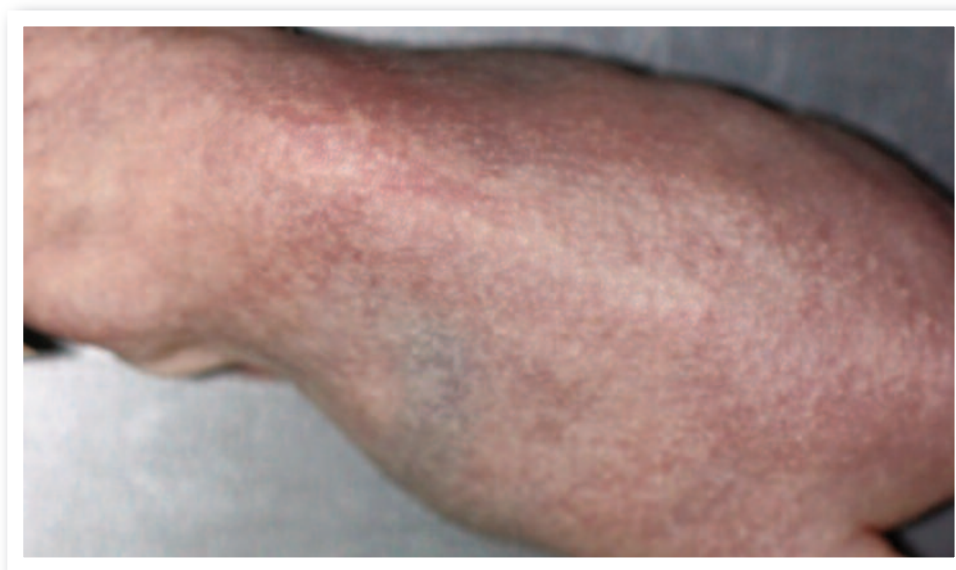
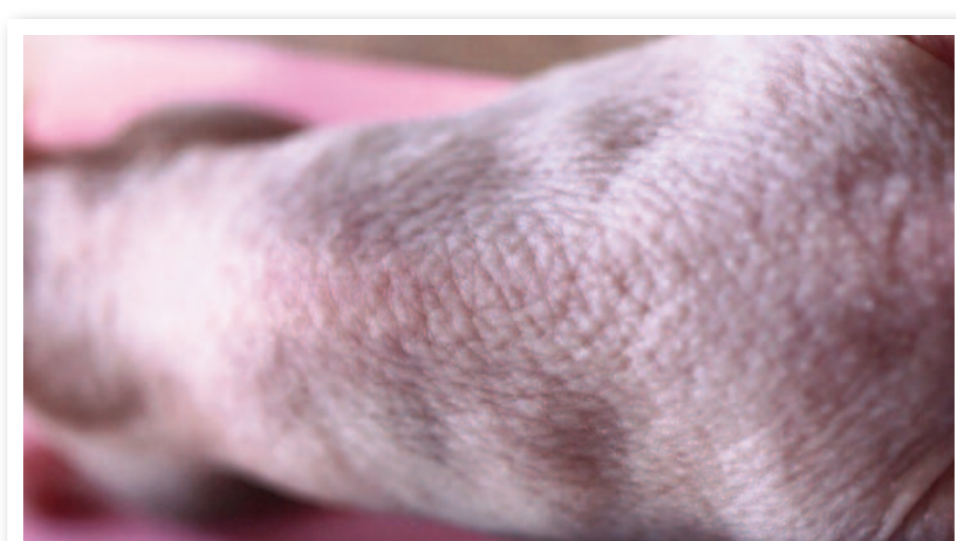


Figura 66. *Grupo I: Control RUV. Eritema difuso*

A partir de la quinta semana, el eritema se hacía permanente, mostraba una coloración rojo violácea de aspecto reticular o telangiectásico característico.



■ **Figura 67. Grupo I: Eritema con aspecto reticular**



■ **Figura 68. Grupo I: Engrosamiento irregular**

A partir de las 25 sesiones (7ª - 8ª semanas), se observaba engrosamiento cutáneo irregular, de aspecto granular difuso que se acompañaba con frecuencia de superficie escamosa y un marcado patrón geométrico de la piel.

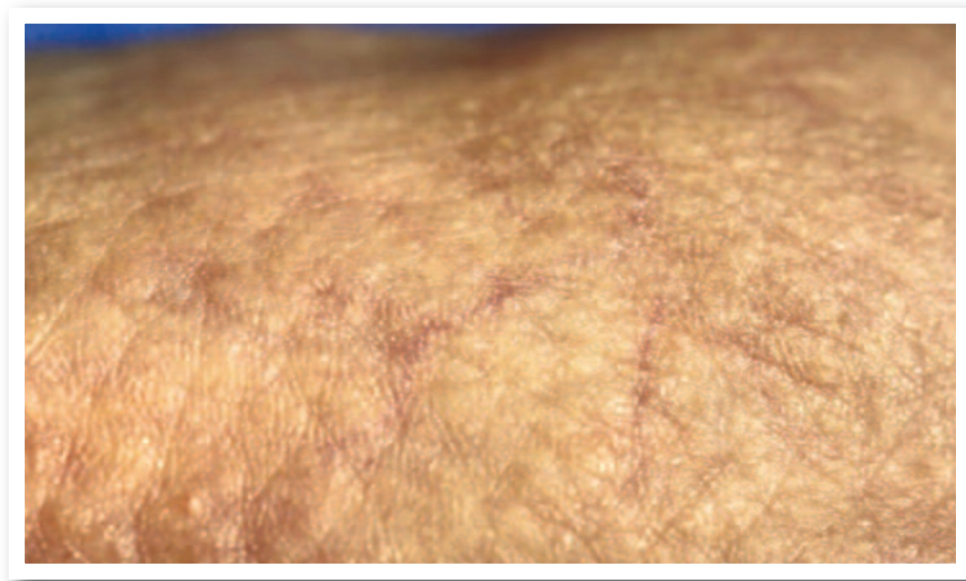
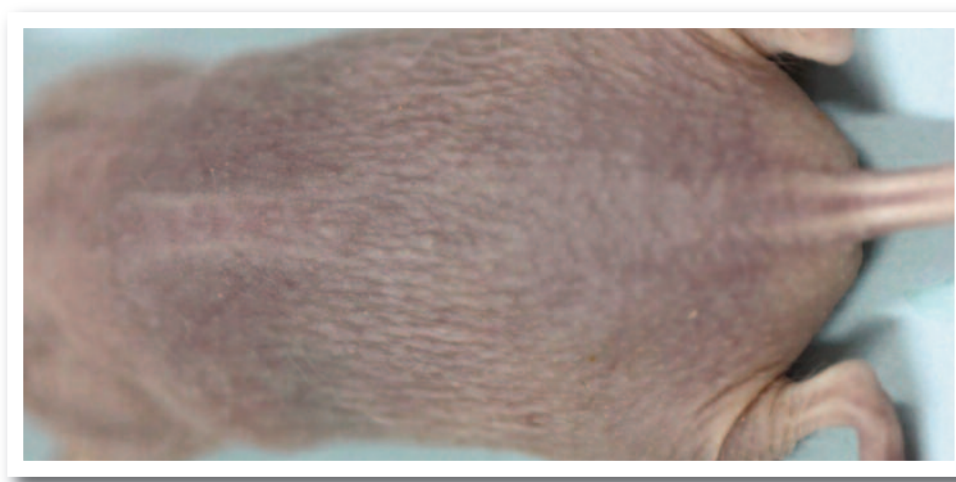


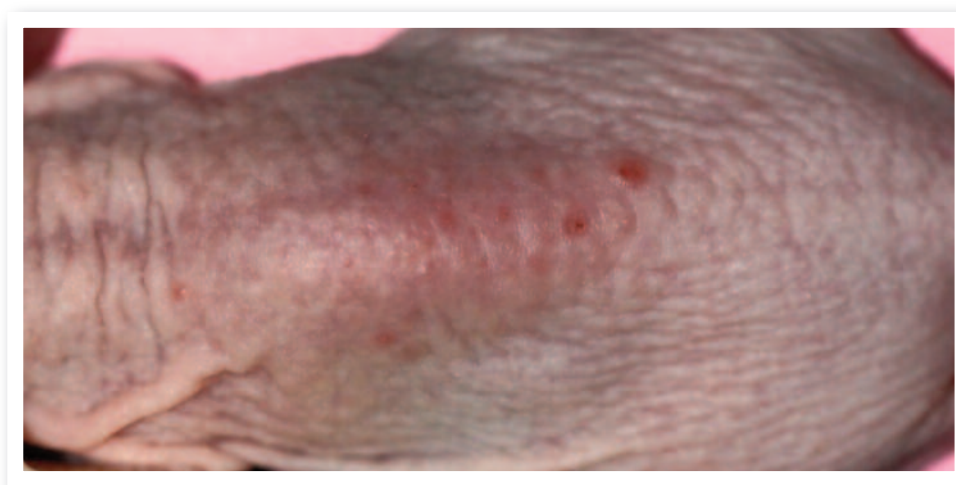
Figura 69. Grupo I: Arrugas cutáneas

A partir de la décima o undécima semana, en especial a partir de la decimosegunda, aparecían arrugas cutáneas. En principio eran de disposición longitudinal, localizándose en toda la superficie dorsal de los animales y alternaban con otras zonas cutáneas de engrosamiento irregular. Estas lesiones se mantenían durante todo el experimento y se acompañaban de engrosamiento nodular difuso y progresivo. En las zonas con lesiones neoplásicas, las arrugas se disponían de forma radial a los tumores.



■ **Figura 70. Grupo I: Arrugas cutáneas**

En semanas posteriores, aparecieron las lesiones eritemato-escamosas, caracterizadas por la presencia de lesiones escamosas situadas sobre las zonas de eritema, que al principio eran de aspecto puntiforme y progresivamente se iban haciendo más extensas e incluso confluían en placas irregulares; con frecuencia el centro era de aspecto erosivo y bordes sobreelevados y se recubrían por costras fibrino-hemorrágicas.



■ **Figura 71. Grupo I: Lesiones eritemato-escamosas**

A partir de 50 sesiones, toda la superficie cutánea del dorso se caracterizaba por la presencia de áreas con engrosamiento cutáneo irregular de aspecto queratósico, que frecuentemente se mostraban firmes al tacto, e incluso con fijación a los tejidos subyacentes. A partir de este periodo, dichas lesiones se hacían erosivas, y estaban cubiertas por costras fibrinógenas escamosas, que tendían a confluir en placas de límites irregulares. Las de mayor volumen se cubrían de costras hemorrágicas, con bordes sobreelevados y que generalmente, estaban fijados a planos profundos.

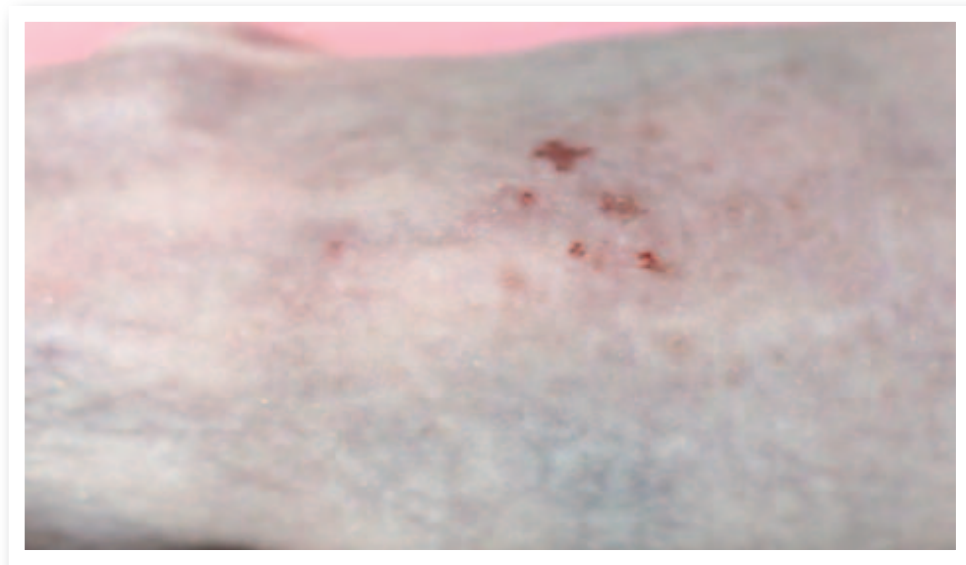
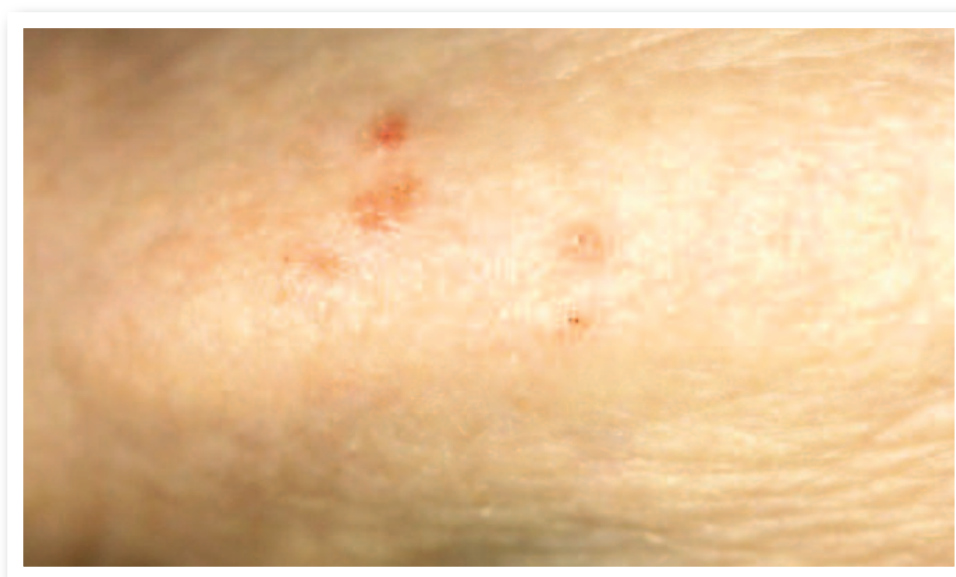


Figura 72. Grupo I: Lesiones erosivas

Las lesiones ulceradas fueron también muy frecuentes a partir de este periodo. Generalmente mostraban bordes irregulares, que en algunas zonas estaban engrosados; se disponían en el seno de las áreas eritematosas o de forma individualizada.



■ **Figura 73. Grupo I: Lesiones queratósicas con arrugas longitudinales**



■ **Figura 74. Grupo I: Lesiones queratósicas nodulares erosionadas**

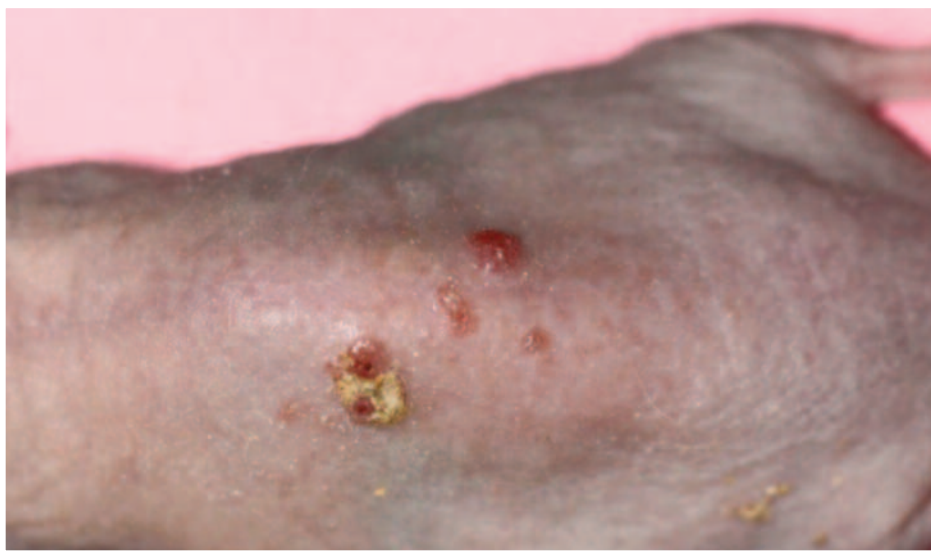


Figura 75. Grupo I: Lesiones queratósicas nodulares

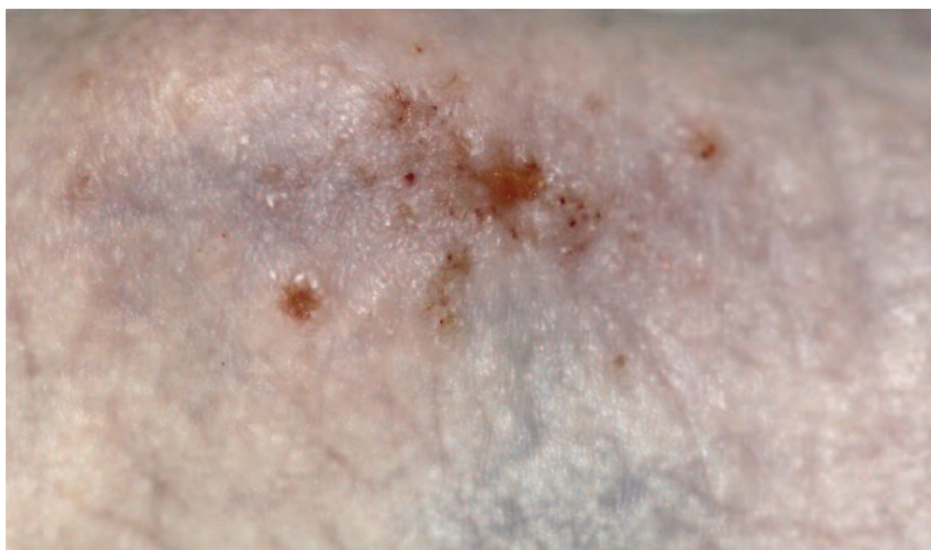


Figura 76. Grupo I: Lesiones queratósicas y erosivas, centralmente ulceradas

A partir de 60 sesiones, era constante la presencia de lesiones tumorales nodulares, generalmente múltiples. La mayoría de ellas se encontraban en relación con las zonas de engrosamiento queratósico, mientras que en otras áreas se disponían de forma aislada. Muchas de ellas se encontraban ulceradas. Con menos frecuencia, las lesiones tumorales adoptaban un aspecto verrucoso o papilomatoso, con la porción central deprimida de aspecto crateriforme recubierto de costra queratósica.

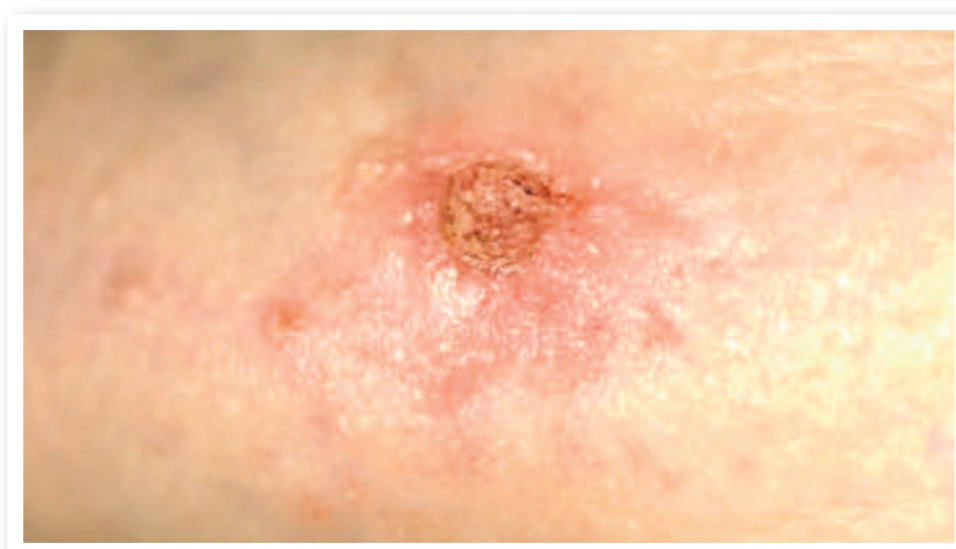


Figura 77. Grupo I: Lesiones erosivas con amplia ulceración



Figura 78. *Grupo I: Lesión ulcerada de borde sobreelevado*



Figura 79. *Grupo I: Lesiones nodulares*



■ **Figura 80. Grupo I: Lesiones ulceradas**



■ **Figura 81. Grupo I: Múltiples lesiones nodulares erosivas**



Figura 82. *Grupo I: Lesión tumoral con cráter queratósico*

b. Grupo II (RUV + Aceite de almendras dulces)

La evolución de las lesiones cutáneas de los animales de este grupo fueron muy similares a las del Grupo I (RUV), durante las primeras 50 sesiones. Se caracterizaron por la aparición de eritema difuso por el dorso de los animales, de las mismas características del grupo anterior.



Figura 83. Grupo II: RUV + Aceite Almendras Dulces. Eritema difuso

A continuación, mostraron engrosamiento cutáneo irregular con reforzamiento del patrón geométrico de la piel, así como múltiples arrugas longitudinales a lo largo del dorso.

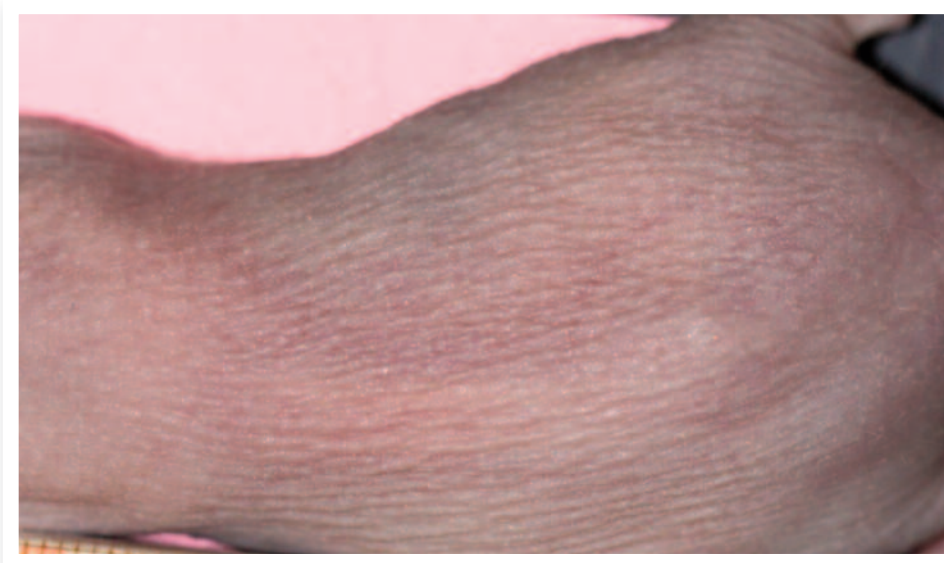


Figura 84. Grupo II: Arrugas longitudinales

Hacia las doce semanas se presentaron múltiples lesiones eritemato-escamosas, con aumento progresivo del número y tamaño y con tendencia a confluir en placas irregulares, más o menos extensas. Los de mayor tamaño mostraron centros erosivos y bordes sobreelevados y estaban tapizados por costras fibrino-hemorrágicas.



Figura 85. Grupo II: Lesiones queratóticas y erosivas, centralmente ulceradas

A partir de cincuenta sesiones, de modo similar al grupo anterior, se presentaron lesiones de aspecto nodular y queratósico, de superficie erosiva, de mayor diámetro y con tendencia a la ulceración en las sesiones siguientes. A partir de sesenta sesiones, casi todas estaban ulceradas y mostraban bordes sobreelevados con arrugas prominentes, irradiando hacia la periferia. En casi todos los animales se observaron grandes lesiones nodulares de centro deprimido y con aspecto de cráter queratósico.



■ **Figura 86. Grupo II: Lesiones nodulares erosivas**



■ **Figura 87. Grupo II: Lesiones nodulares erosivas**



Figura 88. Grupo II: Lesiones ulceradas



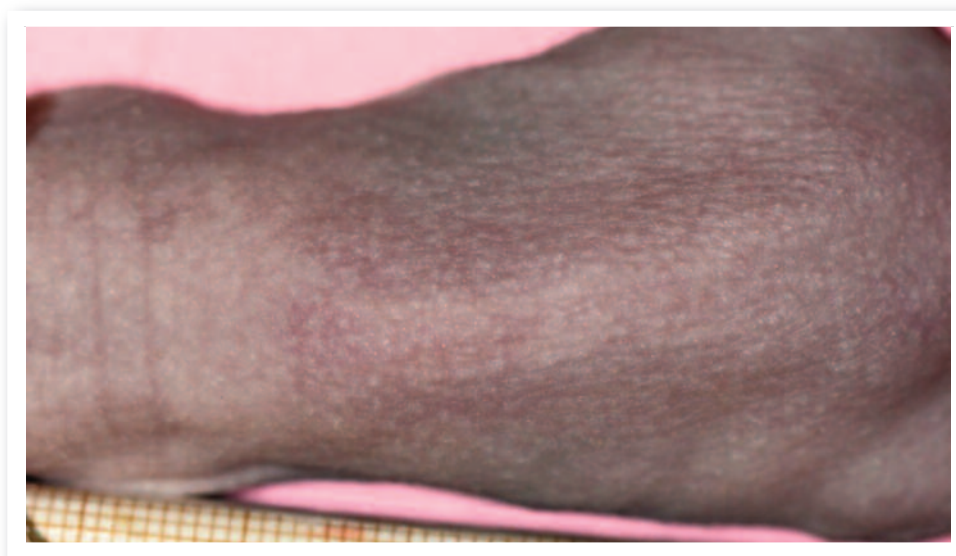
Figura 89. Grupo II: Lesión tumoral con cráter central queratósico

El área total ocupada por lesiones en estos animales fue de 176,48 mm², con una incidencia tumoral del 85-100%. X animales no desarrollaron carcinomas.

c. Grupo III (RUV + Aceite de crisálida del gusano de la seda)

Las lesiones cutáneas evolucionaron de forma similar a la de los grupos anteriores aunque con mayor lentitud, de forma que se hacían patentes alrededor de dos o tres semanas más tarde que en los grupos anteriores. Asimismo, alcanzaban diámetros menores y afectaban a áreas cutáneas menos extensas.

El eritema difuso se presentó en la primera semana, como en los otros dos grupos.



■ **Figura 90. Grupo II: Eritema difuso**

Las arrugas se presentaron cuatro semanas más tarde que en los grupos I y II, a partir de la 40ª.



Figura 91. Grupo II: Arrugas longitudinales

Las lesiones eritemato-erosivas patentes no se observaron antes de las 65 sesiones. En dos animales no se presentaron lesiones de estas características.



Figura 92. Grupo II: Lesiones eritemato-escamosas



■ **Figura 93. Grupo II: Lesiones eritemato-escamosas**

Las lesiones queratósicas, las ulceradas y las neoformaciones nodulares no eran patentes antes de las 70 sesiones.



■ **Figura 94 Grupo II: Lesiones nodulares**



Figura 95. Grupo II: Lesiones eritemato-escamosas

Así, el área ocupada por lesiones en la piel de estos animales fue de 115,67 mm², con una desviación estándar de 34,65, mientras que la incidencia tumoral observada en este grupo fue de 70-80%. ¿falta esto en el control

El conteo de núcleos positivos para PCNA fue de $\bar{x} \pm x'\%$.

d. Resultados comparativos entre grupos

1. Áreas de las lesiones cutáneas que presentaba cada animal:

GRUPO I – Control (RUV)		GRUPO II (RUV + Almendras dulces)		GRUPO III (RUV + Aceite de crisálida de gusano de seda)	
Ratón nº	Área (mm ²)	Ratón nº	Área (mm ²)	Ratón nº	Área (mm ²)
1	210,10	1	191,10	1	160,30
2	180,40	2	198,30	2	88,15
3	241,33	3	200,50	3	103,25
4	200,20	4	123,10	4	184,70
5	190,10	5	194,40	5	110,15
6	185,23	6	98,50	6	140,10
7	204,10	7	210,50	7	83,60
8	215,60	8	186,60	8	133,45
9	200,50	9	201,30	9	66,40
10	287,21	10	194,30	10	93,80
11	99,43	11	93,20	11	123,35
12	195,10	12	219,15	12	84,15
13	300,10	13	198,30	13	110,40
14	88,75	14	94,15	14	192,30
15	98,00	15	277,42	15	80,30
16	299,10	16	192,40	16	94,50
17	180,15	17	203,60	17	152,60
18	98,13	18	99,80	18	132,40
19	261,15			19	86,50
20	192,00			20	110,23
21	180,40			21	98,43

Tabla 10. Áreas de las lesiones cutáneas de cada ratón

	GRUPO I (Control)	GRUPO II (RUV + Almendras dulces)	GRUPO III (RUV + Aceite de crisálida de gusano de seda)
Media superficie mm ²	195,58	176,48	115,67
Desviación estándar	62,32	51,89	34,65

Tabla 11. Media y desviación estándar de la superficie de las lesiones de cada grupo

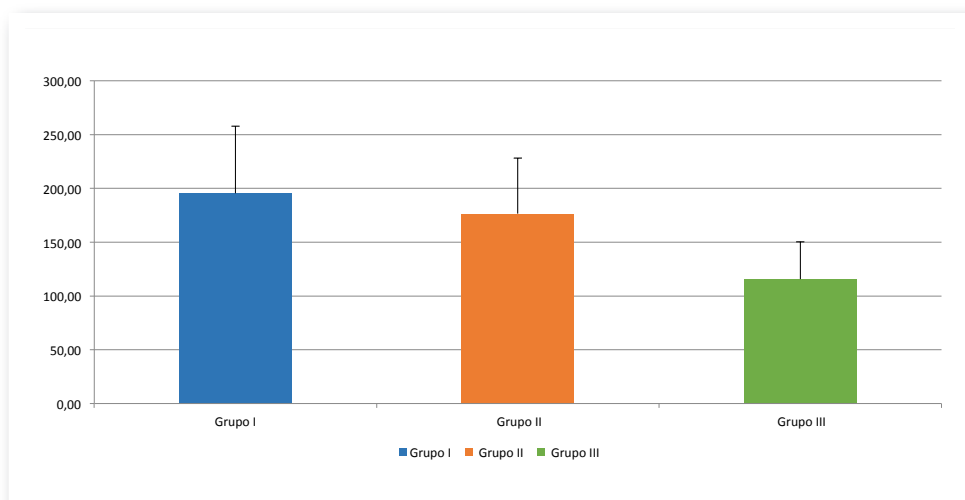


Figura 96. Áreas de lesión en los diferentes grupos

2. Tiempo de presentación de las alteraciones macroscópicas en semanas:

Tiempo de presentación de las lesiones macroscópicas en semanas	GRUPO I Control (RUV)	GRUPO II (RUV + Almendras dulces)	GRUPO III (RUV + Aceite Crisálida Seda)
Eritema difuso pasajero	1	1	1
Eritema aspecto reticular o telangiectásico	15	15	21
Engrosamiento irregular	25	25	31
Arrugas cutáneas (longitudinales y Radiales)	36	36	40
Lesiones eritemato-escamosas	36	36	45
Lesiones queratósicas nodulares	50	50	56
Lesiones erosivas	50	50	56
Lesiones ulceradas	50	50	56
Lesiones tumorales	60	60	66

Tabla 12. *Tiempo de presentación (en semanas) de las lesiones macroscópicas*

Como se observa en la tabla y en el gráfico siguiente, en el grupo I (control) y II (aceite de almendras dulces), las lesiones se presentaban de modo similar, mientras que en el grupo tratado con el aceite de crisálida del gusano de seda, se presentaban de forma más tardía:

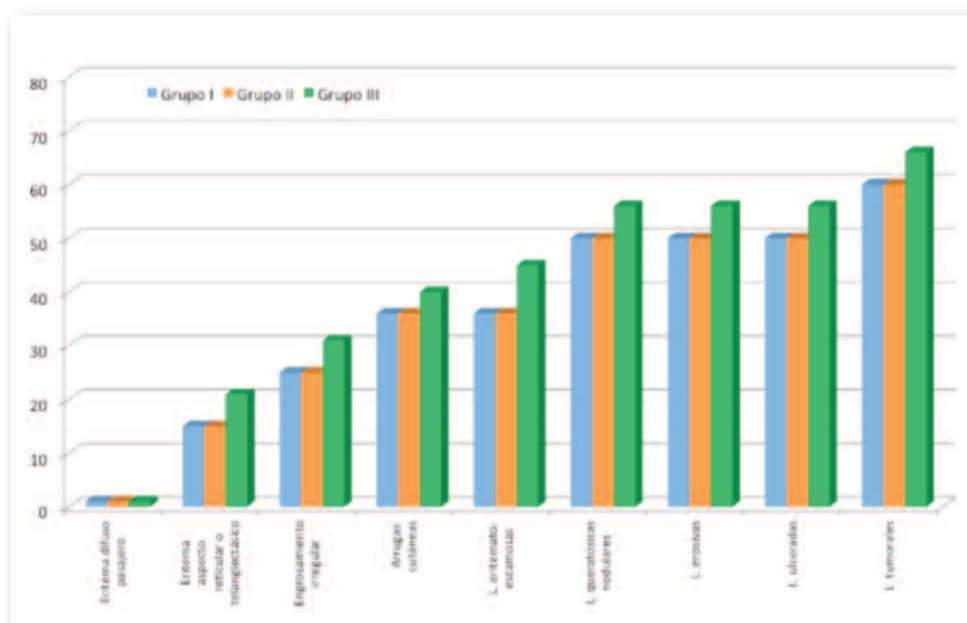


Figura 97. *Semanas de aparición de manifestaciones macroscópicas*

B. ESTUDIO MICROSCÓPICO

Destacaban las áreas de atrofia que alternaban con otras de engrosamiento epitelial. Las de atrofia eran de distinto grado caracterizándose por la disminución del espesor de la epidermis debida al aplanamiento de los queratinocitos, así como al menor número de capas de la epidermis.

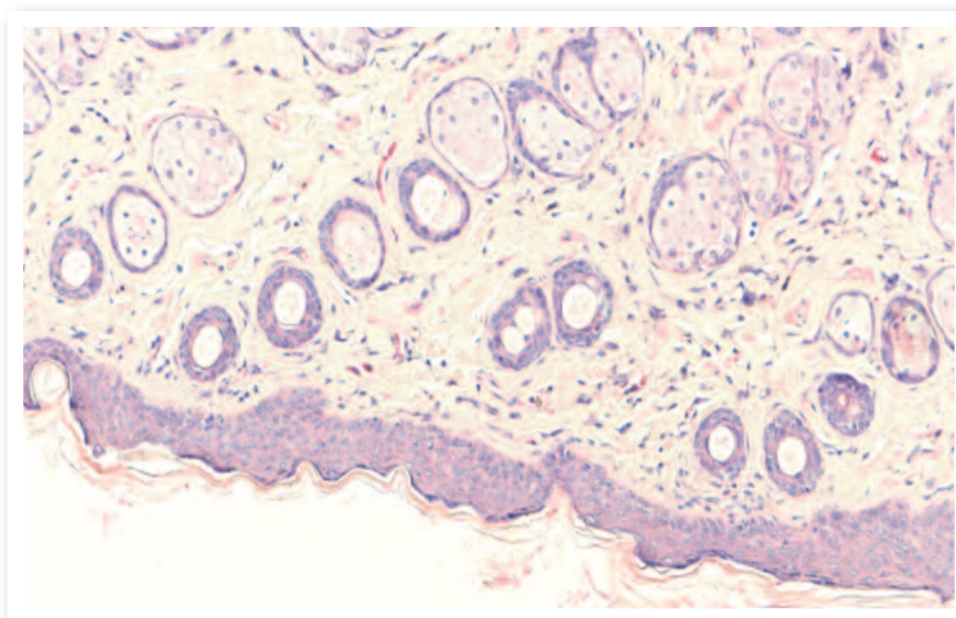


Figura 98.

Sin embargo, en otras zonas, predominaba la hiperplasia de células basales. Este fenómeno era mas frecuentemente observado en las zonas cutáneas próximas a otras que mostraban distintas alteraciones como displasia, carcinoma, etc.. aunque a veces se disponían como focos aislados. Estaban constituidos por varias hileras (entre 3 y 10) de queratinocitos basales, de morfología poligonal con núcleos voluminosos y

citoplasmas escasos. Los ejes mayores de los núcleos se disponían perpendicularmente a la membrana basal epidérmica. Los nucleolos eran voluminosos y en ocasiones se observaban algunas mitosis.

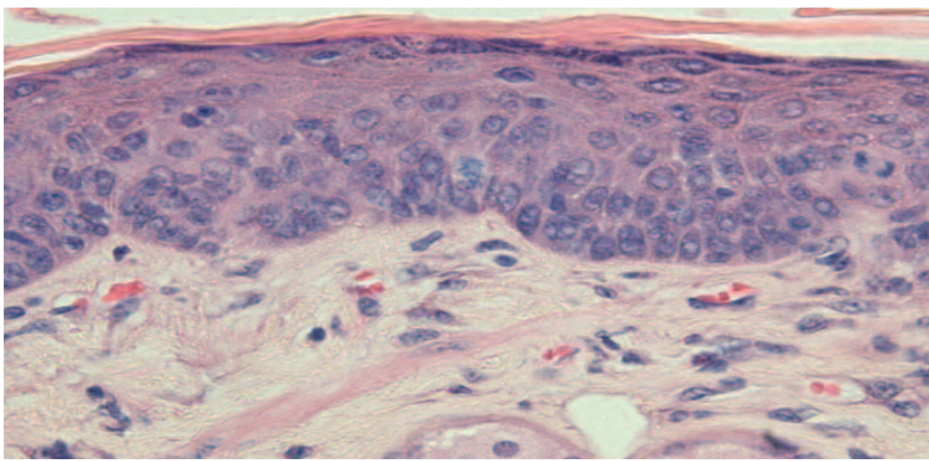


Figura 99.

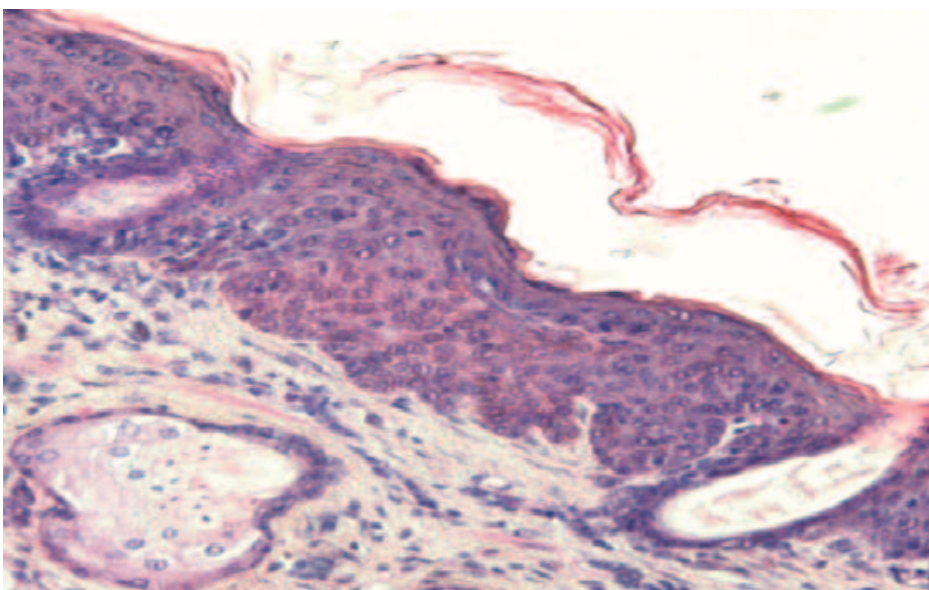
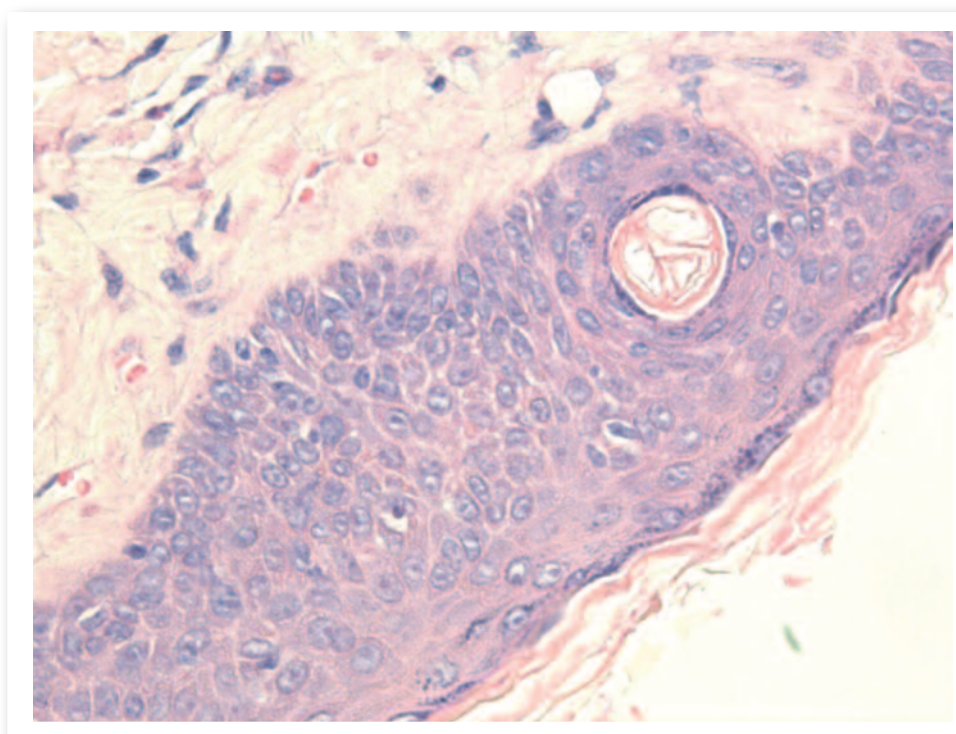


Figura 100. *Acanthosis / papilomatosis*

Estaban caracterizadas por engrosamiento irregular de la epidermis con mayor o menor grado de papilomatosis. Era el fenómeno que caracterizaba a la mayor parte de la piel de las áreas más expuestas a la radiación (lomo, dorso de la cabeza y cuello, etc.) y mostraba una gran heterogeneidad, con áreas de un gran espesor (15 a 20 capas celulares) y otras de 8 a 10 capas, así como frecuente pleomorfismo celular y nuclear.



■ Figura 101.

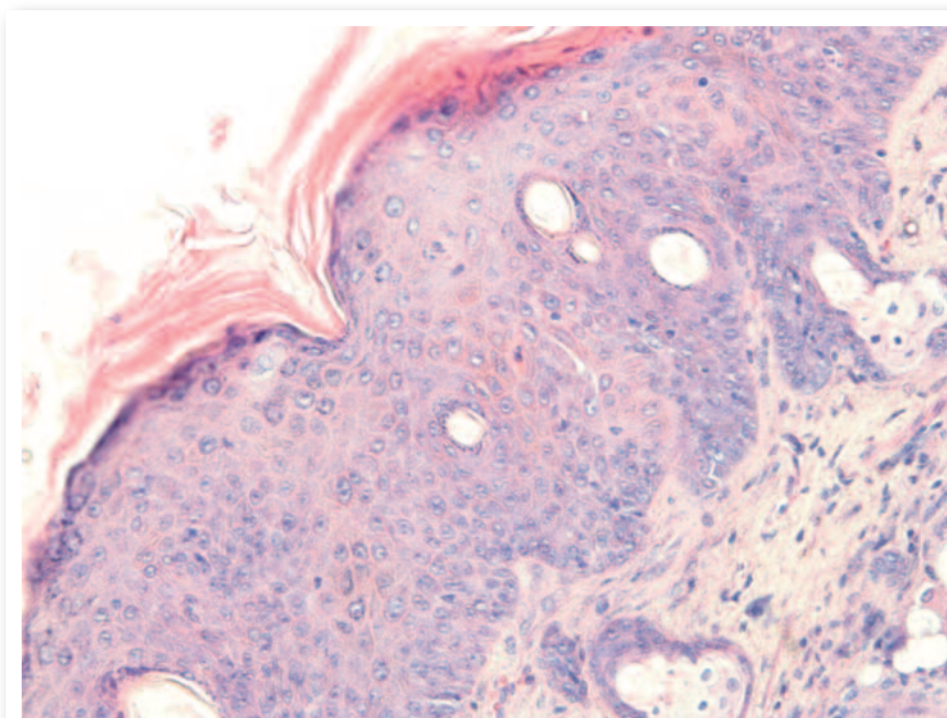


Figura 102.

Hiperqueratosis / Hipergranulosis

Consistente en el engrosamiento de la epidermis caracterizado por varias hileras de células totalmente queratinizadas y anucleadas con patrón denso o en hojaldre revistiendo la superficie epidérmica.

En algunas zonas se observaban además, numerosos gránulos de queratohialina en los citoplasmas de algunos de los queratinocitos.

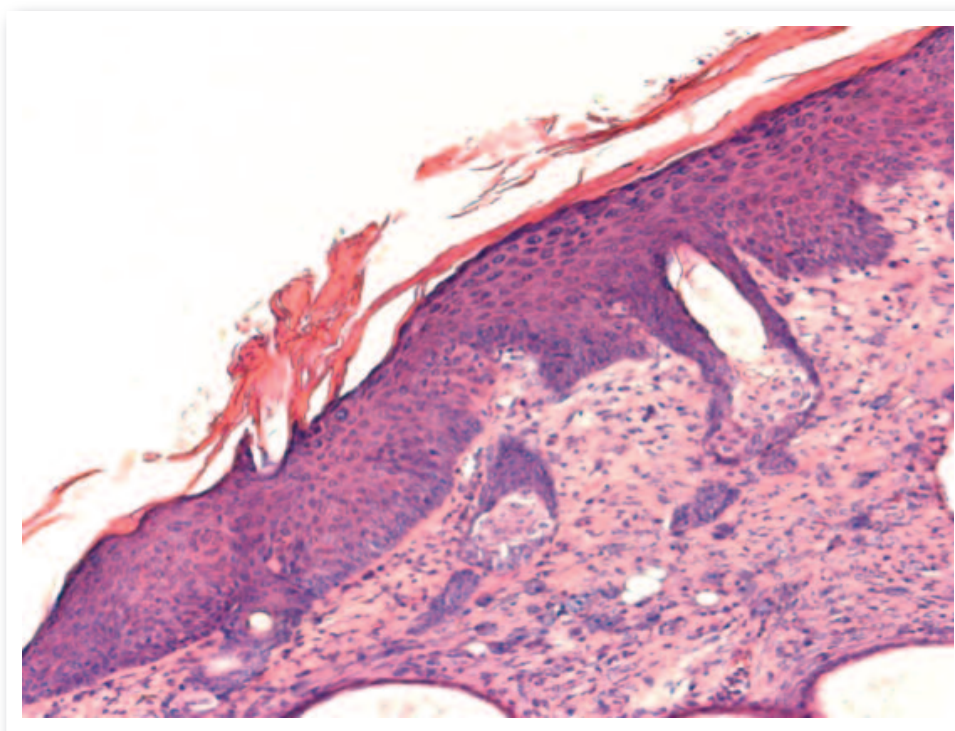


Figura 103. *Hiperqueratosis / Hipergranulosis*

Paraqueratosis.

Caracterizada por la presencia de núcleos en las células totalmente queratinizadas del estrato epidérmico más superficial (estrato córneo).

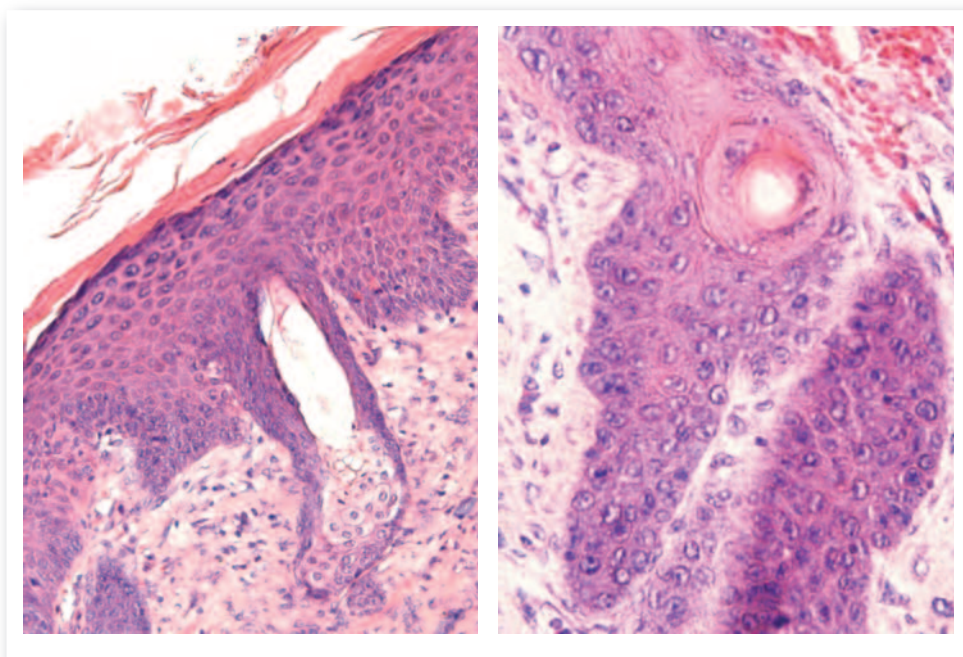
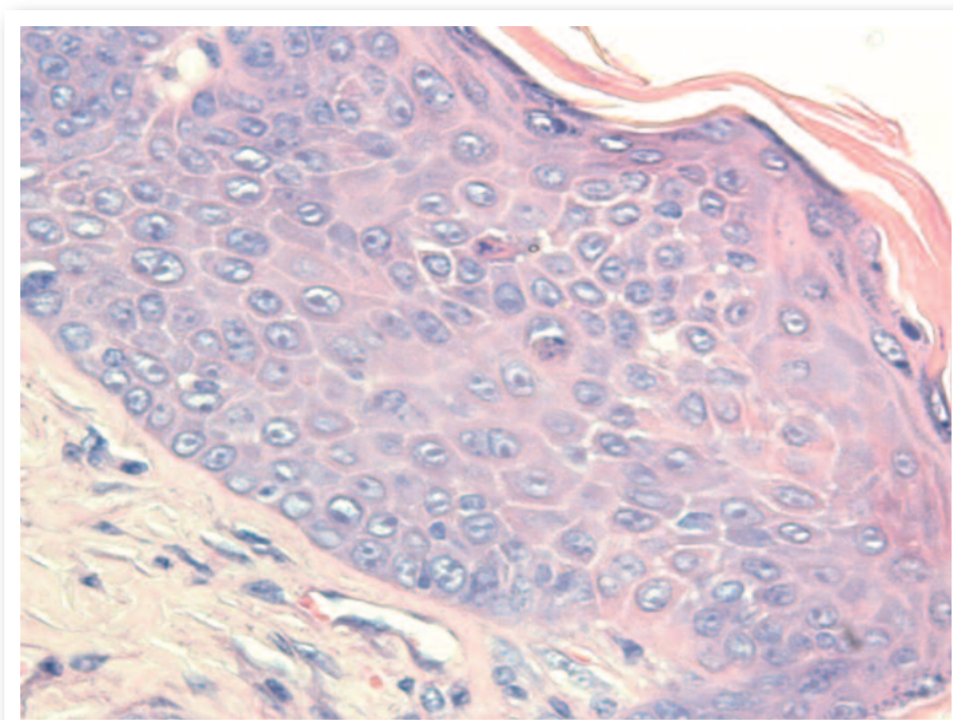


Figura 104. *Paraqueratosis*

Disqueratosis

Caracterizada por la queratinización de las células epidérmicas de forma individualizada, preferentemente a nivel de los del estrato espinoso de Malpighio.



■ **Figura 105. *Disqueratosis***

Displasia

Estas lesiones eran encontradas con frecuencia, tanto de forma aislada como junto a los fenómenos descritos previamente, así como en la vecindad de las lesiones neoplásicas malignas.

En dichas zonas predominaban las alteraciones de la polaridad celular, así como el intenso pleomorfismo celular y nuclear, fenómenos de disqueratosis frecuentes y mitosis atípicas, afectando al tercio inferior de la epidermis, a la mitad o más de dos tercios de la misma (grados I,II,III, respectivamente). No obstante predominaban las de grado I, siendo las menos frecuentes las de grado III.

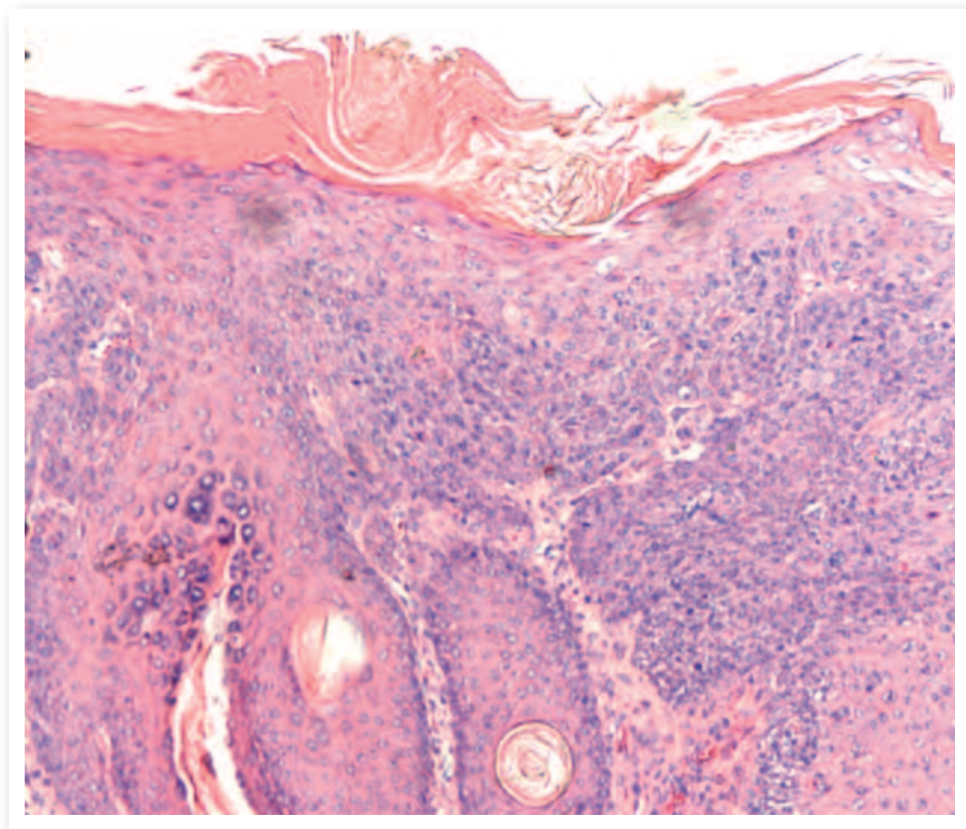
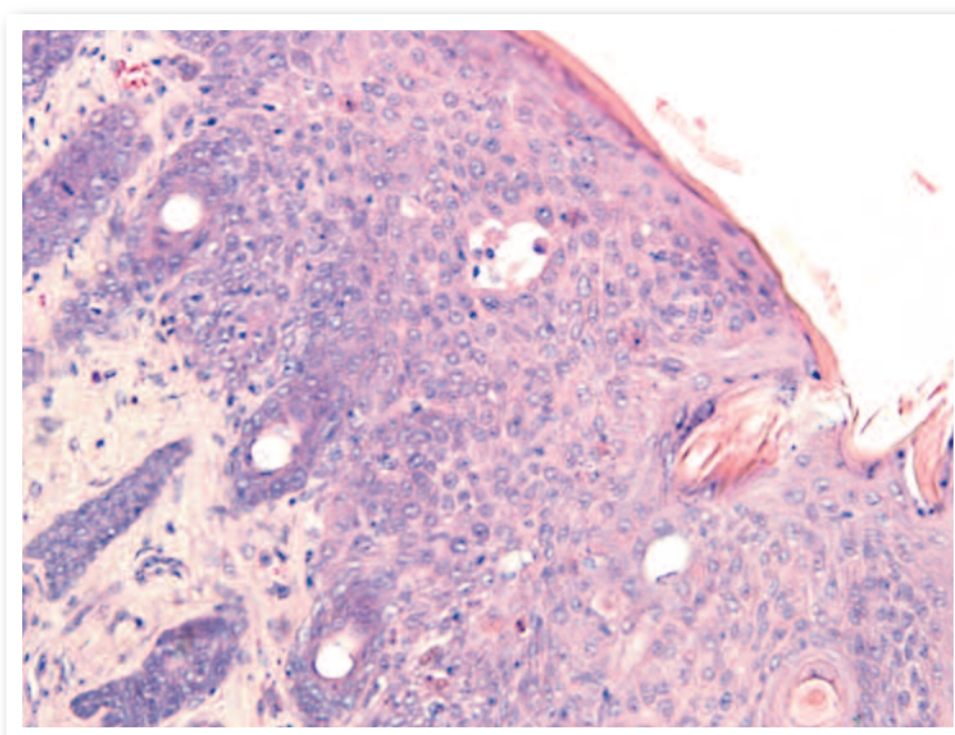


Figura 106. *Displasia*



■ Figura 107. *Displasia*

Carcinoma in situ

Se caracterizaba por la presencia de alteraciones celulares descritas en el grupo anterior, que afectaban a todo el espesor epidérmico, de modo que no podían distinguirse los estratos epidérmicos normales (basal, espinoso y córneo). No obstante, la membrana basal en todas estas zonas se mantenía íntegra.

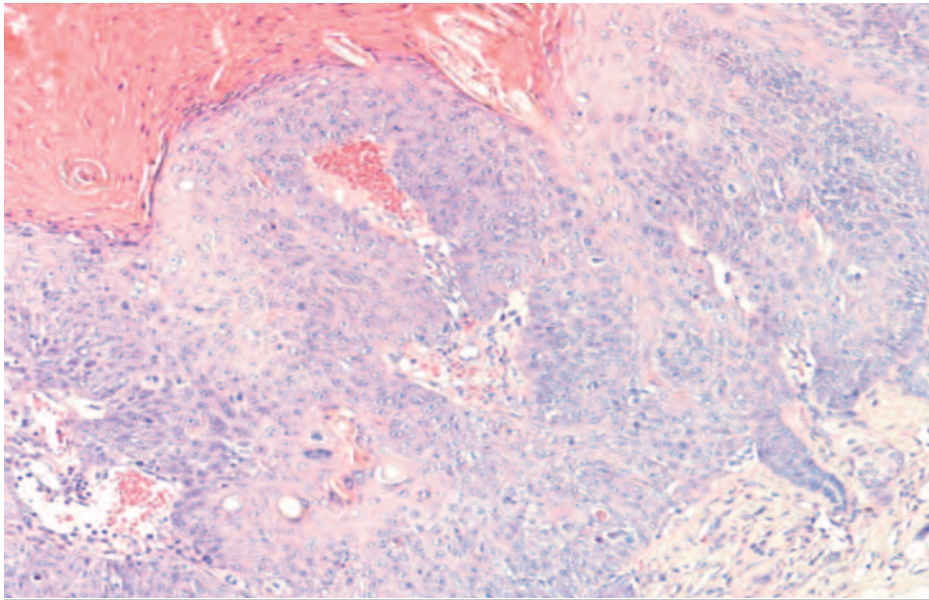


Figura 108. *Carcinoma In Situ*

Carcinoma microinvasor

En estas zonas, además del componente epidérmico atípico de características similares a las del carcinoma “in situ” antes descrito, se observaban otras áreas que mostraban cordones epiteliales irregulares con atipias celulares marcadas que infiltraban la membrana basal sobrepasándola e invadiendo la dermis papilar. En ésta era frecuente observar pequeños focos epiteliales aislados, de características morfológicas similares, así como infiltrados parcheados de linfocitos y células plasmáticas en la periferia.

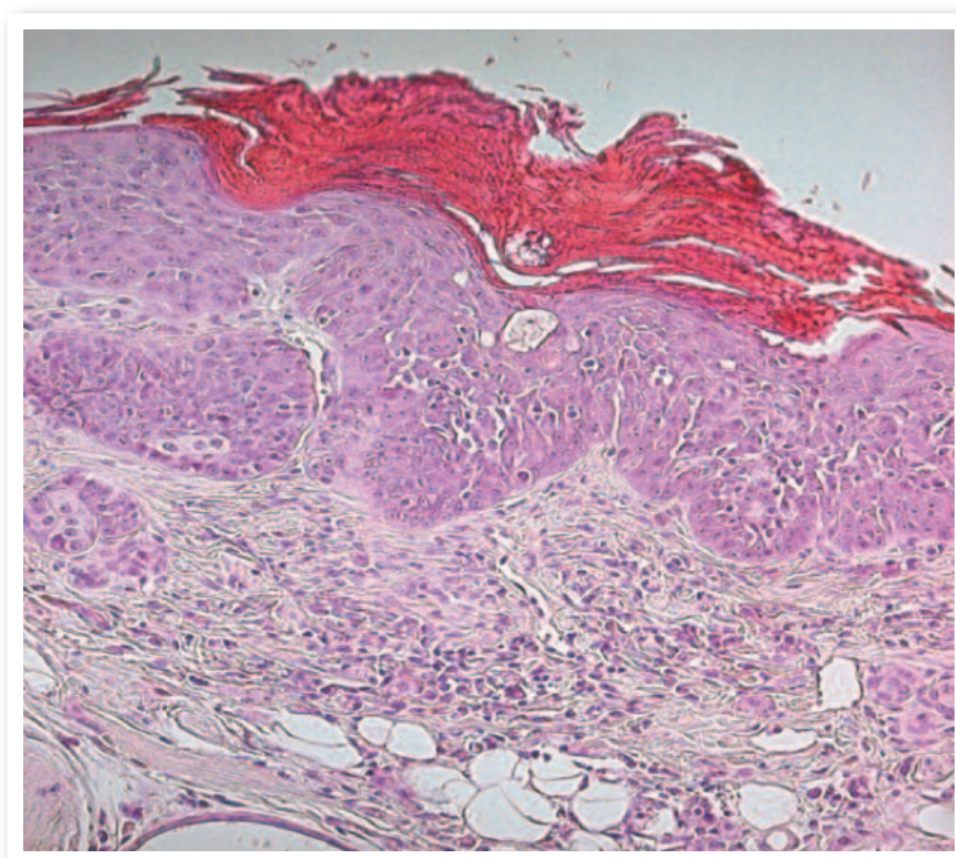


Figura 109. *Carcinoma microinvasor*

Carcinoma de células escamosas

Las lesiones epiteliales malignas fueron muy frecuentes y, al contrario que en la patología humana, en este modelo de carcinogénesis cutánea experimental, no se podía discriminar entre el carcinoma de células basales y el epidermoide o espinocelular.

En general, correspondían a carcinomas de células escamosas, poligonales, con núcleos voluminosos y moderado pleomorfismo, con nucléolos muy voluminosos, que semejan estrechamente a los queratinocitos del estrato mucoso de Malpighio. También eran frecuentes los fenómenos de queratinización celular individual o disqueratosis, así como la presencia de globos córneos. Las mitosis eran frecuentes, mientras que las mitosis aberrantes ocurrieron en menos casos. Las células se disponían en cordones amplios y nidos irregulares, que desde la epidermis infiltraban la dermis subyacente y, con frecuencia, el músculo esquelético subyacente.

El 100% de los animales de este grupo desarrollaron carcinomas de células escamosas.

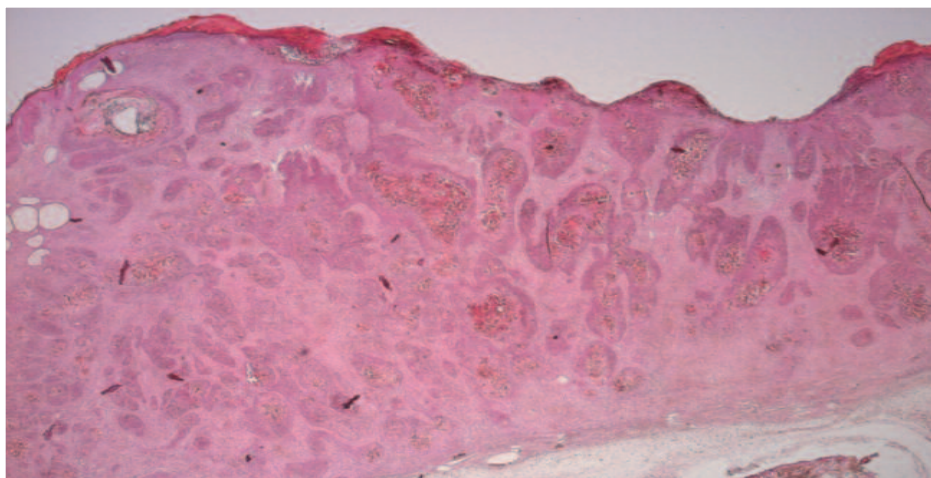
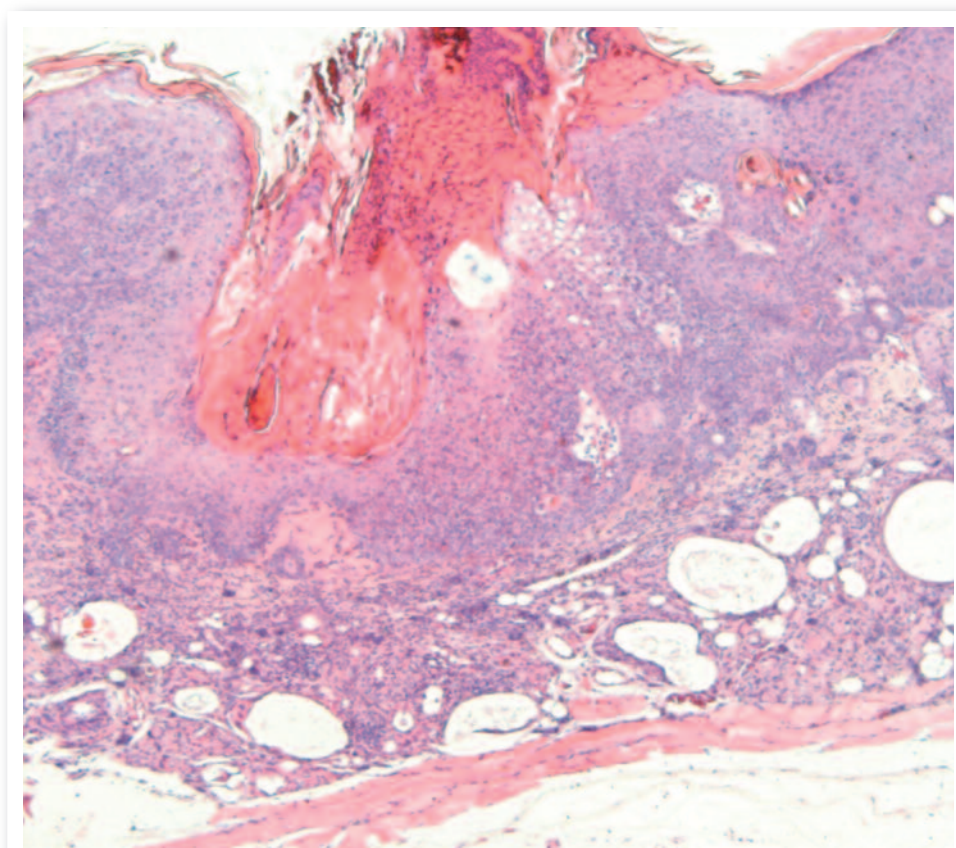


Figura 110. *Carcinoma de las células escamosas*



■ **Figura 111. *Carcinoma de las células escamosas***

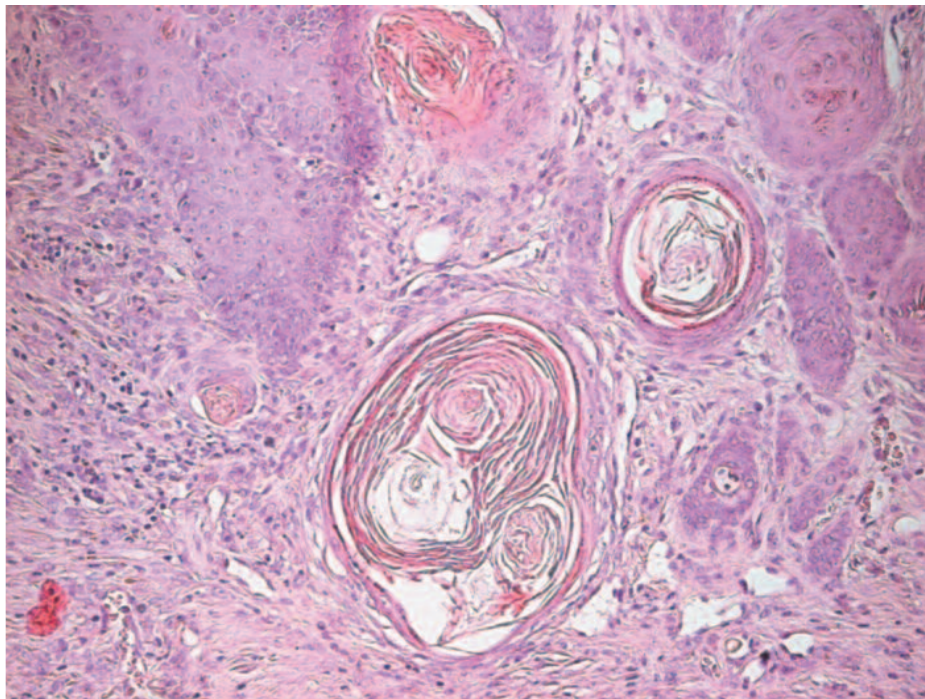


Figura 112. *Carcinoma de las células escamosas*

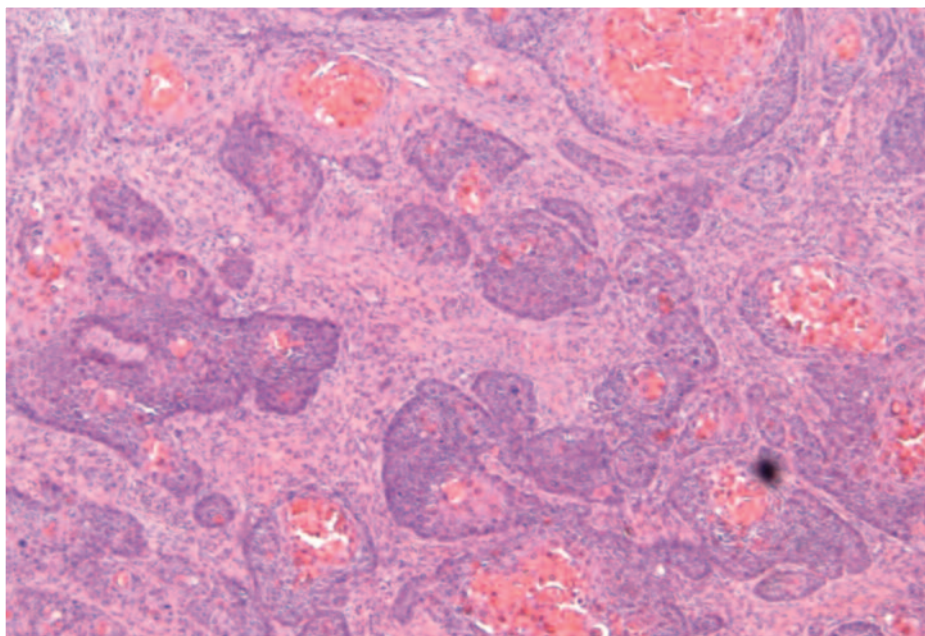


Figura 113. *Islotes de células cancerosas con gran cohesión y disqueratosis que infiltran la dermis en profundidad*

Dermis

La expansión de la dermis papilar fue un hallazgo constante, por aumento tanto de los capilares sanguíneos, como de la sustancia intercelular.

En la dermis reticular destacaban los fenómenos de desorganización de la estructura general, como los de la disposición del entramado de las fibras colágenas y elásticas, distinguiéndose tres grados de disposición: predominio de fibras mal organizadas dispuestas preferentemente de forma individualizada (grado I); un patrón en el que las fibras con estas características alternaban con zonas que se disponían en acúmulos irregulares y compactos de elastina, ligeramente basófilos (grado II); y por último, predominio marcado de los acúmulos compactos de elastina (grado III). Asimismo, observamos áreas irregulares de fibrosis con múltiples focos de infiltrados de linfocitos y células plasmáticas.

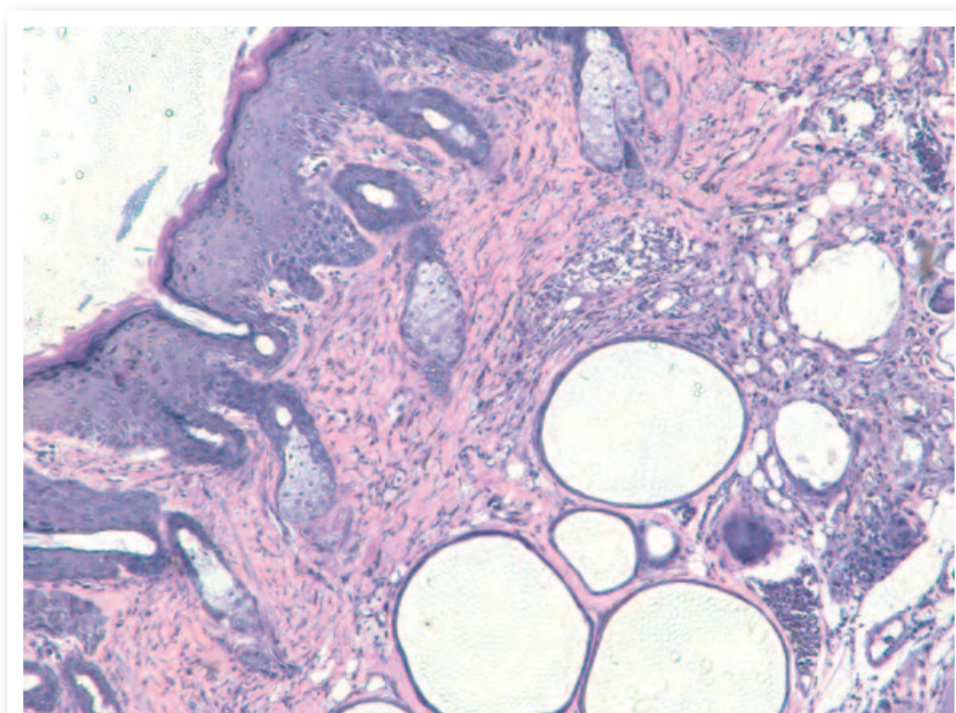


Figura 114. *Fibrosis. Infiltrado linfoplasmocitario*

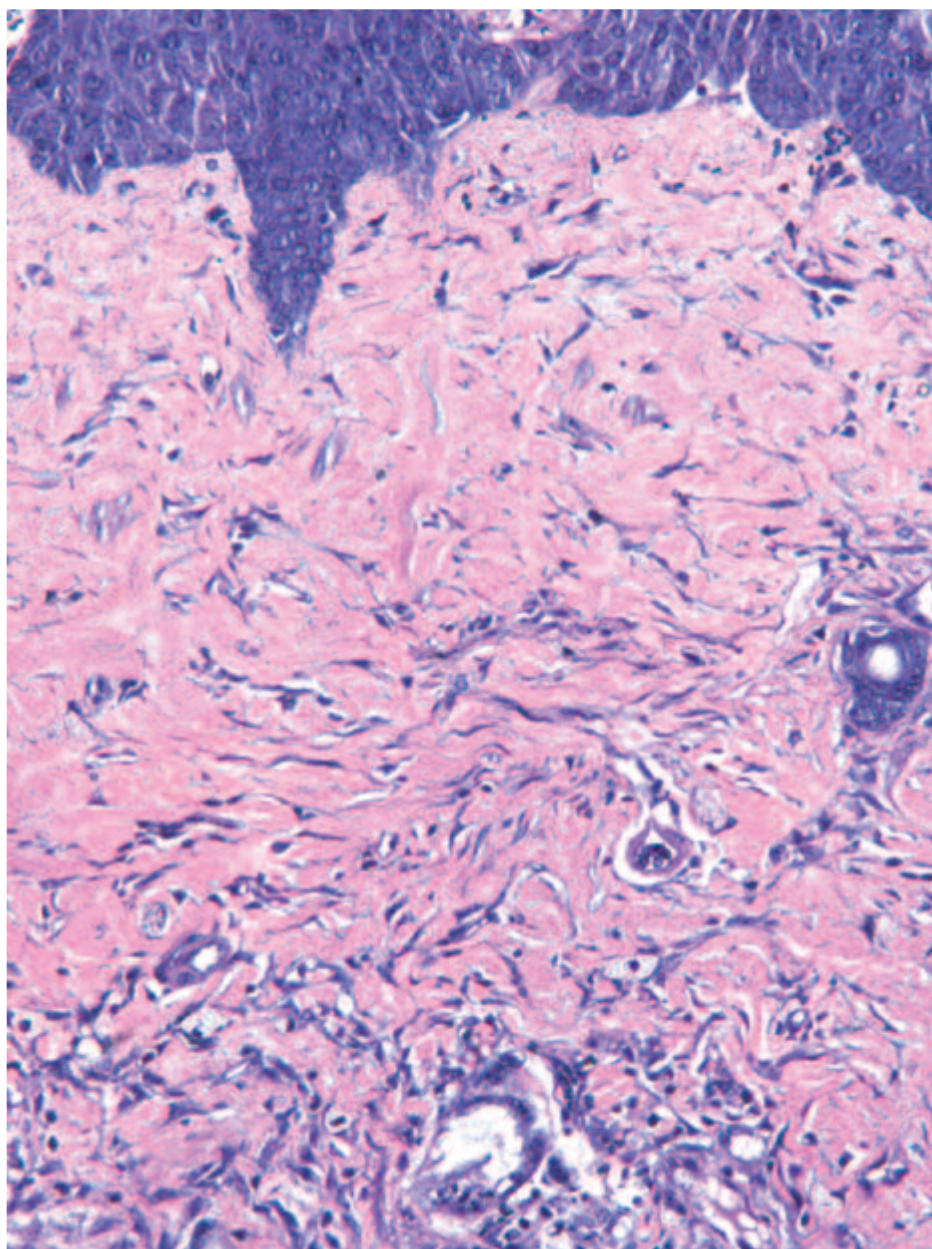
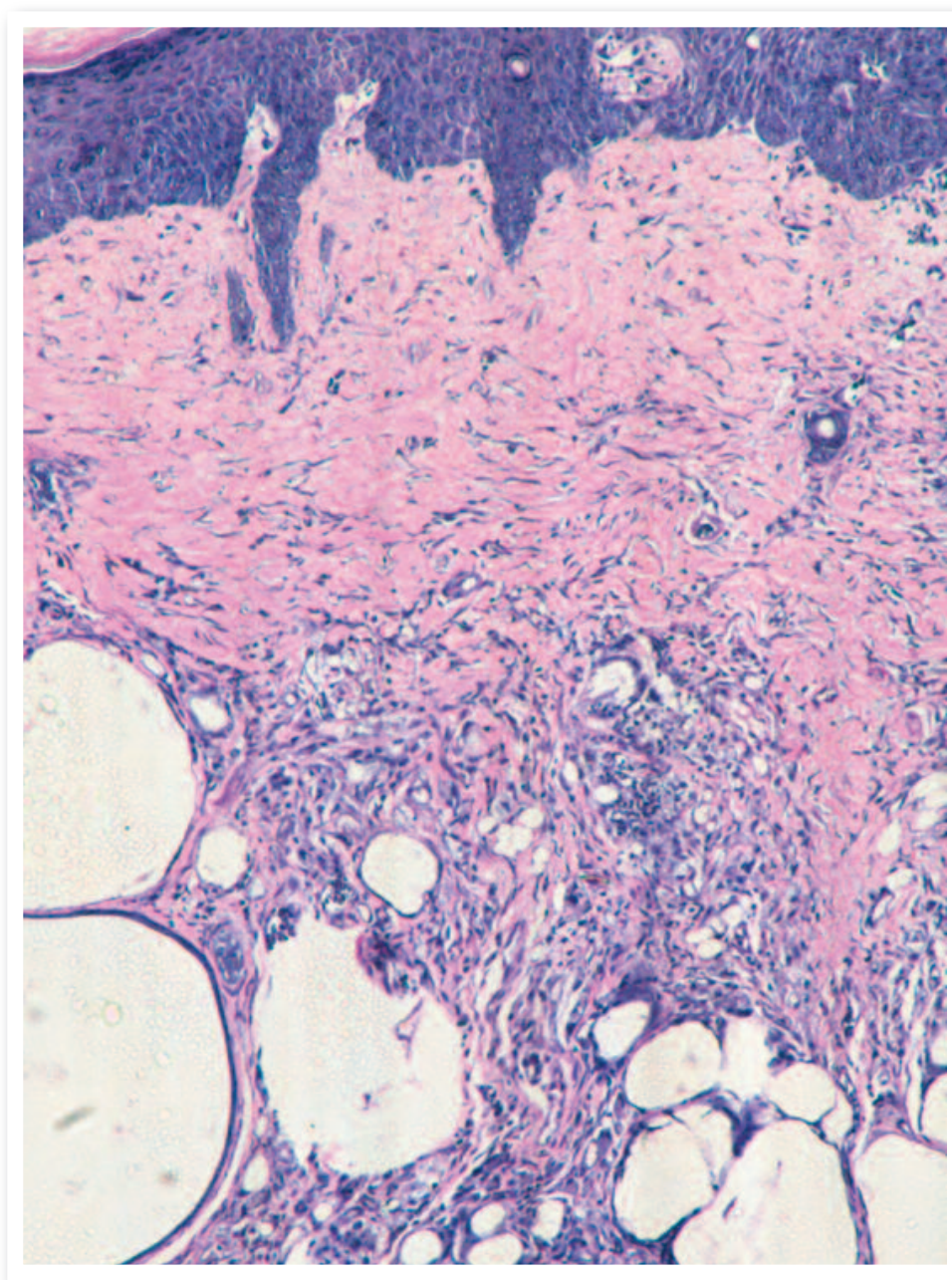


Figura 115. *Detalle de fibrosis dérmica*



■ **Figura 116. *Detalle de infiltrados linfoplasmocitarios***

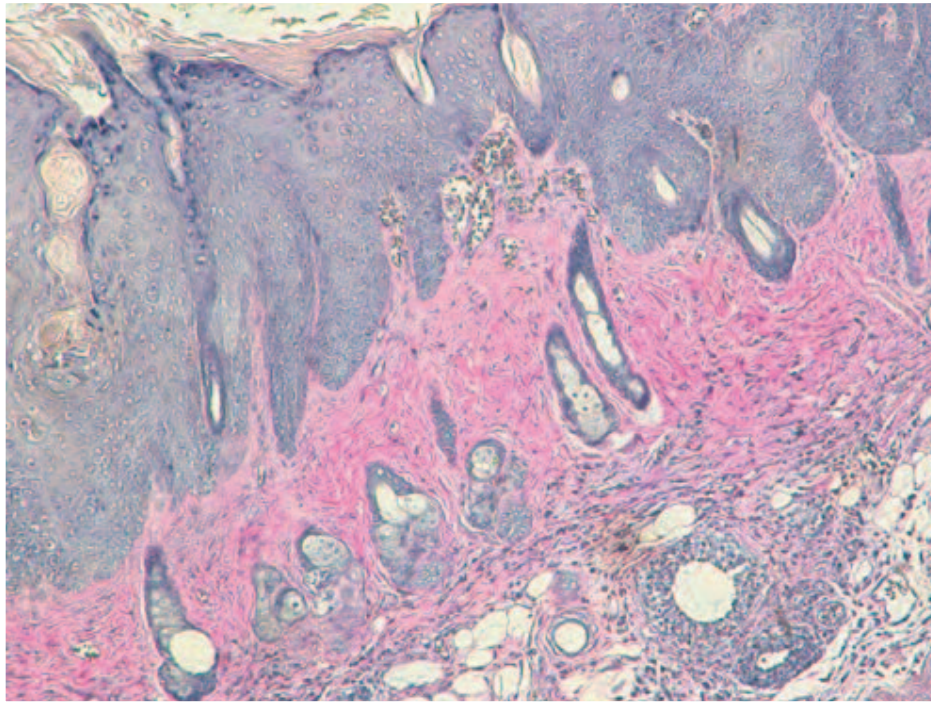


Figura 119. *Elastosis II*

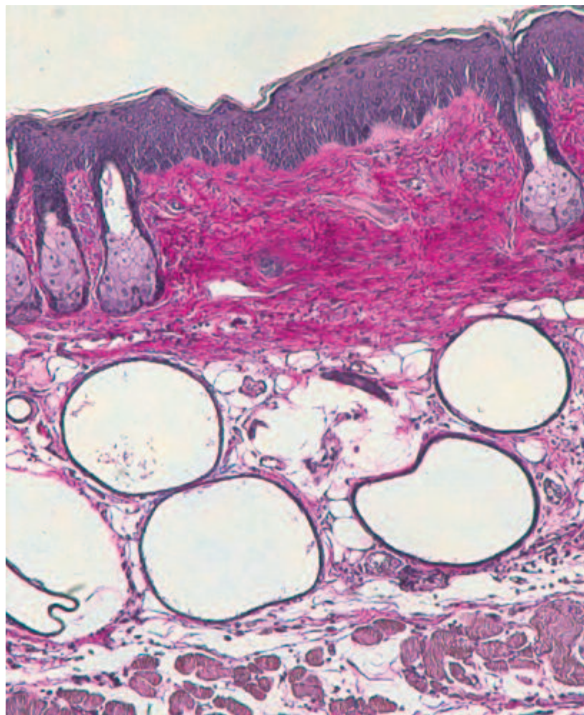


Figura 120.
Elastosis II

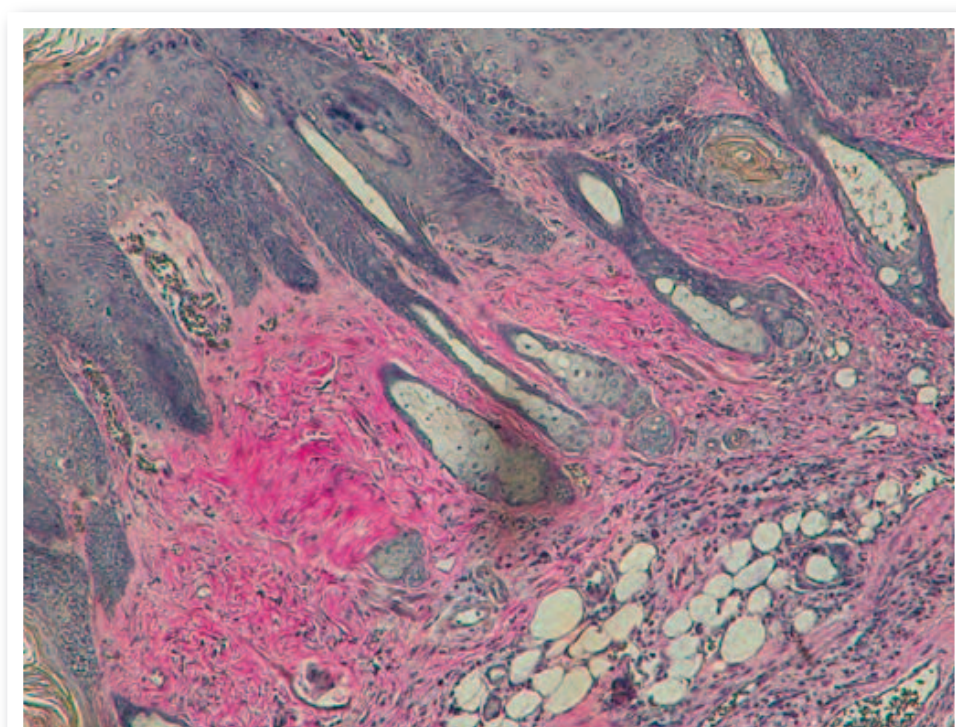


Figura 121. *Elastosis III*

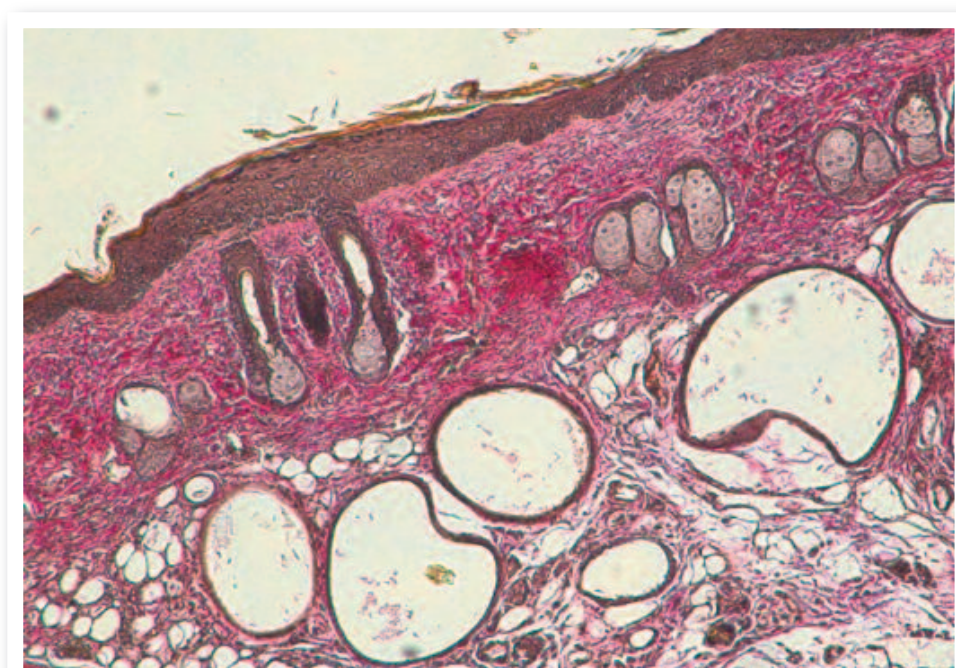


Figura 122. *Elastosis III*

d. Resultados comparativos entre grupos

	GRUPO I - Control (RUV)	GRUPO II (RUV + Almendras dulces)	GRUPO III (RUV + Aceite Crisálida Seda)
MICROSCOPICAMENTE			
Hiperplasia	100	100	100
Acantosis / Papilomatosis	100	100	100
Hiperqueratosis /Hipergranulosis	100	100	100
Displasia I	100	100	100
Displasia II	100	100	100
Displasia III	100	100	85
Carcinoma In situ	100	100	80
Carcinoma microinvasor	100	90	75
Carcinoma Invasor	100	83,34	71,43
DERMIS			
Elastosis	+++	+++	++
Vasos	+++	+++	++

Tabla 13. Tipos macroscópicos de lesiones

En el grupo III, tratado con aceite de crisálida de gusano de seda, la displasia III, el carcinoma in situ, el carcinoma microinvasor y el invasor es inferior a sufrida por los grupos I y II. Asimismo ocurría con los daños dérmicos como la elastosis.

En las gráficas siguientes se representa la incidencia comparativa entre los tres grupos. En el eje Y se muestra el porcentaje de incidencia (del 1 al 100%) y para cada evento, se informa del resultado de cada grupo.

La primera gráfica se refiere a las lesiones microscópicas que se observaron en cada grupo, siendo visible la clara diferencia del Grupo III (Aceite de crisálida de gusano de seda), frente a los otros dos grupos, a partir de la Displasia, pero especialmente en el carcinoma microinvasor.

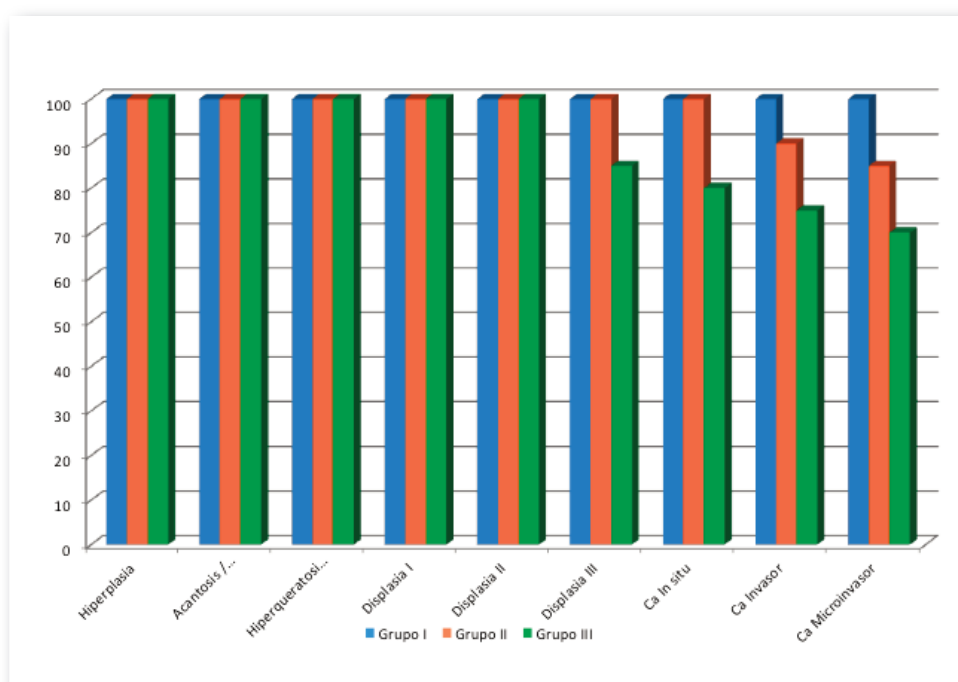


Figura 123. Diferencias microscópicas entre los tres grupos (porcentaje vs lesión)

En la segunda gráfica se representa la incidencia comparativa de las alteraciones de la dermis, que se centran en la elastosis y los vasos y en la que también se encuentran diferencias significativas del Grupo III (Aceite de crisálida de gusano de seda), frente a los otros dos:

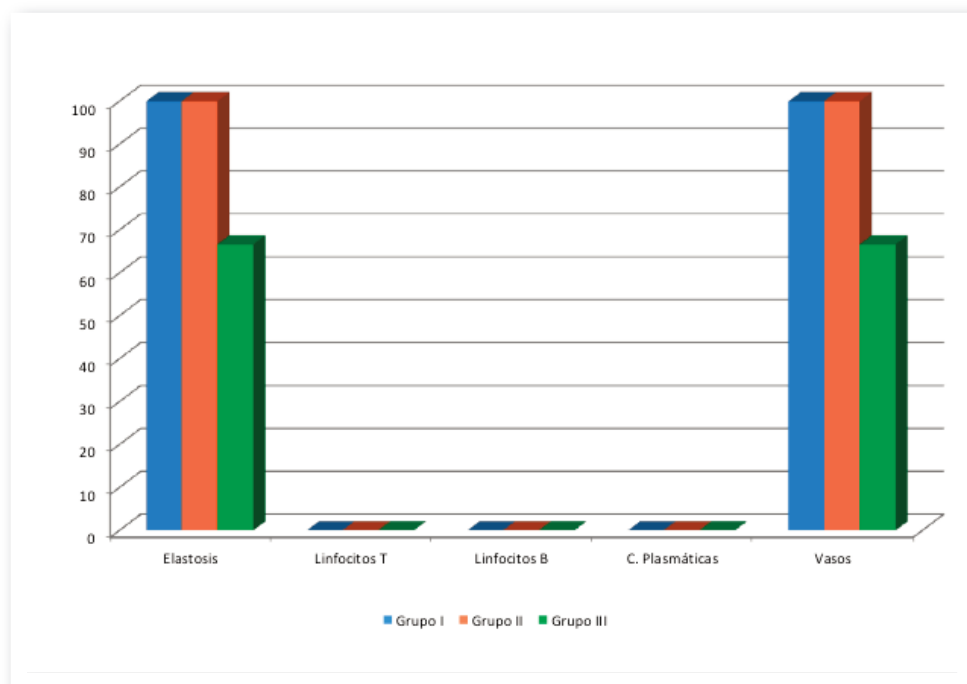


Figura 124. Diferencias microscópicas entre los tres grupos (Dermis)

C. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

a. PCNA

En el caso de PCNA, observamos que todos los animales irradiados mostraban células proliferantes en las capas basales y suprabasales de las zonas cutáneas no afectadas por los tumores. En el caso de los tumores, el marcaje era de predominio leve en todos los grupos, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Así, mientras que en grupo control mostró una media de $1,16 \pm 0,29$, los grupos tratados con aceite de almendras dulces y aceite de la crisálida del gusano de seda, obtuvieron una puntuación de $1 \pm 0,18$ y $0,93 \pm 0,46$ respectivamente.

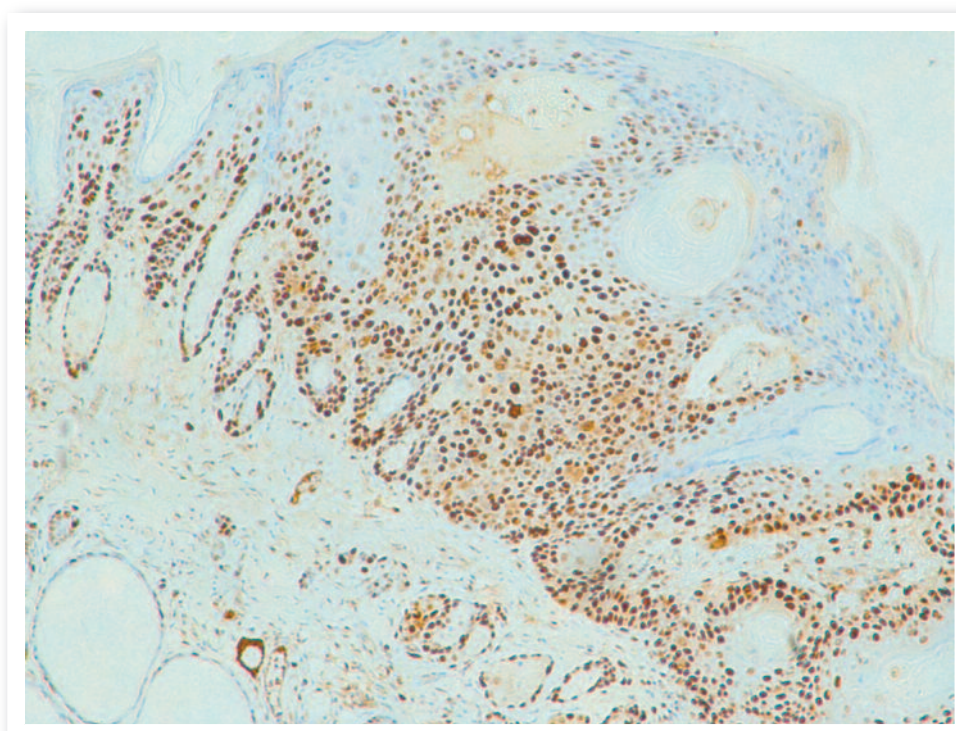


Figura 125. *Pcna 002*

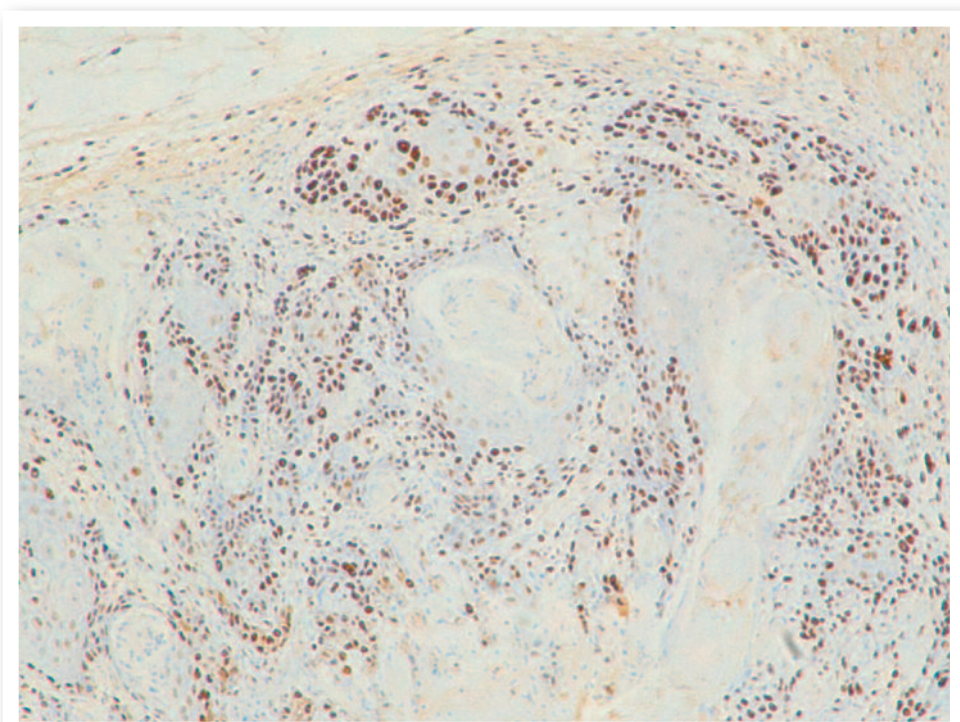


Figura 126. *Pcna 007*

b. MMP-9

El marcaje de la metaloproteinasa 9 fue menos intenso en el grupo control que en los grupos tratados, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. El control obtuvo una puntuación de $0,69 \pm 0,1$, el grupo II (aceite de almendras dulces) de $0,84 \pm 0,37$ y el grupo III de $0,82 \pm 0,2$.

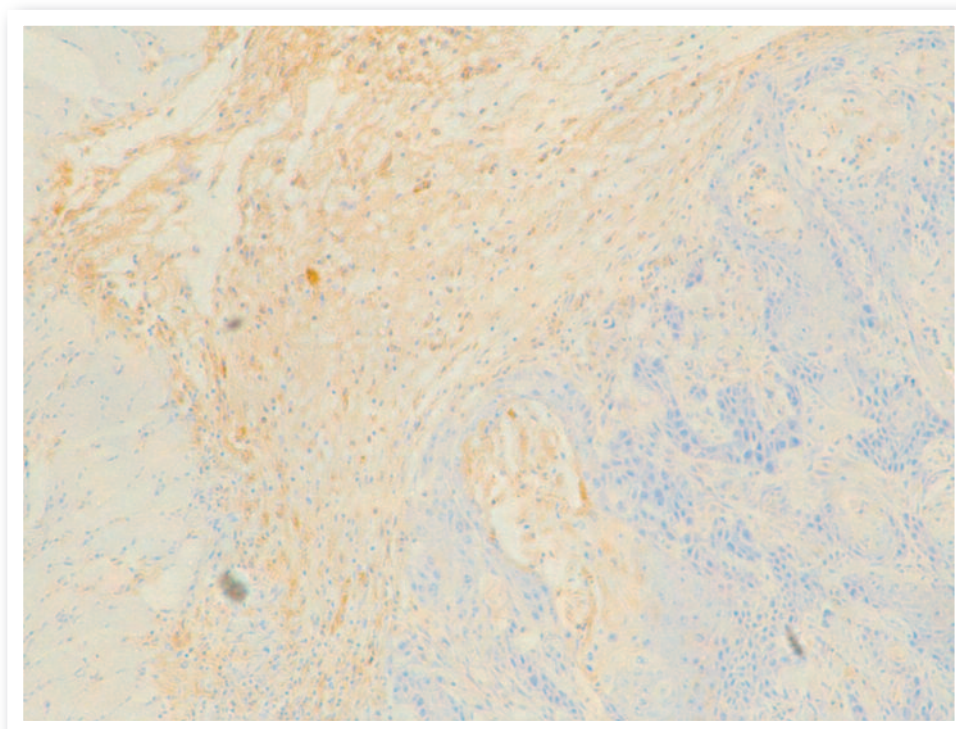


Figura 127. *Mmp control*

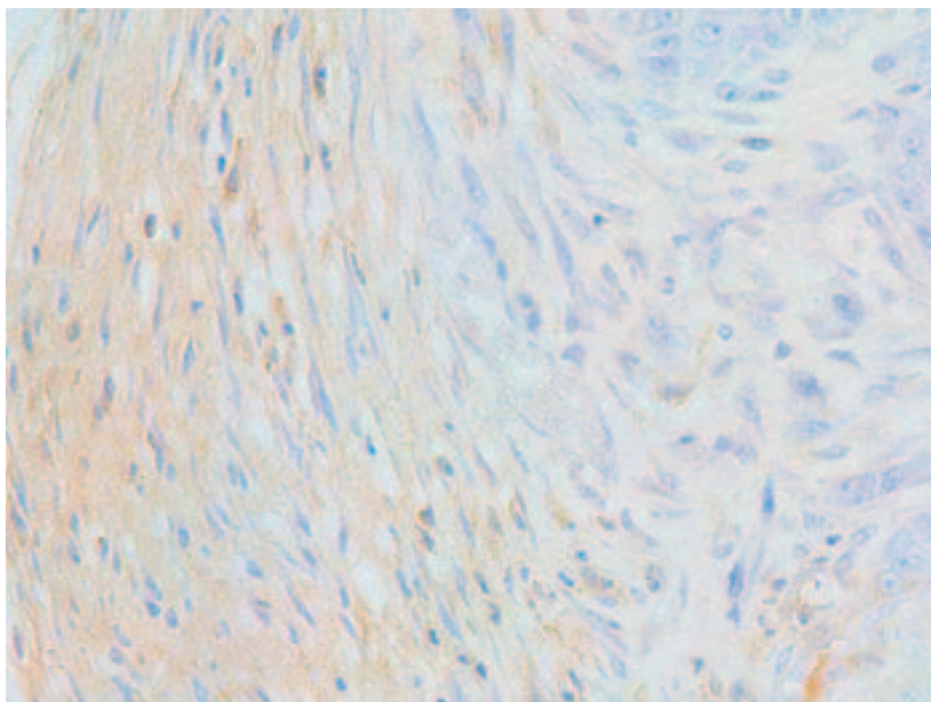


Figura 128. *MMP*

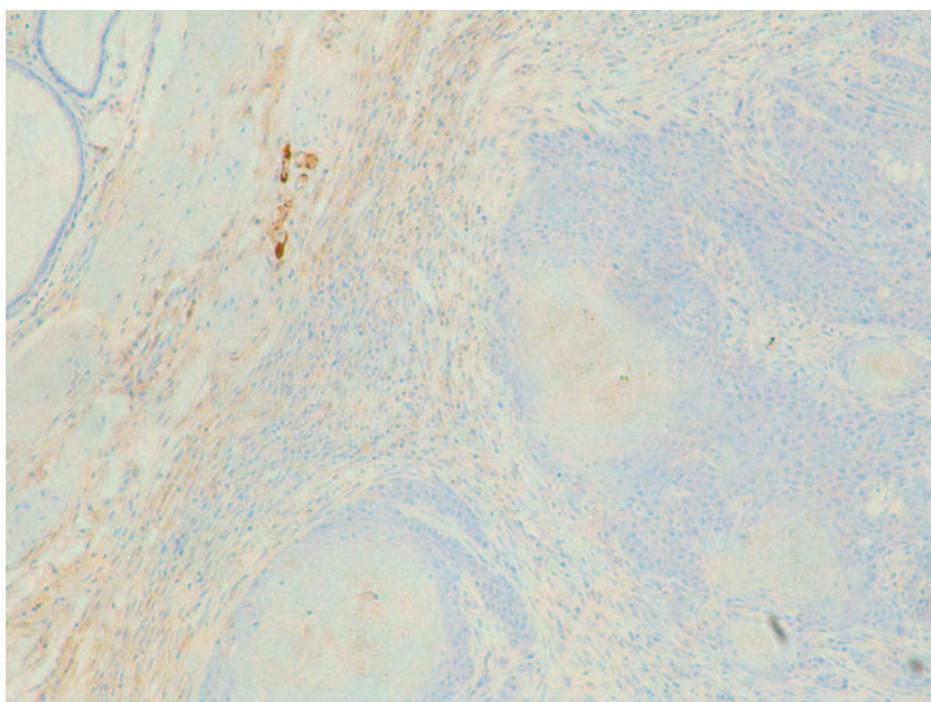
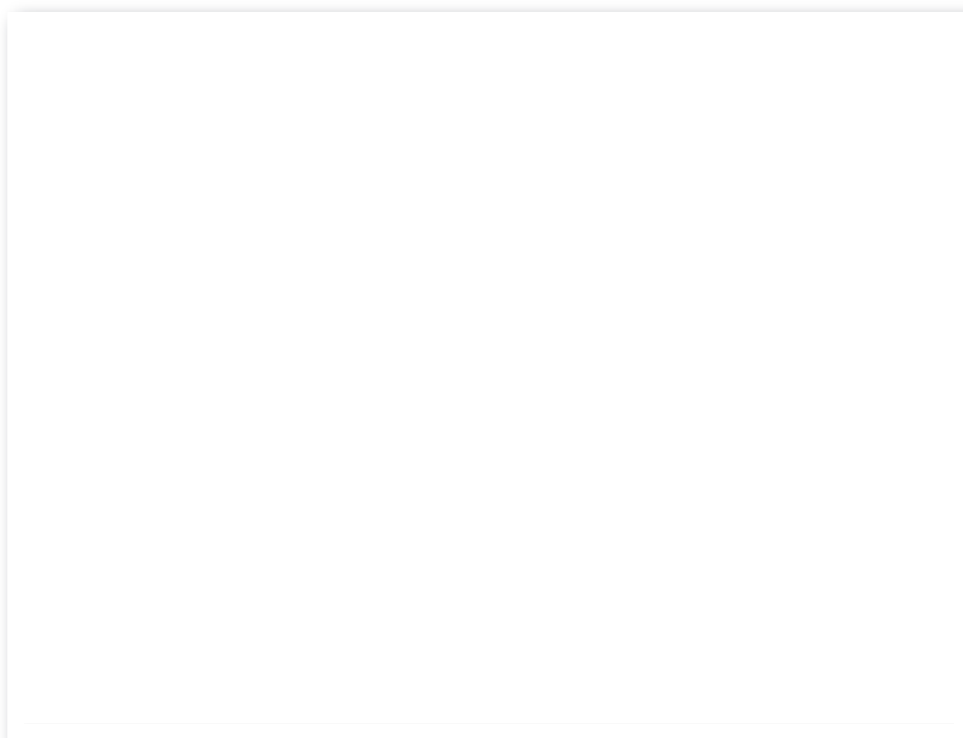


Figura 129. *MMP*

c. TIMP

En el estudio de los inhibidores de las metaloproteinasas, el marcaje fue más intenso en el caso de los dos grupos tratados que en el control, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). El grupo de animales tratados con aceite de crisálida obtuvo una puntuación para este anticuerpo de $0,93 \pm 0,37$, el tratado con aceite de almendras dulces de $0,86 \pm 0,26$ y el control de $0,53 \pm 0,3$.



■ Figura 130. *MMP*

d. CD3/CD20

La intensidad del marcaje de estos anticuerpos fue leve en todos los casos, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos. Existía una prevalencia de CD3 (linfocitos T) (75-90%) sobre CD20 (células plasmáticas) (10-25%).

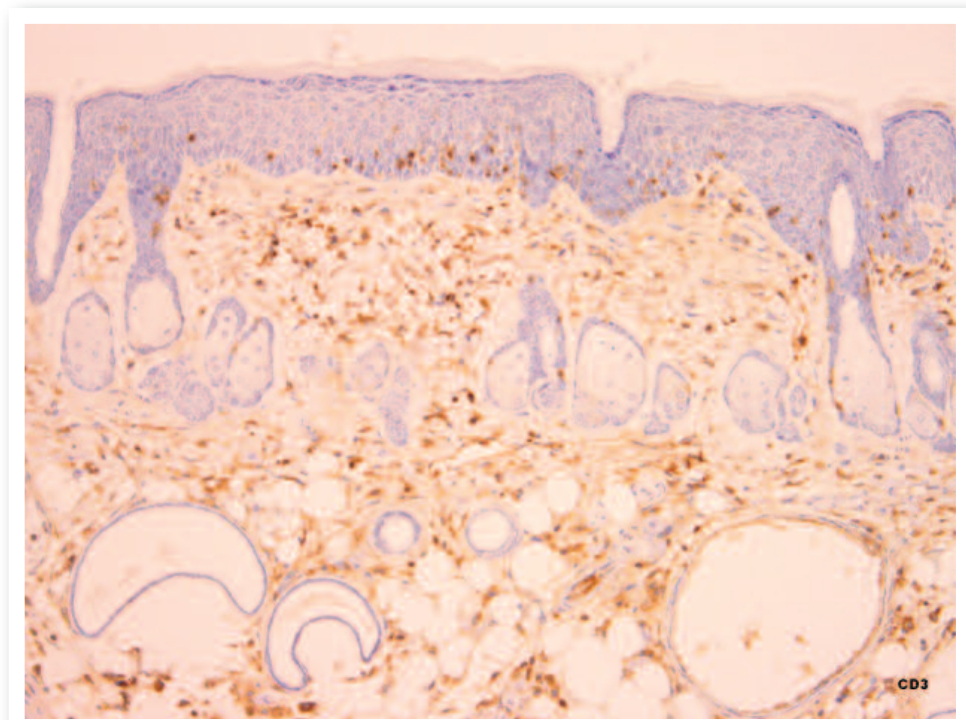
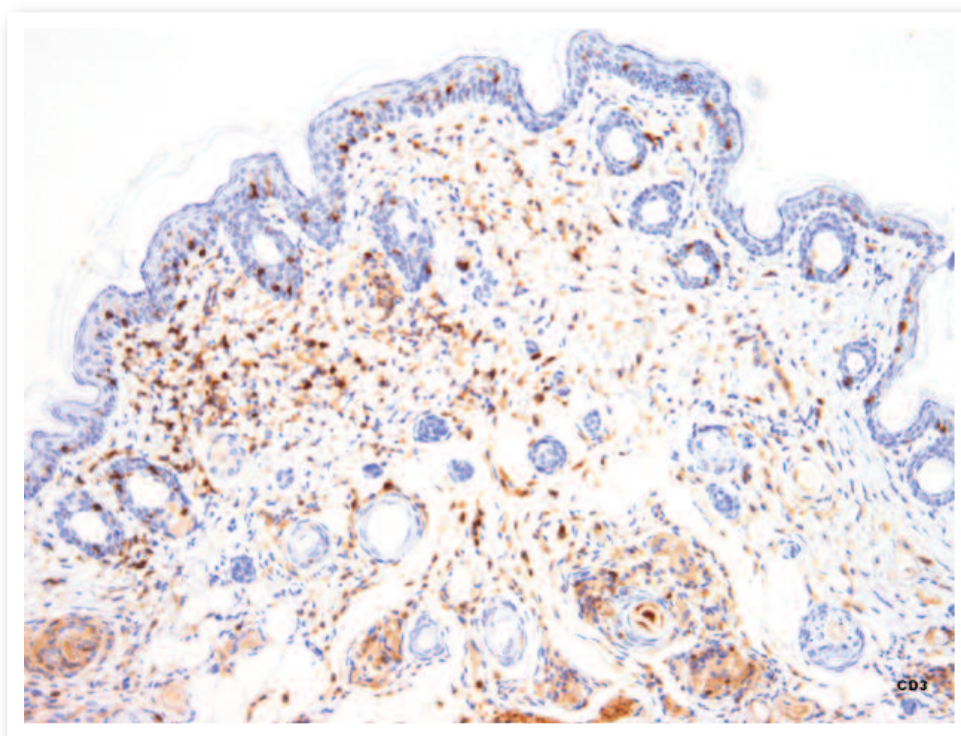
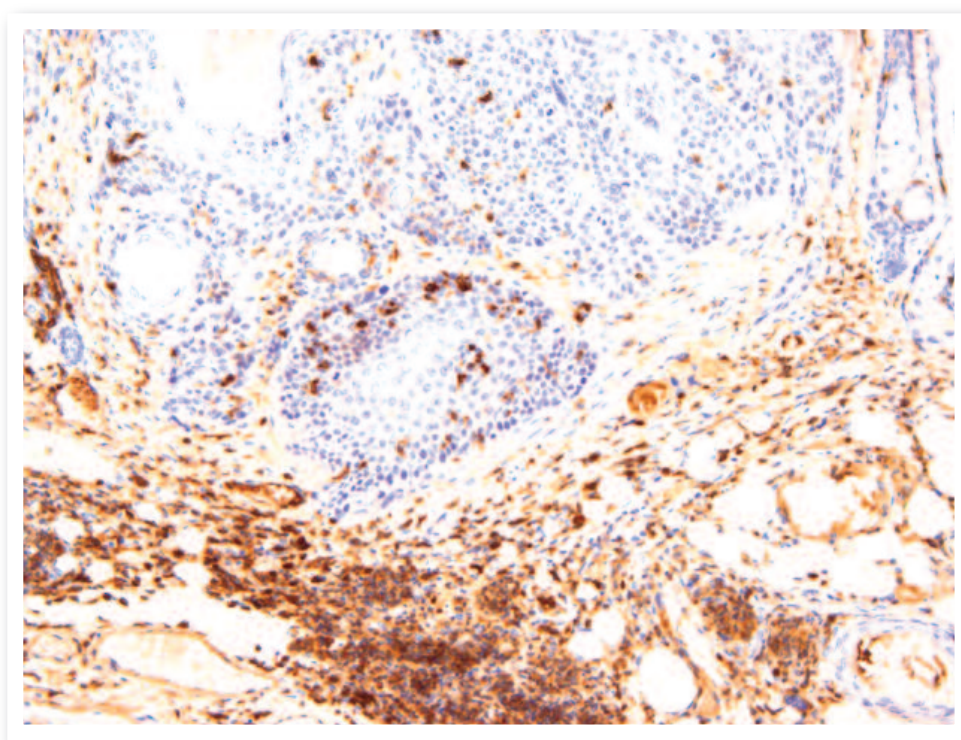


Figura 131. *CD3*



■ Figura 132. *CD3*



■ Figura 133. *CD3*

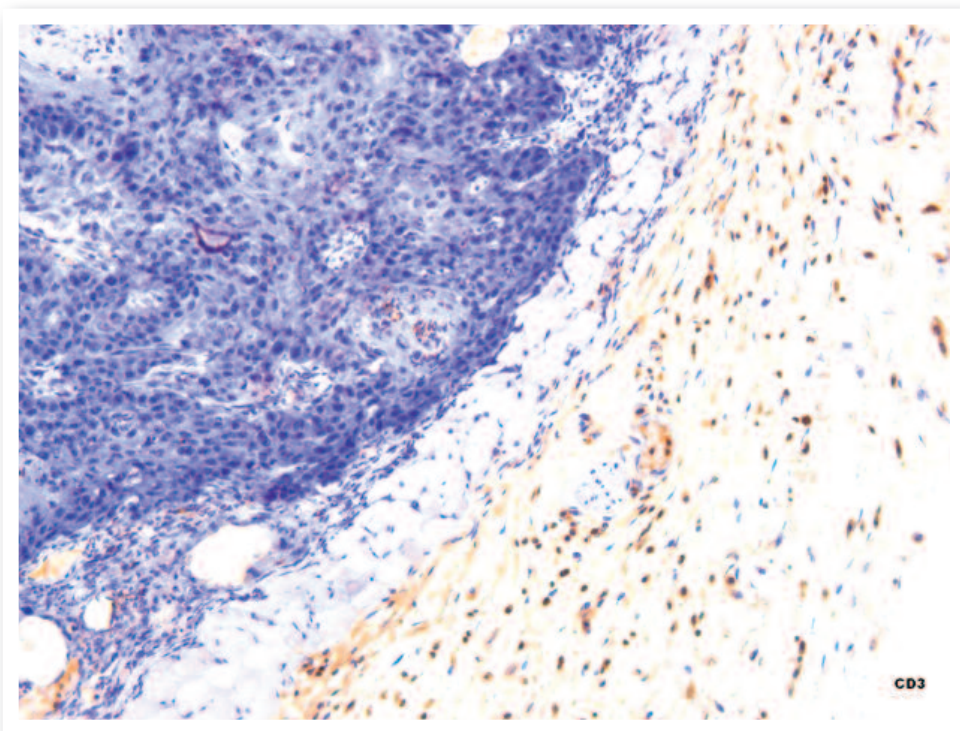


Figura 134. *CD3*

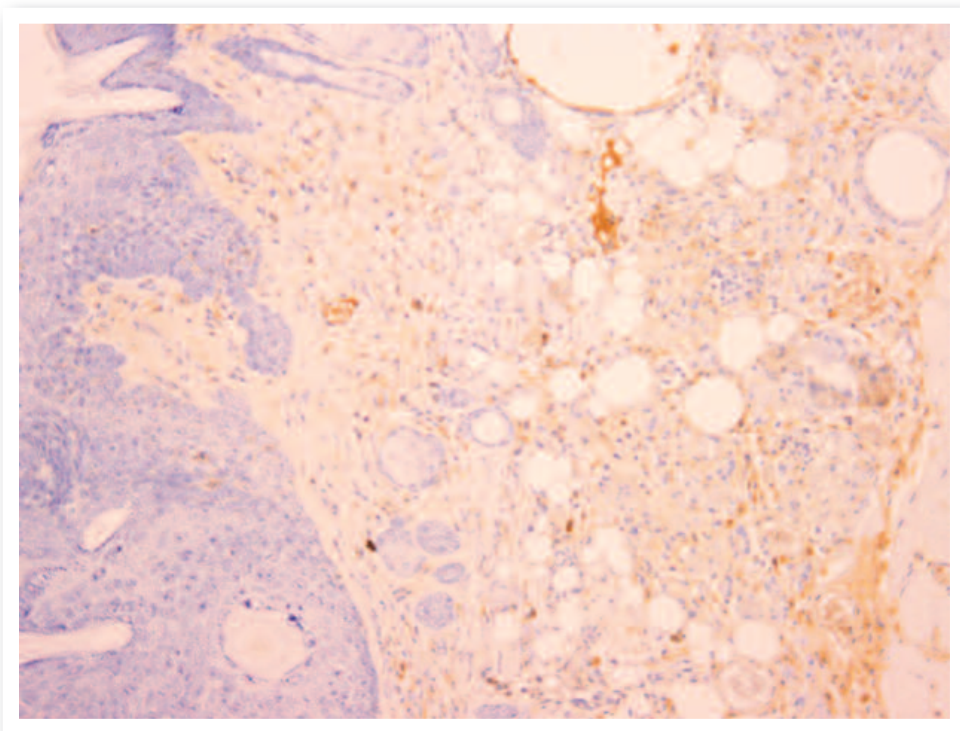


Figura 135. *CD3*

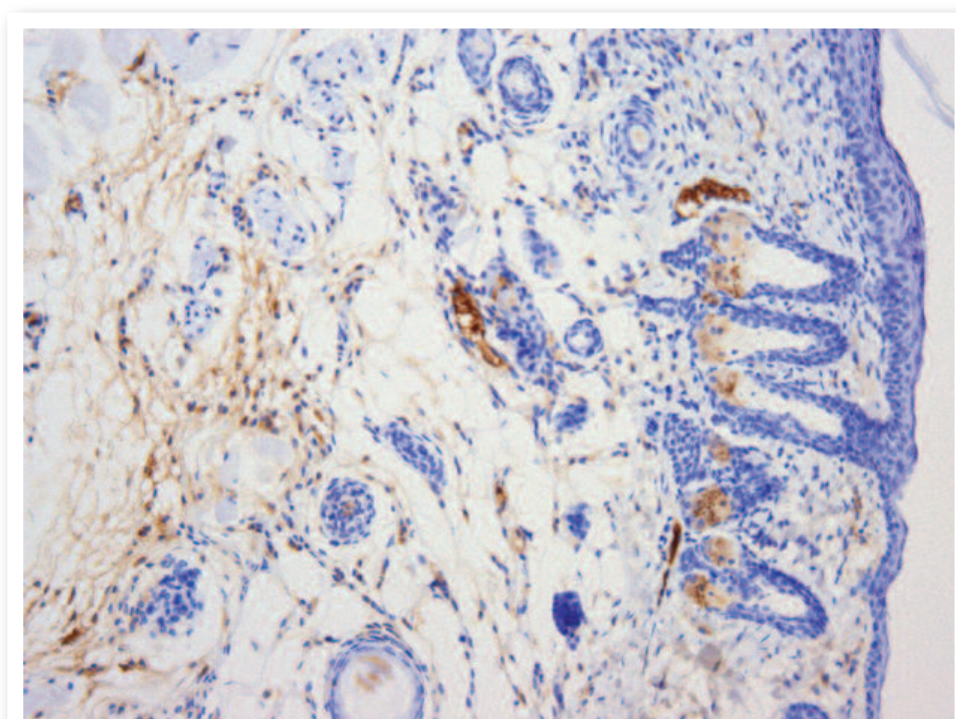


Figura 136. **CD3**

d. Resultados globales estudio inmunohistoquímico

	PCNA	MMP-9	TIMP
GRUPO I - Control (RUV)	1,16±0,29	0,69±0,1	0,53±0,3
GRUPO II (RUV + Almendras dulces)	1±0,18	0,84±0,37	0,86±0,26
GRUPO III (RUV + Aceite Crisálida Seda)	0,93±0,46	0,82±0,2	0,93±0,37
p-valor	0,278	0,243	0,013*

Tabla 14. **Resultados comparativos estudio inmunohistoquímico**



VI. DISCUSIÓN

Actualmente, el fotoenvejecimiento cutáneo supone uno de los procesos más frecuentes en patología humana, por lo que se ha convertido en un tema de enorme interés social y sanitario (muy especialmente en el campo de la dermatología), además de las importantes implicaciones económicas que comporta (*Kawada, 2011*).

El concepto fue establecido por Kligman en 1982, para describir los daños que ocurrían en la piel tras la exposición solar crónica. En realidad, corresponde a la superposición de los daños cutáneos provocados por la exposición crónica a las radiaciones ultravioleta, que se suman a los cambios que la piel sufre además con el transcurso del tiempo y que, a su vez, ha sido denominado como envejecimiento intrínseco o cronológico. Éste último es considerado como un envejecimiento fisiológico, mientras que al fotoenvejecimiento se le considera como un proceso patológico que, desafortunadamente, en gran parte es autoprovocado.

Durante los últimos 25 siglos, la piel blanca fue universalmente considerada como un componente esencial de la belleza humana entre la población del hemisferio norte. En la Biblia existen numerosas referencias en este sentido, mientras que también de forma reiterada, la piel bronceada u oscura era considerada como indeseable, puesto que ocurría en personas de bajo nivel social que pasaba gran parte de su vida expuesto al sol, en los trabajos peor considerados. Curiosamente, es solo a partir del primer tercio del siglo XX, cuando el bronceado cutáneo comienza a ser considerado como un factor cosmético y, por tanto, a ser relacionado con la belleza (*Vicente, 2009*).

A partir de esta fecha, es cuando de forma masiva comienza a ocurrir un cambio en los gustos estéticos de la población. Este hecho parece que estuvo condicionado fundamentalmente por dos acontecimientos: el primero, se relacionó con la concesión del premio Nobel de Medicina a Niels Finsen, en el año 1903, por el descubrimiento de los efectos beneficiosos de la radiación ultravioleta en el tratamiento de diversas afecciones cutáneas. Este hecho llevó a la creación de un nuevo campo en la ciencia médica: la Fototerapia.

El otro hito, estuvo representado por la extensión de un nuevo concepto sobre las libertades individuales, de la que fue un claro exponente la diseñadora Coco Chanel, una de las grandes vanguardistas del bronceado; de modo que la exposición al sol, a partir de esa fecha, fue considerada como una forma de consecución de una mayor libertad individual y por tanto, algo socialmente deseable. De ahí que el paso hacia el predominio del bronceado, supuso un cambio total de estilo de vida de la población (*Vicente, 1999*).

La piel, el órgano más extenso del cuerpo humano (alrededor de dos metros cuadrados), tiene una misión fundamental como barrera de protección, tanto del medio interno, como frente a la atmósfera externa y muy especialmente a las radiaciones solares. La exposición persistente al sol ha permitido ir conociendo progresivamente los cambios degenerativos que ocurren en la piel, con el cáncer cutáneo como máxima expresión (*Avci, 2013*).

El cáncer cutáneo constituye la neoplasia maligna humana más frecuente (*Matsumara, 2002*). Además, su prevalencia en las sociedades occidentales ha aumentado exponencialmente en los últimos años; así en Estados Unidos, en el año 2011, se diagnosticaron más de un millón de casos nuevos de cáncer cutáneo no melanoma y 53.000 melanomas (*Jemal, 2011; Siegel, 2012*).

Actualmente, supone uno de los motivos de consulta médica más frecuentes. Aunque su pronóstico es excelente tras la cirugía, excepto el melanoma, su abordaje clínico y terapéutico supone la dedicación de un alto porcentaje del presupuesto sanitario en el mundo occidental (Yaar, 2007; Jemal, 2011).

Además de todo lo comentado, existen importantes problemas metodológicos (la larga y lenta evolución de los tumores), así como los motivos éticos que implican el desarrollo de modelos experimentales en humanos. Por estas razones, se explica el enorme interés que supone el desarrollo de modelos de fotoenvejecimiento en animales de laboratorio. El objetivo de los mismos es conocer el mecanismo de producción y la evolución de los cambios que tienen lugar en la piel, así como ensayar y determinar los posibles efectos beneficiosos de diversas sustancias sobre la fotoprotección (Yaar, 2007).

Aunque son numerosas las especies animales que se han utilizado como modelos en este tipo de estudios, en realidad han sido unas pocas las utilizadas, que van desde minipigs (Kligman, 1982) a cobayas (Kreuzmann, 1990), ratas, (Nakamura, 1968), ratones e incluso peces (xiphophorus, medaka y pez cebra) (Kurita, 2004).

No obstante, los animales más utilizados corresponden a roedores, tanto con pelo como sin él y fundamentalmente a los ratones (Becker, 2010): C57BL/6J; BALB/C; CBA, (Benavides, 2009), Swiss, Hairless: HR-1, SKH1, etc. (Sharma, 2011).

Por eso, para la realización de este trabajo hemos elegido como modelo animal el ratón sin pelo SKH1/CRL, procedentes del Skin and Cancer Hospital, Temple University. Philadelphia, 1986 (Charles River Laboratories. New York, USA), aclimatados y criados en el servicio de Animales de Laboratorio (SAI) de la Universidad de Murcia. Es un modelo de elección por ser animales albinos y sin pelo, presentando una



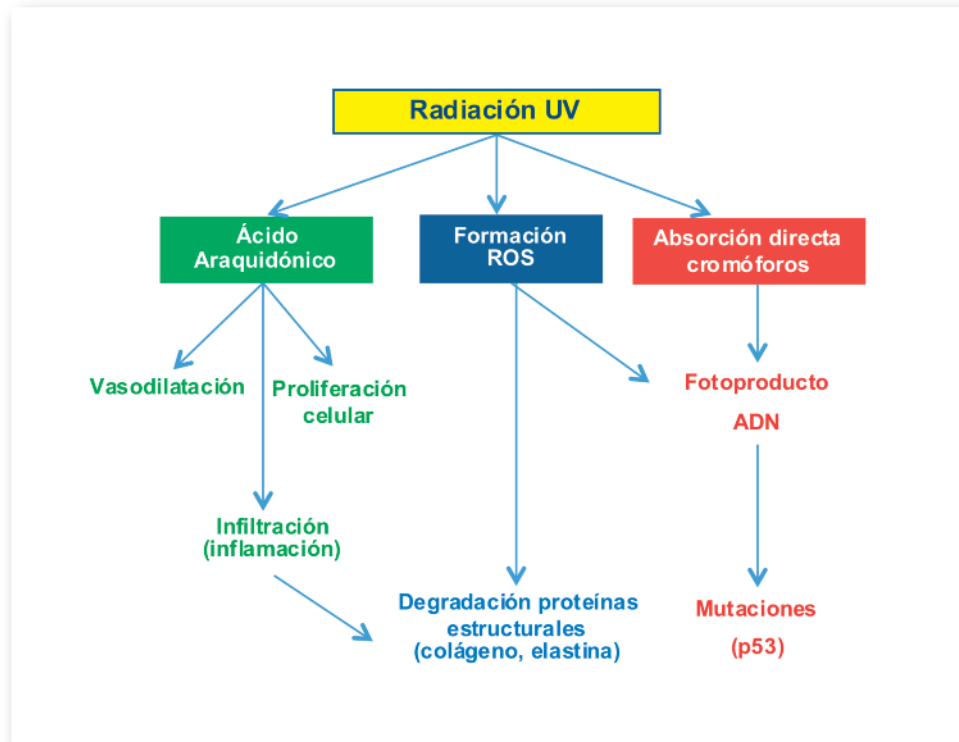
piel muy sensible a los efectos de las radiaciones ultravioleta y además, son animales eutímicos y por lo tanto, inmunocompetentes, de fácil manejo y bajo coste.

El primer objetivo planteado en nuestro trabajo fue desarrollar un modelo de fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis cutáneas en esta cepa animal, por los motivos antes expuestos y basándonos en los resultados obtenidos de un estudio previo de nuestro grupo de investigación (Cano, 2010).

Como en el trabajo de Cano (2010) antes citado, en este hemos utilizado ratones SKH1, hembras de cuatro semanas de edad, a las que expusimos a los efectos de una lámpara Philips Type HB 554/01/A, 100 W-R35, que emite un espectro de 220-425 nm y un pico máximo de 364 nm (98,6% UVA y 1,4% UVB).

La exposición se realizó en jaulas de PVC con separadores individuales para cada ratón y cubierta de celosía metálica colocándolos a una distancia foco/piel de 20 cm, durante sesenta minutos por sesión, tres veces a la semana durante ochenta sesiones, por ser este periodo cuando los tumores alcanzaron los criterios de punto final en el citado trabajo. La energía absorbida por sesión fue de 21,1 J/cm², por lo que al final de las 80 sesiones, la energía total absorbida por cada animal fue de 1.688 J/cm². En el transcurso del experimento, observamos toda la patología asociada a la exposición crónica a las radiaciones ultravioleta.

En la patogenia de estas lesiones, y de un modo esquemático, se han implicado tres mecanismos patológicos fundamentales como consecuencia de la acción de las radiaciones a su paso a través de los tejidos, que representamos en la figura siguiente:



- a) La degradación del ácido araquidónico de las membranas celulares de los queratinocitos epidérmicos conduce a la formación de diversos productos, que actúan como mediadores químicos de la inflamación (prostaglandinas, interleuquinas, cininas, citoquinas, etc.). Éstos son los responsables de los cambios vasculares mediante la regulación de la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular y de la migración de células sanguíneas a la dermis (Svobodova, 2006). Los neutrófilos activados producen mieloperoxidasa, que cataliza la producción de ROS. Los monocitos y macrófagos tisulares fagocitan el tejido dañado. Las células inflamatorias secretan factores quimiotácticos y factores de crecimiento que promueven un mayor reclutamiento de células inflamatorias y la reparación de los tejidos. (Wilgus, 2003).

- 
-
- b) La formación de radicales libres o especies reactivas del oxígeno (ROS) son responsables de la degradación de las proteínas dérmicas (colágeno, elastina, etc.), fundamentales en la producción de la elastosis solar o actínica, arrugas cutáneas e incluso de las lesiones del apartado siguiente, es decir, las mutaciones que pueden abocar en neoplásicas (*Scharffetter-Kochanek, 2000; Halliday, 2005*).
- c) La absorción directa de la energía por cromóforos de la epidermis (ADN, ARN, melanina, el ácido urocánico, lípidos, proteínas) va a originar la formación de fotoproductos, especialmente dímeros de pirimidina que absorben diferentes longitudes de onda específicas (*Young, 1997*). Éstas, al liberarse posteriormente, originarán reacciones fotoquímicas con daño genético directo, que lleva a la producción de mutaciones y trastornos del crecimiento neoplásico cutáneo o fotocarcinogénesis, generalmente como consecuencia de las longitudes de onda corta de la RUV B y A (*Brash, 1997; Young, 1998*). También se produce daño oxidativo indirecto por efecto de reacciones de fotosensibilización endógena en relación con las longitudes de onda mayores de la RUV A (*Burren, 1998*). Este daño celular va a generar, a su vez, la liberación de diversos mediadores químicos de la inflamación con las acciones descritas en el apartado a), junto a la acción moduladora sobre otros tipos celulares como queratinocitos, células de Langerhans, fibroblastos, etc.

En nuestro estudio, todos los animales sometidos a la exposición crónica de las radiaciones ultravioleta presentaban a lo largo del experimento múltiples lesiones; no obstante, encontramos diferencias fundamentalmente entre las lesiones de los animales del **grupo control I** y los del **grupo III** (RUV + aceite de crisálida) en relación con el tiempo de presentación de las mismas, su extensión, intensidad, etc.

El primer cambio macroscópicos observado en los animales del Grupo I (RUV exclusivamente) correspondió a la presentación, desde la primera sesión, de eritema difuso en toda la zona del dorso, que fue pasajero durante las tres o cuatro primeras semanas y que después se hacía permanente, de color rojo violáceo con aspecto reticular o telangiectásico característico.

El eritema consiste en la respuesta cutánea aguda más evidente y conocida tras la exposición a las radiaciones UV. Está justificado por el primer mecanismo descrito en el apartado a) del esquema antes expuesto. No obstante, el mecanismo interno no está bien establecido; no se conoce con precisión cuáles son los cromóforos responsables, pero la hipótesis del daño directo de los UVB y UVA de onda corta sobre el ADN se sumaría al daño oxidativo indirecto secundario a las reacciones endógenas de fotosensibilidad. Otros estudios también sugieren el papel importante que puede jugar el óxido nítrico como causa de la vasodilatación. Recientemente, se ha demostrado que el óxido nítrico (NO) es producido por los queratinocitos después de la irradiación UVB (*Sushek, 2010*).

También se ha evidenciado el papel que los leucocitos polinucleares neutrófilos desempeñan tras la exposición a la radiación ultravioleta, fundamentalmente sus enzimas, en el mantenimiento de la vasodilatación capilar (*Rijken, 2004, 2005; Samanek, 2006*).



Asimismo, tras la irradiación cutánea se produce liberación de mediadores químicos del eritema, como eicosanoides, histamina y otros factores quimiotácticos, que regulan la expresión de las moléculas de adhesión en el endotelio vascular y en los queratinocitos, produciendo migración de las células sanguíneas, mononucleares y neutrófilos, encargados de causar vasodilatación e inflamación (*Rijken, 2009*).

Está demostrado que la RUV afecta a las moléculas de adhesión, aumentando la expresión de ICAM-1 (molécula de adhesión de células endoteliales -1) en queratinocitos 48-96 horas después de la exposición, y la ELAM-1 (molécula de adhesión intercelular-1), en las células superficiales endoteliales del plexo venular a las 24 horas, encontrándose una disminución a las 72 horas (*Norris, 1991*).

El aumento de los niveles cutáneos basales de histamina disminuye dentro de las primeras 24 horas, lo que indica la presencia de otros mediadores, como las prostaglandinas y el ácido araquidónico, que están elevados a las 6 horas y alcanzan un pico máximo entre las 18 y 24 horas postexposición a RUV, cuando la reacción se torna más intensa; los valores basales disminuyen en el término de 48 horas. Existen otros mediadores con capacidad vasodilatadora que se encuentran también aumentados, como la sustancia P, el óxido nítrico, interleucinas, etc. (*Clydesdale, 2001*).

También se ha demostrado que después de la irradiación UV, los inhibidores de las prostaglandinas, como la indometacina, reducen la intensidad de la fase inicial de eritema por RUVB hasta 24 horas; sin embargo, la fase más tardía, se mantiene sin cambios (*Ibbotson, 1996*). Asimismo, el ácido araquidónico y las prostaglandinas E2 y F2 α muestran niveles elevados a las 6 horas de la exposición, alcanzando un pico máximo entre 18 y 24 horas, cuando la reacción inflamatoria está en su apogeo y regresan a valores basales a las 48 horas, momento en el que el eritema ha disminuido parcialmente. Por otro lado, se ha compro-

bado la presencia en la piel irradiada de bradiquinina en las primeras fases de la inflamación (*Black, 1978*).

Otras citoquinas relacionadas con la formación de vasodilatación y que han sido encontradas en la piel tras la irradiación con RUV son las interleuquinas (IL-1, 6, 8, 10, 12) y el factor de necrosis tumoral α , así como un aumento de las concentraciones de la sustancia P y de calcitonina (*Vostáloká, 2010*).

Microscópicamente, en nuestro estudio, los cambios más llamativos en esas áreas cutáneas correspondían al ensanchamiento de la dermis papilar por aumento y dilatación de la red vascular capilar, que mostraba frecuentes dilataciones y aspecto tortuoso y al aumento de la sustancia intercelular, que explican el eritema que presentaban clínicamente los animales.

En este sentido, se ha descrito que tanto la UVA como la UVB producen cambios en la dermis, como consecuencia de la degranulación de las células cebadas que ocurre en las primeras 24 horas, seguido por una rápida recuperación hasta la normalidad. Además, se observa un infiltrado inflamatorio mixto, alrededor de los vasos superficiales, que aparece en horas y alcanza el máximo a las 24-48 horas (*Natan, 2006*).

En humanos, la respuesta de la piel tras el eritema corresponde a la pigmentación, que muestra dos etapas: una pigmentación inmediata y una tardía. La pigmentación o bronceado inmediato, se presenta pocos minutos después de la exposición y se caracteriza por ser de un color más grisáceo que el bronceado tardío. Esta pigmentación tiende a desvanecerse en minutos; pero si la exposición es continua y prolongada, puede durar varios días y se combina con el bronceado tardío. Este bronceado sería la consecuencia de longitudes de onda comprendidas entre los 320 y 450 nm, que corresponderían a RUV B de onda larga, RUV A y luz visible. Los cambios histológicos observados involu-



cran la oxidación de la melanina existente y la redistribución de los melanosomas melanocíticos, desde una posición perinuclear al interior de las dendritas periféricas y luego, al citoplasma de los queratinocitos. La pigmentación o bronceado tardío se hace visible 72 horas después de la exposición a la RUVB, y perdura durante días o semanas. En los individuos de piel clara, la RUVB induce más eritema que bronceado, a diferencia de la RUVA. Se asocia con aumento en la actividad y número de los melanocitos (*Hönigsmann, 2002*).

En nuestros animales no pudimos observar estos fenómenos puesto que son animales albinos en los que no funciona el sistema de la melanogénesis.

Otro efecto observado tras la irradiación corresponde al endurecimiento cutáneo, también denominado “hardening”, que consiste en un engrosamiento de la capa córnea y del estrato de Malpighio (acantosis), que se suele acompañar de incremento de melanina, como respuesta a la acción eritematogénica o pigmentaria de la RUV. Las exposiciones repetidas provocan un engrosamiento de la capa córnea en forma directa o indirectamente a través de una reacción inflamatoria. Aunque clásicamente se ha considerado que las exposiciones aisladas a RUVA no aumentan el espesor de la epidermis, exposiciones repetidas y continuas pueden hacerlo, como hemos observado en nuestro estudio, en el que todas las zonas cutáneas expuestas a las radiaciones experimentaron hiperplasia de queratinocitos; alcanzando grandes espesores en algunos casos, sobre todo en los grupos I (control UV) y II (UV + aceite almendras dulces). Este fenómeno representa un mecanismo de protección frente a las radiaciones UV. Observamos que a partir del periodo antes citado (25ª semana de exposición a RUV), toda esa zona cutánea mostraba engrosamiento irregular de aspecto granular difuso, que se acompañaba con frecuencia de superficie escamosa y un marcado patrón geométrico de la piel.

El segundo cambio que observamos fue la presencia de arrugas cutáneas. Aparecieron a partir de la 10ª u 11ª semana y en especial, a partir de la 12ª semana; en principio eran de disposición longitudinal, localizándose en toda la superficie dorsal de los animales y alternaban con otras zonas cutáneas de engrosamiento irregular. Estas lesiones se mantenían durante todo el experimento y se acompañaban de engrosamiento nodular difuso y progresivo. En las zonas con lesiones neoplásicas, las arrugas se disponían de forma radial a los tumores.

Microscópicamente, en la dermis destacaba el engrosamiento marcado, tanto de la zona papilar, por el aumento y la disposición tortuosa de los capilares sanguíneos y de la red capilar subpapilar, como de la reticular. La mayor alteración en la piel fotoenvejecida es la deposición de grandes cantidades de material elástico anormal, que se denomina elastosis solar. En diversos estudios con ratones, Bernstein (1995) demostró que la elastosis solar está acompañada por un aumento de elastina y fibrilina ARNm y la regulación positiva de la actividad del promotor de la elastina. En las alteraciones microscópicas observadas en nuestro estudio, destacaban los fenómenos de desorganización de la estructura general, así como la disposición del entramado de las fibras colágenas y elásticas, distinguiéndose tres grados de disposición: uno, en el que predominaban las fibras mal organizadas, dispuestas preferentemente de forma individualizada, que se conoce como elastosis solar grado I; otro, en el que las fibras con estas características alternaban con zonas en que se disponían en acúmulos irregulares y compactos de elastina, ligeramente basófilos o Grado II; y por último, en el que observamos un predominio marcado de los acúmulos compactos de elastina (Grado III).

El ratón sin pelo está demostrando ser un modelo relevante para el estudio sistemático de fotoenvejecimiento. Al igual que en los seres humanos, con la radiación ultravioleta crónica, estos ratones desarrollan



hiperplasia de las fibras elásticas, seguido de elastosis y su degradación ultraestructural. El colágeno está dañado y su metabolismo se altera, mientras que los niveles normalmente bajos de proteoglicanos y glicosaminoglicanos están muy mayores (*Kligman, 1989*)

Asimismo, observamos con frecuencia áreas irregulares de fibrosis, con múltiples focos de infiltrados de linfocitos y células plasmáticas.

La radiación UV es responsable de que se incremente la actividad catalítica de diversas metaproteinasas de la matriz extracelular (MMP), con lo que se favorece, en principio, el recambio de las proteínas y glucosaminoglicanos dañados por las radiaciones. Además, la agresión actínica acelera la infiltración de leucocitos neutrófilos en el seno de la dermis, que secretan una elastasa de amplio espectro, muy activa en el proceso de degradación de diversas moléculas de la matriz extracelular: elastina, fibronectina y diversos glucosaminoglicanos (*Rijken, 2004, 2005*).

La sobreproducción y/o el descenso de degradación de las fibras elásticas, ocasiona la acumulación anormal de las mismas en la dermis. En este sentido, numerosos estudios han demostrado la sobreexpresión de elastina y fibrilina en la piel expuesta a las radiaciones (*Bernstein, 1994*). Algunos investigadores han documentado que la exposición crónica a las radiaciones ultravioleta provoca la estimulación de la secreción de metaloproteinasas (MMPs) (MMP-1, -2, -7, -8 y -12) y elastasa por los neutrófilos infiltrados o por los fibroblastos dérmicos, lo que implicaría que la degradación de fibras elásticas por enzimas elastóticas estaría también relacionada con la patogenia de la elastosis actínica. La actividad de las MMPs y la elastasa está regulada por inhibidores específicos de proteasas, inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs) y por anti-leucoproteinasas cutáneas (elafin) (*Muto, 2007*).

Trabajos recientes demuestran que la expresión de elafin se incrementa en la epidermis de la piel normal cuando ésta se somete a la

radiación UV. Tanto las células cutáneas como los macrófagos sintetizan y liberan este inhibidor específico. Elafin es una proteína compleja en la que destaca la presencia de un dominio que actúa como sustrato de transglutaminasas, conocido como cementoina. Este dominio es responsable de que el inhibidor se fije de forma intensa a las fibras elásticas alteradas (sobre todo por la radiación solar), con lo cual impide su degradación por las elastasas de origen neutrófilo.

En estas circunstancias, la agresión solar incrementa la actividad catalítica de las MMPs, acelerando la degradación de las fibras de colágeno, de la fibronectina y de los glucosaminoglicanos. Con ello, la dermis se empobrece de sus macromoléculas más abundantes, pero elafin no sólo impide que se produzca una renovación de las fibras de elastina, sino que favorece la anómala acumulación de fibras elásticas dañadas y, por tanto, carentes de funcionalidad.

Por todo ello, parece aceptable que la elastosis pueda combatirse mediante moléculas capaces de bloquear elafin, ya que con ello podrían favorecer la renovación de la elastina anómala (*Shibata, 2010*)

La liberación de esta elastasa por los neutrófilos requiere la previa activación de receptores específicos presentes en la membrana plasmática de estos leucocitos, en especial, los conocidos con el nombre de β -integrinas. Diversos estudios han demostrado que los más característicos ligandos de estos receptores son citocinas (IL-8, TNF- α), liberadas a consecuencia de la radiación UV y liposacáridos o tripéptidos bacterianos (por ejemplo, N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) (*Shapiro, 2002; Chua, 2006*).

El primer estudio que encontramos en la bibliografía, diseñado específicamente para producir elastosis en un ratón sin pelo, fue el de Berger en 1980, en ratón desnudo de una cepa albina (Ng /), que normalmente tiene una red de fibras elásticas bien desarrollada (*Berger, 1980*).



Por otra parte, los cambios inducidos por la radiación UV en la dermis de ratones SKH1, que han sido descritos en la bibliografía, incluyen alteraciones de las fibras elásticas, la degradación del colágeno y glicosaminoglicanos, asociado con alteración de la actividad de las metaloproteinasas de la matriz. De modo que los ratones expuestos de forma crónica a la radiación UV desarrollaban arrugas, como importantes pliegues longitudinales en el dorso. Éstas difieren de las arrugas humanas en que surgen después de sólo unas pocas semanas de exposición a la radiación UV, además de ser debidas a cambios en la epidermis en lugar de en la dermis.

Durante estos últimos años se han realizado numerosas investigaciones que han permitido identificar diversas enzimas, que incluyen átomos metálicos (Zn) en su molécula, conocidas como metaloproteinasas de la matriz (MMP), antes denominadas colagenasas, elastasas, etc. Esta actividad degradativa también incluye algunas serinproteasas, e incluso proteasas inespecíficas, y depende de la intensidad de la agresión de la RUV. Los fibroblastos no sólo sintetizan proteínas poco funcionales, sino que también incrementan los niveles de MMP; algunas células sanguíneas, como los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, también liberan MMP en el espacio extracelular dérmico. Los neutrófilos sintetizan y liberan las elastasas (serinproteinasas) en la dermis. Además, se ha demostrado que algunas MMP degradan la fibrilina de las microfibrillas que rodean la elastina (*Muto, 2007; Rijken, 2009*).

Por otra parte, se ha demostrado que la piel humana, sometida “in vivo” a radiación UV capaz de provocar eritema, expresa de forma evidente MMP-8. Esta metaloproteinasa se sintetiza y almacena en los gránulos de los leucocitos neutrófilos y su actividad colagenasa es decisiva para el recambio del tejido conjuntivo que ha sufrido un proceso inflamatorio. Se puede concluir que la radiación eritematogénica atrae a los neutrófilos y provoca la liberación de MMP-8, cuya actividad cola-

genasa se suma a las que liberan los fibroblastos y, por tanto, agrava el fotoenvejecimiento cutáneo. Además, los fibroblastos irradiados sintetizan y liberan MMPs. Está demostrado que este proceso se inicia por la activación producida por el "oxígeno singulete" ($1O_2$), por la hormona melanocito estimulante (α -MSH) liberada por los queratinocitos y por factores de proliferación y receptores de citocinas. (Fisher, 2008).

Asimismo, otros estudios han demostrado que la expresión de MMPs por parte de los fibroblastos puede ser una consecuencia de la actividad del óxido nítrico (NO). Este radical gaseoso es una molécula mensajera multifuncional formada a partir de la L-arginina por enzimas como la sintetasa inducible del óxido nítrico (iNOS). El NO actúa activando la guanilato ciclasa, responsable de la formación de GMPc intracelular, con lo cual se activan las proteinquinasas dependientes del GMPc. Los fibroblastos dérmicos que expresan MMPs también se hallan sometidos a la influencia de las moléculas mensajeras que liberan los queratinocitos irradiados. Con este mismo enfoque se ha comprobado que los queratinocitos expuestos a radiación UV sintetizan y liberan NO, el cual es capaz de disparar la síntesis de melaninas por los melanocitos (Reelfs, 2004).

La radiación UV provoca en la dermis una reacción molecular en cadena, que en última instancia da como resultado un aumento, tanto en la dermis como en la epidermis, de metaloproteinasas de la matriz que estimulan la producción de colagenasa, gelatinasa y estromelisina-1, tanto en fibroblastos como queratinocitos. El resultado es la alteración del colágeno y de la elastina, así como otros componentes de la matriz extracelular dérmica (Choe, 2003).

La exposición repetida a la energía solar hace que los mecanismos de la reparación de la matriz dérmica sean cada vez más deficientes, con un efecto acumulado sobre la estructura y organización de su base de colágeno. Lo que en principio son defectos invisibles en la ma-



triz dérmica reparada, con ciclos repetidos de exposición, se hacen visibles a simple vista en forma de flacidez de la piel y la formación de arrugas (*Kang, 2003*).

En nuestro estudio a partir de la 36ª semana eran muy frecuentes las lesiones eritemato-escamosas, dispuestas en placas irregulares, con el centro de aspecto erosivo y bordes sobreelevados, recubiertas por costras fibrino-hemorrágicas. A partir de 50 sesiones, toda la superficie cutánea del dorso mostraba áreas con engrosamiento cutáneo irregular de aspecto queratósico, firmes al tacto e incluso con fijación a los tejidos subyacentes. Las lesiones ulceradas eran también muy frecuentes con bordes irregulares y engrosados.

Microscópicamente destacaban las áreas de atrofia que alternaban con otras de engrosamiento epitelial con hiperplasia de células basales, acantosis con o sin papilomatosis, con frecuente pleomorfismo celular y nuclear, mas hiperqueratosis y paraqueratosis, disqueratosis y diversos grados de displasia.

A partir de 60 sesiones, eran constantes las lesiones tumorales nodulares, generalmente múltiples. La mayoría de ellas en relación con las zonas de engrosamiento queratósico y muchas estaban ulceradas. Con menos frecuencia, las lesiones tumorales adoptaban un aspecto verrucoso o papiliforme, con la porción central deprimida de aspecto crateriforme recubierto de costra queratósica.

Microscopicamente correspondían a múltiples áreas de carcinoma "in situ", así como focos de carcinoma microinvasor o a carcinomas de células escamosas. Las lesiones epiteliales malignas eran muy frecuentes y al contrario que en la patología humana, en este modelo de carcinogénesis cutánea experimental no se podía discriminar entre el carcinoma de células basales y el epidermoide o espinocelular. Como era lógico, tampoco se desarrollaron melanomas. Todos los animales

del grupo control desarrollaron carcinomas de células escamosas, lo que pone de manifiesto la efectividad del modelo.

Por tanto, consideramos este modelo, idóneo para el estudio del fotoenvejecimiento cutáneo y la fotocarcinogénesis. Se trata de un modelo animal fácilmente reproducible y de coste bajo, en el que la exposición crónica a las radiaciones provoca el espectro de lesiones propias del fotoenvejecimiento en periodos diferenciados y siempre ocasiona el cáncer cutáneo si la exposición es prolongada (entre 65 y 80 sesiones), por lo que fue elegido para la realización de nuestro estudio.

El mecanismo implicado en estos fenómenos, se ha explicado porque la radiación UV actúa indirectamente sobre el daño de la piel al interferir en el proceso de reparación del ADN y por la interferencia con componentes del sistema inmune (específicamente células T y las células de Langerhans) que actúan para erradicar las células cancerígenas (*Gilchrest, 1996*).

También, más recientemente se ha demostrado que la radiación UV puede actuar para prevenir la apoptosis en las células expuestas al sol, con lo que podrían promover el desarrollo de neoplasias. En este aspecto, la radiación UV se puede considerar como un carcinógeno completo, ya que puede actuar, tanto como iniciador del cáncer a través de mutación del ADN, como promotor del crecimiento neoplásico a través de los procesos inflamatorios secundarios a la exposición a la RUV acumulativa (*Ismail, 2011*). Por ello, la Agencia de Investigación del cáncer de la OMS, incluyó a las radiaciones ultravioletas en el grupo 1 de agentes carcinógenos (*Landrigan, 2011*).

Casi todas las mutaciones por RUV B y C originadas experimentalmente se localizan en las pirimidinas adyacentes y alrededor de dos tercios son mutaciones distintivas (*Brash, 1991*). El tercio restante también son generadas por las radiaciones ultravioletas, pero probablemente surjan a partir de la producción de ROS (*Wondrak, 2001*).



Dado que existen muchos carcinógenos que generan esta lesión oxidativa, es difícil conocer si la fuente de las mutaciones fue la RUV B, la A, o la fosforilación oxidativa intracelular. La RUV-A, induce levemente la aparición de mutaciones distintivas por RUV-B a través de la fotosensibilización, pero genera mutaciones similares a las oxidativas en intercambios $T \rightarrow G$. Estos intercambios se observan raramente con las UVB u otros carcinógenos, por lo que se ha propuesto que esta sea el daño distintivo de la RUV A (*Halliday, 2005*).

Está demostrado que la RUVB induce la síntesis de la enzima ornitin-decarboxilasa, que limita la tasa de síntesis de poliaminas que estimulan la proliferación celular (*Afaq, 2005*). Ello facilita la formación de neoplasias, a lo que se suma la síntesis de óxido nítrico, que a su vez, induce la producción de eritema, melanogénesis y la inmunosupresión que favorece la carcinogénesis (*Cals-Grierson, 2004*). Por último, también favorece la angiogénesis dérmica, al disminuir la expresión de los inhibidores de trombospondina-1 y además, la expresión de dos factores angiogénicos, como el VEGF y el factor de crecimiento endotelial dependiente de plaquetas (*Howell, 2004; Yano, 2005*).

En el estudio de Zheng (1993) compara las acciones de la radiación ultravioleta A con la B. Irradiaron ratones albinos sin pelo con luz ultravioleta, un grupo con RUVA y otro con RUVB. Los cambios más notables inducidos por RUVA fueron la hiperplasia de las fibras elásticas sin evidencia de desintegración de las fibras, un gran aumento de microfibrillas depositadas al azar, la duplicación masiva de la membrana basal vascular, un extenso daño celular endotelial y las fibras de colágeno con diámetros más pequeños, pero sin daños aparentes. Por el contrario, después de la RUVB, los acúmulos de fibras elásticas con frecuencia estaban degradadas; las microfibrillas aumentaban moderadamente. Además, a diferencia con los rayos UVA, la membrana basal de la epidermis se duplicó mientras que la de los vasos se mantenía. Por

lo tanto, las características ultraestructurales proporcionan evidencia adicional de que daño de la piel inducido por los rayos UVA puede ser diferente a la inducida por UVB.

Los estudios experimentales con modelos animales han confirmado que la porción más corta y más energética del espectro ultravioleta (RUVB) es responsable de la destrucción del tejido conectivo dérmico observado en la piel fotoenvejecida. Más recientemente, se ha demostrado que los rayos UVA y la radiación infrarroja contribuyen de manera significativa a fotoenvejecimiento, produciendo, entre otros cambios, elastosis severa. Debido a que las tres bandas de ondas amplias están inseparablemente unidos en la luz solar terrestre, todos son motivo de preocupación en el fotoenvejecimiento de la piel humana (Kligman, 1989).

En el siguiente esquema, se resume el efecto de las radiaciones ultravioletas que causan fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis:





La R-UVA es extremadamente cancerígena pues penetra más profundamente en el interior de los tejidos cutáneos, causando degradación de la dermis. Esta degradación tiene lugar por la activación de citoquinas y enzimas colagenasas, elastasas, etc. Dichas enzimas aceleran aún más la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que provocan daños en el ADN.

Por otro lado, la R-UVB interactúa con la epidermis, causando la activación de las enzimas que alteran el ADN, lo que conduce a patologías como la inflamación, la degradación de la elastina, la proliferación celular, etc.

A nivel celular, el efecto combinado de la R-UVA y R-UVB conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno que activan directamente las MMPs, desencadenando reacciones en cascada múltiple que llevan a la transcripción de genes proinflamatorios y proapoptóticos. Todo ello conduce a la inflamación, la apoptosis y, finalmente, a la fotocarcinogénesis (*Gupta, 2014*).

Además se ha descrito que la radiación UV daña el ADN y puede dar lugar a alteraciones genómicas, que varía desde mutaciones puntuales a dislocaciones cromosómicas. La radiación UVB (banda de longitud de onda de 280-315 nm) es más cancerígena que la radiación UVA (315-400 nm) en la inducción experimental de carcinoma de células escamosas (SCC). El impacto de la radiación UVB puede deducirse claramente de las mutaciones puntuales características de p53 se encuentran en SCC humano y BCC.

En contraste con la radiación UVB, la mayor parte de la acción mutagénica y carcinogénica de la radiación UVA parece estar mediada a través de especies reactivas de oxígeno (ROS) (*de Grujil, 2002*).

Como **segundo objetivo** de nuestro trabajo, nos planteamos conocer los efectos de los dos aceites ensayados (almendras dulces y de crisálida de gusano de la seda) sobre el modelo de fotoenvejecimiento cutáneo desarrollado en el primer objetivo, es decir, su posible papel como fotoprotectores.

Parece que desde la Antigüedad el hombre ha cuidado la piel; así en los pueblos primitivos la cosmética tenía un carácter mágico o religioso; de las dinastías egipcias datan los primeros remedios cosméticos asociados a la medicina: ungüentos, aceites, tabletas de arcilla e incluso fórmulas para las arrugas; en Grecia y Roma alcanzó un gran auge, desarrollándose un auténtico ritual de cuidados; se perfumaban, incorporando la práctica del baño y de los masajes y utilizaban gran cantidad de cosméticos para embellecerse y evitar la desecación cutánea, lo que indica la importancia que siempre ha tenido el mantenimiento de la piel en el canon de belleza a lo largo de la Historia (*Abad, 1999*).

Estos hechos se mantuvieron hasta el primer tercio del siglo XX, en el que como hemos comentado al principio de este apartado, ocurrió un cambio radical de la población occidental respecto a la belleza, comenzando a ser considerado el bronceado de la piel como un factor estético y por tanto a relacionarse con la belleza (*Vicente, 1999*).

Sin embargo, con los beneficios del Sol también se conocieron rápidamente sus inconvenientes (*Müller y Raab, 1997*). Los egipcios se protegían del Sol con un cucurucho colocado sobre la cabeza que contenía sebo y mirra y que, al fundirse por el calor, se derramaba por la cabeza y por el cuerpo, protegiendo a la piel. En este sentido, existe una innumerable lista de remedios para las quemaduras solares a base de aceites, sebo, mirra, heliotropo, vinagre, etc. Estos serían los primeros filtros solares de protección (*Abad, 1999*).



Por otro lado, durante las últimas décadas, la exposición solar ha sufrido un aumento considerable, sobre todo la de tipo intermitente o recreativo, que explica en gran parte el aumento descrito de la incidencia del cáncer cutáneo. De ahí el enorme interés de la fotoprotección. De una forma ideal, la fotoprotección debe prevenir los efectos adversos, tanto agudos como crónicos, de la exposición crónica al sol y sus principales objetivos deben ser retrasar el fotoenvejecimiento e impedir la proliferación del cáncer cutáneo.

Existen diferentes tipos de fotoprotectores en función del tipo de filtro y su mecanismo de acción (*Montero, 2008*). Los filtros solares son considerados actualmente como la primera línea de defensa frente a las radiaciones ultravioleta y se consideran dos grupos principales: los orgánicos que corresponden a los conocidos hasta ahora como químicos, y los inorgánicos, llamados previamente, físicos. Los más usados son los químicos u orgánicos. Son sustancias químicas de síntesis que actúan como cromóforos absorbiendo la energía transportada por un fotón incidente; posteriormente, las moléculas vuelven a su estado inicial, liberando el exceso de energía en forma de calor imperceptible, radiación fluorescente o transformación química en un isómero o fotoproducto potencialmente reactivo (*Yaar, 2007*)

Los filtros biológicos son sustancias que penetran más allá de la superficie y refuerzan a las células para que se defiendan mejor de la radiación. Tienen actividad antioxidante y, aplicadas tópicamente, disminuyen el estrés oxidativo inducido por la radiación ultravioleta. Por consiguiente, potencian la protección conferida por los filtros solares convencionales y disminuyen el consiguiente daño celular que podría ser origen de fotoenvejecimiento y cáncer de piel.

Entre estos filtros biológicos se encuentran sustancias que, como diversas vitaminas, presentan actividad antioxidante directa. Además, también existen otras sustancias que ejercen esta actividad antioxi-

dante a través de su capacidad quelante del hierro (diferentes flavonoides) y sustancias que aumentan la actividad de las enzimas antioxidantes de la piel (algunos oligoelementos). Estos filtros han demostrado su eficacia frente a los efectos de los rayos ultravioleta, pues son antioxidantes que evitan la formación de radicales libres y de esta manera, potencian el subsistema inmunológico cutáneo. En este grupo se encuentran las vitaminas A y E (*Tuchinda, 2006*).

La aplicación tópica de antioxidantes parece prometedora, sin embargo, hay escasez de ensayos clínicos controlados en humanos sobre el papel de los antioxidantes en la prevención o desaceleración del envejecimiento cutáneo. Por tanto, es necesario un mayor número de estudios experimentales. La investigación actual sugiere que las combinaciones de diferentes antioxidantes parecen tener efectos sinérgicos y, por esta razón, una mejor eficacia en comparación con la aplicación de un antioxidante único.

A pesar de la falta de datos, cada año se destinan millones de dólares a la investigación con estos productos en todo el mundo. En este punto, es importante entender que estos agentes son inocuos cuando se aplican tópicamente, pero su eficacia exacta es todavía desconocida (*Alleman, 2009*). Además, algunos datos sugieren que podría obtenerse un beneficio acumulativo o aditivo, cuando se utilizan combinaciones de productos antioxidantes, por vía oral o tópica. En este sentido, existe bibliografía sobre el efecto antienvjecimiento de extractos de isoflavonas de soja vía oral en ratones (*Kim, 2004*) y de los beneficios de los antioxidantes aplicados tópicamente (*Allemanm 2009*).

Otro grupo importante corresponde a los aceites esenciales, mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas, que dan el aroma característico a algunas flores, árboles, frutos, hierbas, especias, semillas y a ciertos extractos de origen animal (almizcle, civeta, ámbar gris).



Se trata de productos químicos intensamente aromáticos, no grasos (por lo que no se enrancian), volátiles por naturaleza (se evaporan rápidamente) y livianos (poco densos). Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. Se oxidan por exposición al aire.

Se han extraído más de 150 tipos, cada uno con su aroma propio. Proceden de plantas tan comunes como el perejil y tan exquisitas como el jazmín. Están constituidos principalmente por terpenoides volátiles, formados por unidades de isopreno unidas en estructuras de 10 carbonos (monoterpenoides) y 15 carbonos (sesquiterpenoides). Las sustancias responsables del olor suelen poseer en su estructura química grupos funcionales característicos: aldehídos, cetonas, ésteres, etc. Cada aceite lo integran por lo menos 100 compuestos químicos diferentes, clasificados como aldehídos, fenoles, óxidos, ésteres, cetonas, alcoholes y terpenos. (Martínez, 1996).

En este estudio hemos utilizado dos aceites esenciales, el de almendras dulces y el de crisálida del gusano de la seda.

El **aceite de almendras** comestible proviene del almendro, cuyo nombre científico es *prunus dulcis*, var. *Amygdalus* y ha sido utilizado en los círculos de medicina complementaria, por sus numerosos beneficios para la salud. Aunque no hay datos científicos concluyentes, parece ser que las almendras y aceite de almendras tienen muchas propiedades, incluyendo la anti-inflamatoria, la estimulación de la inmunidad y efectos anti-hepatotoxicidad.

Históricamente, el aceite de almendras se había utilizado en la antigua China, las escuelas ayurvédicas y greco-persas de Medicina para tratar condiciones de la piel seca, como la psoriasis y el eczema. El aceite de almendras dulces es un gran emoliente para suavizar y acondicionar la piel. Es una rica fuente de antioxidantes (Sheikh, 2013). También se ha descrito

su papel como reductor de la cicatrización hipertrófica y suaviza y rejuvenece la piel, por sus propiedades emolientes y esclerosantes (*Ahmad, 2010*).

Además, se han establecido asociaciones entre el aceite de almendra y la mejora de tránsito intestinal, lo que consecuentemente reduce los síntomas del síndrome del intestino irritable y algunos estudios sugieren una reducción en la incidencia de cáncer de colon. Por otra parte, también se han identificado los beneficios cardiovasculares del aceite de almendras en la elevación de los niveles del llamado “colesterol bueno”, lipoproteínas de alta densidad (HDL), al tiempo que reduce las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (*Ahmad, 2010*).

En nuestro trabajo, la evolución de las lesiones cutáneas de los animales del GRUPO II (RUV + Aceite de almendras dulces) fue totalmente superponible a las del Grupo I (RUV individualizada) durante las primeras 50 sesiones, caracterizadas por eritema y engrosamiento cutáneo irregular, con reforzamiento del patrón geométrico de la piel y múltiples arrugas longitudinales en el dorso. Hacia la sexta ó séptima semana, se presentaban múltiples lesiones eritemato-escamosas que aumentaban en número y extensión, confluyendo en placas irregulares erosivas de bordes sobreelevados y tapizadas por costras fibrino-hemorrágicas.

A partir de cincuenta sesiones, también como en el grupo I (Control RUV), predominaban las lesiones de aspecto nodular y queratósico, erosivas y de mayor diámetro. A partir de sesenta sesiones, casi todas estaban ulceradas, con bordes sobreelevados y arrugas prominentes, irradiando hacia la periferia. En casi todos los animales, se observaban grandes lesiones nodulares de centro deprimido y con aspecto de cráter queratósico. No obstante, no observamos diferencias estadísticamente significativas respecto al control (*Grupo I*). Microscópicamente presentaban características superponibles a las del grupo I, observándose un 100% de incidencia de tumores malignos.



Por tales motivos, podemos concluir que el aceite de almendras dulces no ha demostrado efectos fotoprotectores en nuestro estudio. En la bibliografía consultada hemos encontrado solo de forma excepcional algún trabajo en el que estudian los efectos fotoprotectores del aceite de almendras dulces que demuestran resultados variables (*Sultana, 2007*). En este estudio, compararon los efectos de la radiación ultravioleta B en ratones tratados con aceite de almendras. Los resultados bioquímicos, estimación de glutatión y peroxidación de lípidos, así como estudio histopatológico, mostraron que el aceite de almendras reducía el efecto del fotoenvejecimiento por R-UVB.

En nuestro estudio sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre los grupos control y el tratado con aceite de almendras dulces, lo que podría deberse a que nuestros ratones fueron irradiados predominantemente por R-UVA y sobre todo a la duración del experimento, que en el trabajo de sultana fue mucho más corto, pues acababa a las 12 semanas.

El segundo producto ensayado, fue el aceite de la crisálida del gusano de la seda.

La seda es segregada por las glándulas sericígenas del gusano de seda (*Bombyx mori* L.), que la utiliza para elaborar el capullo, una estructura cerrada de protección en la que realiza la metamorfosis de larva a adulto. Tal y como es segregado el hilo de seda, que es continuo y puede medir hasta 1.500 metros, consta de dos proteínas: una de ellas es la *fibroína*, que es una proteína polimérica y lineal, que altera dominios amorfos y otros de lámita beta. Constituye el 70% del peso del capullo. La otra proteína es la *sericina*, hidrosoluble y de estructura globular, que mantiene unidos los filamentos de fibroína. La sericina es normalmente desechada en el proceso textil aunque tiene diversas aplicaciones en cosmética (*Cenis, 2008*).

La cría y la utilización del gusano de seda (crisálida) se remonta a más de 2.700 años atrás en China. Inicialmente se explotaba con fines textiles pero pronto se comenzó a utilizar su extracto aceitoso para usos terapéuticos, sobre todo para las alteraciones de la piel, debido a su gran poder de regeneración y sus propiedades antioxidantes.

Sin embargo, en el mundo occidental el aceite de crisálida fue descubierto de manera casual en Córcega. Fue en la primera mitad del S. XX, cuando un médico observó que las heridas que se hacían las mujeres que trabajaban en la fábrica de seda, al separar el gusano del capullo, sanaban con celeridad, cicatrizando totalmente sin dejar secuelas, lo que atribuyó a un líquido aceitoso contenido en el interior del gusano de la seda (conocido hoy en día como aceite de gusano de seda o aceite de crisálida). (<http://www.lineaysalud.com/belleza/447-aceite-crisalida-gusano-seda.html>). (Salud, L. Y.: Verse bien es sentirse bien. cita) 180. Reddy, R. M.: Review Article: Value Addition Span of Silkworm Cocoon-Time for Utility Optimization. International Journal of Industrial Entomology. 2008; 17(1), 109-113.

En nuestro estudio, en los animales del GRUPO III (RUV + aceite de crisálida del gusano de la seda), las lesiones cutáneas evolucionaron de forma similar a la de los grupos anteriores, aunque con mayor lentitud, de forma que se hacían patentes alrededor de dos o tres semanas más tarde que en los Grupos I y II. Asimismo, alcanzaban diámetros menores y afectaban a áreas cutáneas menos extensas.

Las lesiones eritemato-erosivas patentes no se observaron antes de las 65 sesiones. Las lesiones queratósicas, las ulceradas y las neoformaciones nodulares no eran patentes antes de las 70 sesiones, e incluso en dos animales no se presentaron lesiones de estas características.

A diferencia de lo observado en el Grupo II, los animales tratados con aceite de crisálida de seda (Grupo III), sí demostraron diferencias estadísticas significativas respecto a las lesiones del Grupo I.



En primer lugar, comparamos las áreas de las lesiones de todos los grupos. Así, el grupo tratado con el aceite de crisálida del gusano de la seda (grupo III) presentó los mejores resultados, con una media de 115,67 mm² y desviación estándar de 34'65, frente a los 176,48 mm² y desviación estándar de 51'89 del Grupo II (aceite de almendras dulces) y los del Control (Grupo I), que fueron 195,78 mm² y 62'32, respectivamente. Es decir, la superficie de las lesiones en el grupo tratado con el aceite de la crisálida del gusano de seda se redujeron en un 40,86% respecto al grupo control (el área media era del 59,14%), mientras que el tratado con aceite de almendras dulces, tan sólo redujo el área media en un 10%.

Por otro lado, se observa un retraso en los ratones del grupo III en cuanto a la presentación de las lesiones cutáneas (6-9 semanas), con respecto a los otros grupos. Y además, hubo dos animales sin lesiones tumorales al final del experimento.

Respecto a las lesiones microscópicas, la incidencia de la displasia III, carcinoma in situ, carcinoma microinvasor e invasor fue inferior en el Grupo III, a la sufrida por los grupos I y II, disminuyendo desde el 15% en el caso de la displasia II al 20% del carcinoma invasor. Asimismo ocurría con los daños dérmicos como la elastosis y de los vasos, con una disminución del 33%.

Como en el grupo II (aceite de almendras dulces), en el caso del aceite de crisálida del gusano de seda, tampoco hemos encontrado en la bibliografía trabajos donde se utilice de modo específico el aceite de la crisálida, aunque sí hemos encontrado algunos estudios sobre la utilización de la sericina como potente agente antioxidante y fotoprotector contra la irradiación de ultravioleta B (UVB), sobre un modelo experimental con ratones (*Dash, 2008*).

En otro experimento (*Zhaorigetu, 2003*), señalan el efecto protector de la sericina respecto a la capacidad de reducción significativa

en la incidencia de tumores y el número de tumores. El tratamiento con sericina produjo, además, cambios morfológicos que reflejan la respuesta inflamatoria, incluyendo la infiltración de leucocitos, hiperplasia y proliferación celular. Además, la sericina suprimió de forma significativa la elevación en el nivel de 4-HNE y expresiones elevadas de c-fos, c-myc y la ciclooxigenasa-2 (COX - 2). Los resultados sugieren que la sericina posee efecto protector contra la promoción de tumores en la piel del ratón mediante la supresión de la tensión oxidativa, respuestas inflamatorias y TNF – α .

Por otro lado, hemos encontrado el estudio in vitro de Pongcharoen (2013), sobre la posible acción fotoprotectora de la luteína que se extrae de la seda, sobre queratinocitos humanos irradiados con R-UVB.



En el **tercer objetivo**, nos planteamos la realización del estudio sistematizado del comportamiento biológico de los tumores desarrollados en nuestro modelo experimental, en diferentes aspectos. Con él pretendimos conocer la cinética de crecimiento de dichos tumores, para lo que realizamos la inmunotinción con un anticuerpo de proliferación celular (PCNA). Además, debido a la importancia pronóstica, consideramos relevante el estudio de su capacidad de invasión para lo que realizamos la tinción con el anticuerpo anti-metaloproteinasa-9 y con un inhibidor de la misma (TIMP). El trabajo se completó con el estudio del infiltrado inflamatorio (CD3/CD20), ya que en general, los tumores con más respuesta inflamatoria suelen presentar mejor pronóstico.

Las características microscópicas en la que se basan las distintas clasificaciones tumorales se completa con la información acerca de la cinética celular (*Almendral, 1987; García, 1989*). De modo que se puede determinar con mayor exactitud la tasa de recambio celular en tejidos normales y en los tumorales, así como conocer más detalladamente el porvenir biológico de los tumores (pronóstico), gracias a los distintos métodos de estudio para la evaluación de la proliferación celular (*Carey, 1992*).

Durante mucho tiempo, los estudios de proliferación celular estuvieron restringidos al estudio de la división celular, mediante el conteo de mitosis. Sin embargo, en los últimos años se han ido desarrollando técnicas inmunocitoquímicas, no sólo para detectar los precursores de la síntesis de ADN incorporados por la células en fase S, sino para detectar antígenos nucleares. Estos antígenos se engloban bajo el término genérico de antígenos nucleares de proliferación celular (PCNAs), debido a que constituyen estructuras antigénicas que no son observables en las células en reposo. El estudio de estos antígenos se ha desarrollado fundamentalmente en el campo de la oncología, pues su expresión es diferente en células normales y en las transformadas (*Busch, 1977; Davies, 1978; Smetana, 1983*).

El antígeno de proliferación celular (PCNA) es una proteína ácida nuclear no histona, de 36 kd, con 261 aminoácidos con alto contenido glutámico y aspartato (*Almendral, 1987*). Esta proteína fue descubierta en 1978 mediante el estudio de anticuerpos en pacientes con lupus eritematoso (*Miyachi, 1978*) y funciona como adyuvante de la síntesis de DNA (*Bravo, 1987*).

El gen que codifica PCNA ha sido clonado en diversas especies, existiendo sólo 4 aminoácidos diferentes entre el PCNA humano y el de rata. La conversión y la evolución del PCNA en el reino animal y vegetal, sugieren que este antígeno desempeña un papel fundamental en la replicación de DNA en eucariotas, siendo su presencia necesaria aunque no suficiente para el proceso de proliferación celular (*Mac Cornnick, 1992*). PCNA también está implicado en la escisión-reparación de nucleótidos al comprobarse la asociación de éste con la cromatina en todas las fases del ciclo celular tras irradiación con luz ultravioleta "in vitro" (*Toschi, 1988*)

Ruth et al. (2012) realizaron un trabajo en el que trataron a 50 ratones SKH-1 con Sarcopin-Diol (extracto del coral blando *Sarcophyton glaucum*) tras la irradiación con ultravioleta B. El agente se administraba de forma tópica en la piel de los animales tras la irradiación y fue utilizado en diferentes concentraciones: 30, 45 y 60 mL. Además del estudio de la incidencia tumoral, realizaron la inmunotinción con el anticuerpo de proliferación nuclear PCNA, encontrando diferencias significativas con el control solamente en la dosis mayor.

En nuestro estudio, aunque observamos inhibición de la carcinogénesis en los grupos tratados (con diferencias estadísticamente significativas en el grupo III), no existía significación estadísticamente estadística entre los grupos respecto al marcaje de la proliferación celular. Éste era de predominio leve en todos los grupos, por lo que en este aspecto, los tumores eran similares.



Las metaloproteinasas (MMPs) son enzimas cuyas funciones y papel en la progresión del cáncer han sido estudiadas con gran interés en los últimos años. Se ha investigado su papel como iniciadores de la angiogénesis, en relación con la producción de metástasis, inflamación y otros aspectos patológicos asociados a la carcinogénesis. Hace 30 años, Liotta señaló el papel que podría desempeñar la inhibición de algunas MMPs en la disminución del crecimiento tumoral y por tanto como arma terapéutica en la lucha contra el cáncer y desde entonces, se han dedicado grandes esfuerzos a la investigación en este campo (*Cripta, 2014*).

También algunos estudios clínicos (*Fisher et al, 2009*) han señalado aspectos prometedores respecto a la expresión de inhibidores de MMP, aunque con resultados muy limitados. En este sentido, la utilización de agentes de origen natural como drogas frente a MMP para evitar la proliferación del cáncer cutáneo no melanoma provocado por la exposición crónica a las radiaciones solares ha supuesto una innovación en el tratamiento farmacológico clásico de esta enfermedad (*Manuello, 2006*).

Estas enzimas se encargan de la degradación de la matriz extracelular (MEC), actuando como enzimas proteolíticas (proteasas). La gran familia de las MMPs puede dividirse en 8 clases atendiendo a su estructura. La característica común a todas ellas es la presencia de un pre-dominio N-terminal al que sigue un pro-dominio que guarda una fuerte asociación con el zinc y el calcio y otros dominios catalíticos. Otro aspecto común en la estructura de las MMPs es el dominio para el enlace de colágeno, implicado en la unión al colágeno, elastina, ácidos grasos, etc. (*Morrison, 2009*). Además de su papel fisiológico, estas enzimas están relacionadas con un gran número de aspectos patológicos, incluyendo los diferentes mecanismos de progresión del cáncer.

Existen diferentes MMPs dependiendo de su estructura química. Las colagenasas, también llamadas colagenasas neutrofilicas, especial-

mente la MMP-8, ha sido utilizada ampliamente para romper el colágeno fibrilar, mientras que las gelatinasas, de las que las más conocidas son las MMP -2 y -9, muestran una presencia relevante en cánceres de mama, colon, pulmón, piel y ovarios (*Fisher, 2009*). Estas MMPs degradan colágeno, elastina y otros componentes de la MEC. Ambas son proenzimas, por lo que requieren una activación previa, y están fuertemente relacionadas con la proliferación de las células tumorales, la angiogénesis, las metástasis, etc. El papel crucial que juegan estas gelatinasas en la angiogénesis ha sido ampliamente documentado en estudios in vivo e in vitro.

Considerando el papel de la ruptura de la membrana basal en la progresión tumoral y en el proceso de metástasis, la actividad de la MMP-9 ha sido estudiada en diferentes tipos de cáncer. En un estudio realizado por Poswar et al (2013), observaron una expresión similar de esta enzima en SCC de diferente grado de malignidad (Broder's), Además encontraron una mayor positividad para los carcinomas microinvasores que en aquellos que invadían en profundidad. Por tanto, concluyeron que la actividad proteolítica de la MMP-9 se da sobre todo en estadios iniciales de la carcinogénesis y que después decrece.

Los resultados publicados por estos autores, concuerdan con lo observado en nuestro estudio, ya que el marcaje de la metaloproteinasa 9 fue menos intenso en el grupo control que en los grupos tratados, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Es decir, que los tumores más avanzados, los desarrollados en el grupo control, fueron los que expresaron el marcaje de esta enzima con menor intensidad.

Existen inhibidores de los MMPs naturales (TIMP) y sintéticos, como algunos derivados de tetraciclinas o el Marimastat, que se encuentran en la actualidad en ensayos clínicos de fase III. Los TIMP endógenos son proteínas que se secretan en respuesta a una sobreproducción de MMPs. TIMP-1 es más potente que TIMP-2 y TIMP-3 frente a MMP-1, MMP-3 y MMP-9 (*Gupta, 2014*).



En este sentido, algunas sustancias naturales como la melatonina o la escualamina del cartílago de tiburón (NovastatÒ) han demostrado capacidad para inhibir la expresión de MMPs (especialmente la 2 y la 9) y favorecer la actividad de los TIMP en diversos tipos de cáncer (mama, estómago, vesícula o pulmón) (González, 2011; Schwarnarker, 2011). Otros compuestos estudiados con resultados relevantes son la Nobiletina, Myricetina, Curcumina, Resveratrol, Xanthamizol, Anticianidinas o Aloe Vera.

Considerando su papel como inhibidores de los MMPs, los TIMPs son considerados como elementos anti-invasivos y anti-metastásicos en el cáncer. Por este motivo, decidimos realizar el marcaje inmunohistoquímico de TIMP-1 en los tumores desarrollados en los animales de nuestro estudio. En este caso, si que observamos un marcaje más intenso en el caso de los dos grupos tratados que en el control, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que la inhibición de la progresión tumoral observada en los animales tratados podría ser debida a la inducción de la producción de TIMP en el estroma, que habrían inhibido la acción proteolítica de las metaloproteinasas y por lo tanto, el fenómeno de invasión tumoral, en los grupos tratados.



VII. RESUMEN

La piel es el órgano más extenso del organismo y puede sufrir, además del envejecimiento cronológico, el denominado fotoenvejecimiento o envejecimiento cutáneo patológico. Este fenómeno está caracterizado por un envejecimiento cutáneo más extenso y sobre todo, de mayor gravedad, pues engloba la fotocarcinogénesis o presentación de cánceres cutáneos.

Desde la Antigüedad, el hombre tuvo conciencia de la importancia del Sol en su vida, pero también de sus efectos indeseables. En la actualidad las sociedades de los países desarrollados invierten sumas millonarias en la investigación de sustancias que eviten o retrasen los efectos del envejecimiento, no sólo por el culto a la belleza, sino por el gran coste económico que tiene la asistencia sanitaria de las lesiones.

En los últimos años, los aceites esenciales han recibido gran atención dada su capacidad antioxidante, que podría interferir en los mecanismos de fotoenvejecimiento, evitando la formación de radicales libres y de esta manera, potenciando el subsistema inmunológico cutáneo.

Por otro lado, a las dificultades metodológicas que supone la lenta evolución de tumores, se suman las limitaciones éticas del desarrollo de modelos experimentales en humanos. Por esta razón, el primero de los objetivos de nuestro trabajo fue el establecimiento de un modelo de fotoenvejecimiento cutáneo en ratones SKH-1 mediante la exposición crónica a Radiación Ultravioleta (RUV).



El segundo objetivo de nuestro estudio, ha sido evaluar las propiedades de dos aceites, el de almendras dulces y el de la crisálida del gusano de la seda, como posibles fotoprotectores.

Para la realización de este estudio, utilizamos 60 ratones SKH1/CRL, que se sometieron a radiación ultravioleta, 60 minutos por sesión, tres veces por semana, durante un total de 80 sesiones, con 1.688 J/cm² de energía total absorbida por cada animal. Los ratones se dividieron en tres grupos. El primero sólo recibió RUV (Control) y los otros dos eran tratados tópicamente, previo a la irradiación, con aceite de almendras dulces (Grupo II) y con aceite de la crisálida del gusano de seda (Grupo III).

Todos los animales expuestos a las RUV presentaron las alteraciones características del fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis cutáneos, por lo que consideramos este modelo experimental como idóneo para el estudio de esta patología, pues la exposición crónica a las radiaciones provoca el espectro de lesiones propias del fotoenvejecimiento, si la exposición es prolongada (entre 65 y 80 sesiones) y además, se trata de un modelo fácilmente reproducible y de bajo coste.

No obstante, observamos diferencias significativas entre los animales tratados con el aceite de la crisálida del gusano de seda (Grupo III) respecto a los de los otros dos grupos. La superficie de las lesiones es en este grupo un 59,14% respecto al grupo control (reducción del 40,86%); el grupo tratado con aceite de almendras dulces, tan sólo redujo el área media en un 10%. Por otro lado, en los ratones del grupo III se observa un retraso en la presentación de las lesiones cutáneas (6-9 semanas), con respecto a los otros grupos y hubo dos animales sin lesiones tumorales al final del experimento. Esto sugiere las propiedades fotoprotectoras del aceite de crisálida del gusano de seda, probablemente debidas a la acción de la sericina que contiene, que es un potente antioxidante.



VIII. CONCLUSIONES

1. La exposición crónica a RUV (más de 60 sesiones) originó en todos los animales del Grupo Control, el espectro lesional característico del fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis cutáneos, con un 100% de incidencia de carcinomas escamosos.
2. Los animales tratados con el aceite de almendras dulces no mostraron diferencias significativas en cuanto a las lesiones cutáneas con el Grupo Control.
3. En el grupo tratado con el aceite de crisálida del gusano de la seda ocurrió un retraso en la presentación de las lesiones cutáneas (6-9 semanas), disminución significativa de las áreas lesionadas (40,86%) y menor número de lesiones pre-malignas y malignas, destacando la reducción del 30% del carcinoma escamoso.
4. El estudio inmunohistoquímico mostró disminución de la metaloproteinasa-9 en el grupo control y aumento significativo de la expresión de TIMP-1, que podría explicar la inhibición de la progresión tumoral observada en los animales tratados.



IX. BIBLIOGRAFÍA

- 1 **Abad Martínez, L.:** *Discurso de contestación a la recepción pública del Ilmo. Sr. Dr. D. Vicente Vicente Ortega en la Real Academia de Medicina y Cirugía de Murcia*. 1999. Editorial Nogué.
- 2 **Afaq, F.; Mukhtar, H.:** *Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging*. *Exp Dermatol*, 2006; 15(9): 678-684.
- 3 **Ahmad, Z.:** *The uses and properties of almond oil*. *Complement Ther Clinical Pract* 2010; 16(1): 10-12.
- 4 **Alfonso, Á. R. C.; de la Peña Pino, R.; Acosta, J. A.; Griego, A. G.:** *Comunicación breve*. *Rev Cubana Invest Biomed*. 2007; 26(2).
- 5 **Alcaraz, M. V.; Pathak, M. A.; Rius, F.; Kollias, N.; González, S.:** *An extract of Polypodium leucotomos appears to minimize certain photoaging changes in a hairless albino mouse animal model: A pilot study*. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 1999; 15(3-4): 120-126.
- 6 **Allemann, I. B.; Baumann, L.:** *Antioxidants used in skin care formulations*. *Skin Therapy Lett* 2008 13(7), 5-9.

- 
-
- 7 **Allemann, I. B.; Baumann, L.:** *Botanicals in skin care products*. Int J Dermatol 2009; 48(9): 923-934.
 - 8 **Allemann, I. B.; Baumann, L.:** *Educación Médica Continua*. Dermatología, 8. Rev. Chilena Dermatol. 2009; 25(1):8-20.
 - 9 **Almendral, J. M.; Huebsch, D.; Blundell, P. A.; Macdonald-Bravo, H.; Bravo, R.:** *Cloning and sequence of the human nuclear protein cyclin: homology with DNA-binding proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Proceed. 1987; 84(6), 1575-1579.
 - 10 **Amano, S.; Ogura, Y.; Akutsu, N.; Matsunaga, Y.; Kadoya, K.; Adachi, E.; Nishiyama, T.:** *Protective effect of matrix metalloproteinase inhibitors against epidermal basement membrane damage: skin equivalents partially mimic photoageing process*. Brit J Dermatol 2005; 153(s2): 37-46.
 - 11 **Amano, S.:** *Possible involvement of basement membrane damage in skin photoaging*. In: J Investig Dermatol Symp Proc 2009; 14 (1): 2-7.
 - 12 **Ananthaswamy, H.N.; Fourtanier, A.; Evans, R.L.; Tison, S., Medaisko, C.; Ullrich, S.E., Kripke, M.L.** *p53 mutations in hairless SKH-hr1 mouse skin tumors induced by a solar simulator*. Photochem Photobiol 1998; 67: 227-32.
 - 13 **Antille, C.; Tran, C.; Sorg, O.; Carraux, P.; Didierjean, L.; Saurat, J.H.:** *Vitamin A exerts a photoprotective action in skin by absorbing ultraviolet B radiation*. J. Invest Dermatol 2003; 121 (5): 1163-7.
 - 14 **Arenas Sánchez, D. A.; Steven, H.:** *Libro interactivo sobre energía solar y sus aplicaciones* 2011.

- 15 Avci, P.; Sadasivam, M; Gupta, A.; De Melo, W.; Huang, Y.; Yin, R.; Rakkiyappan, C.; Kumar, R.; Otufowora, A; Nyame, T.; Hamblin, M.: *Animal models of skin disease for drug discover*. Expert Opin Drug Discov 2013; 1746, 0441: 1-25.
- 16 Bhattacharyya, T. K.; Thomas, J. R. *Histomorphologic Changes in Aging Skin Observations in the CBA Mouse Model*. Arch Facial Plast Surg 2004; 6(1), 21-25.
- 17 Bech-Thomsen, N.; Poulsen, T.; Christensen, F. G.; Lundgren, K.; Wulf, H. C.: *UVA tanning devices interact with solar-simulated UV radiation in skin tumor development in hairless mice* 1992; Arch Dermatol Res ISSN: 0340-3696 (Print) 1432-069X (Online).
- 18 Becker, J. C.; Houben, R.; Schrama, D. et al.: *Mouse Models for melanoma: a personal perspective*. Exp Dermatol 2010; 19 (2): 157-64.
- 19 Beitner, H.; Wennersten, G.: *The immediate action of long-wave ultraviolet radiation (UVA) on suprabasal melanocytes in human skin: a transmission electron microscopical study*. Acta Derm Venereol 1983; 63: 328–334.
- 20 Benavides, F.; Oberyshyn, T. M.; VanBuskirk, A. M.; Reeve, V. E.; Kusewitt, D. F.: *The hairless mouse in skin research*. J Dermatol Sci. 2009; 53(1): 10-18.
- 21 Benedetto, A.V.: *The environment and skin aging*. Clin Dermatol 1998; 16 (1):129-139.
- 22 Berger, H.; Tsambaos, D.; Mahrle, G.: *Experimental elastosis induced by chronic ultraviolet exposure*. Arch Dermatol Res



1980; 269(1), 39-49.

23 Bernabéu, A.: *La necesaria fotoprotección*. Offarm 2007; 5(26): 51-56.

24 Bernstein, E. F.; Chen, Y. Q.; Tamai, K.; Shepley, K. J.; Resnik, K. S.; Zhang, H. et al.: Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photo-damaged skin. *J Invest Dermatol* 1994; 103:182-186.

25 Bernstein, E. F.; Brown, D. B.; Urbach, F.; Forbes, D.; Del Monaco, M.; Wu, M.; Uitto, J.: *Ultraviolet radiation activates the human elastin promoter in transgenic mice: a novel in vivo and in vitro model of cutaneous photoaging*. *J Invest Dermatol* 1995; 105(2): 269-273.

26 Bernstein, E. F.; Underhill, C. B.; Hahn, P.; Brown, D. P.; Uitto, J.: *Chronic sun exposure alters both the content and distribution of dermal glycosaminoglycans*. *Br J Dermatol* 1996; 135: 255-262.

27 Bernstein, E. F.; Brown, D. B.; Takeuchi, T. et al.: *Evaluation of sunscreens with various sun protection factors in a new transgenic mouse model of cutaneous photoaging that measures elastin promoter activation*. *J Am Acad Dermatol* 1997; 37 (5 Pt 1): 725-729.

28 Bissett, D. L.; Hillebrand, G. G.; Hannon, D. P.: *The hairless mouse as a model of skin photoaging: its use to evaluate photoprotective materials*. *Photodermatol* 1989; 6(5): 228-233.

29 Black, A. K.; Greaves, M. W.; Hensby, C. N.; Plummer, N. A.;

- Warin, A. P.:** *The effects of indomethacin on arachidonic acid and prostaglandins e2 and f2alpha levels in human skin 24 h after uvB and uvC irradiation.* Br J Clin Pharmacol 1978; 6(3): 261-266.
- 30 Borrego Hernando, L.:** *Problema clínico.* Rev Jano 2008; 1685: 34-38; www.jano.es
- 31 Branco, C. C.:** *Envejecimiento de la piel y las mucosas: fundamentos clínicos y enfoque integral.* Ed. Médica Panamericana, 2010.
- 32 Brash, D. E.; Rudolph, J. A.; Simon, J. A.; Lin, A.; McKenna, G. J.; Baden, H. P.; Ponten, J.:** *A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Proceed 1991; 88(22), 10124-10128.
- 33 Brash, D. E.:** *Sunlight and the onset of skin cancer.* Trends in genetics 1997; 13(10): 410-414.
- 34 Brash, D. E.; Ziegler, A.; Jonason, A. S.:** *Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion.* J Invest Dermatol Symp Proc 1996; 1(2): 136-42.
- 35 Bravo, R.; Frank, R.; Blundell, P. A.; Macdonald-Bravo, H.:** *Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ .* Nature 1987; 326: 515-517.
- 36 Bravo, R.; MacDonal-Bravo, H.:** *Existence of two populations of Cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell*

cycle: associated with DNA replication sites. J. Cell. Biol 1992; 105: 1549-1554.

37 Burgos, A. M.: *Recuerdo anatómico de la piel.* Estructura y funciones. www.portalesmedicos.com

38 Burren, R.; Scaletta, C.; Frenk, E.; Panizzon, R. G., Applegate, L. A.: *Sunlight and carcinogenesis: expression of p53 and pyrimidine dimers in human skin following UVA I, UVA I+II and solar simulating radiations.* Int J Cancer 1998; 76(2): 201-206.

39 Busch, R. K., Busch, H.: *Antigenic proteins of nucleolar chromatin of Novikoff hepatoma ascites cells.* Tumori 1977; 63(4): 347.

40 Cabrera Morales, C. M.; Lopez-Nevot, M. A.: *Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel.* Oncología (Barc.) [online] 2006; 29(7).

41 Camacho, F.: *Antiguos y nuevos aspectos de la fotoprotección.* Rev Int Dermatol Dermocosm Clin 2001; 4(7): 441-448.

42 Camacho F.: *Chronic radiation dermatitis: what's new in management?* Editorial. J Eur Acad Dermatol Venerolo 2000; 14:246-247.

43 Cano Gómez, A.; Gómez García, F. J.; Álvarez Sánchez, N.; Sánchez-Pedreño Guillén, P.; Vicente Ortega, V.: *Modelo de fotocarcinogénesis cutánea en ratones SKH-1 por radiación ultravioleta.* Rev Esp Patol 2010; 43(4): 191-195.

- 44 Carey, F. A., Fabbroni, G., Lamb, D.: *Expression of proliferating cell nuclear antigen in lung cancer: a systematic study and correlation with DNA ploidy*. Histopathology 1992; 20(6): 499-504.
- 45 Carlotti, M. E.; Ugazio E.; Sapino, S.; Pera, E.; Gallarate, M.: *Photodegradation of retinol and anti-aging effectiveness of two comercial emulsions*. J Cosmetic Sci 2005; 57(4): 261-277.
- 46 Cenis, J. L.: La seda como material en Medicina Regenerativa. Revista Eubacteria. 2008.
http://www.um.es/eubacteria/seda_medicina.pdf
- 47 Ciencia y Salud [internet] Avilable from: <http://cienciay-salud.laverdad.es/>
- 48 Clydesdale, G. J.; Dandie, G. W.; Muller, H. K.: *Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects*. Immunol Cell Biol 2001; 79(6): 547-568.
- 49 Cole, C. A.; Davies, R. E.; Forbes, P. D.; d'Aloisio, L. C.: *Comparison of action spectra for acute cutaneous responses to ultraviolet radiation: man and albino hairless mouse*. J Photochem Photobiol 1983; 37(6): 623-631.
- 50 Cole, C.A.; Forbes, P.D.; Ludwigsen, K.: *Sunscreen testing using the mouse ear model*. Photodermatol 1989; 6 (3): 131-136.
- 51 Costa, A.; Lindmark, L.; Arruda, L. H. F.; Assumpção, E. C.; Ota, F. S.; Pereira, M. D. O.; Langen, S. S. B.: *Clinical, biomet-*

ric and ultrasound assessment of the effects of daily use of a nutraceutical composed of lycopene, acerola extract, grape seed extract and Biomarine Complex in photoaged human skin. Anais Brasileiros de Dermatologia 2012; 87(1): 52-61.

52 Chaqour, B.; Bellon, G.; Seite, S.; Borel, J. P.; Fourtanier, A.: *All trans-retinoic acid enhances collagen gene expression in irradiated and non-irradiated hairless mouse skin. J Photochem Photobiol* 1997; 37(1): 52-59.

53 Chang, K. C.; Shen, Q.; Oh, I. G.; Jelinsky, S. A.; Jenkins, S. F.; Wang, W., Nagpal, S.: Liver X receptor is a therapeutic target for photoaging and chronological skin aging. *Mol Endocrinol* 2008; 22(11): 2407-2419.

54 Chang, K. C.; Wang, Y.; Oh, I. G.; Jenkins, S.; Freedman, L. P.; Thompson, C. C.; Nagpal, S.: *Estrogen receptor β is a novel therapeutic target for photoaging. Mol Pharmacol* 2010; 77(5): 744-750.

55 Chew, S.; DeLeo; V. A.; Harber, L. C.: *An animal model for evaluation of topical photoprotection against ultraviolet A (320-380 nm) radiation. J Invest Dermatol* 1987; 89(4): 410-14.

56 Cho, H. S.; Lee, M. H.; Lee, J. W.; No, K. O.; Park, S. K.; Lee, H. S.; Hong, J. T.: *Anti-wrinkling effects of the mixture of vitamin C, vitamin E, pycnogenol and evening primrose oil, and molecular mechanisms on hairless mouse skin caused by chronic ultraviolet B irradiation. Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2007; 23(5): 155-162.

57 Choe, T.; Lee, B.; Park, I.: *Inhibition of matrix metallopro-*

teinase-1 and-2 expression using nitric oxide synthase inhibitors in UV-irradiated. J. Cosmet. Scio 2003; 54, 229-238.

58 Chua, F.; Laurent, G. J.: *Neutrophil elastase: mediator of extracellular matrix destruction and accumulation.* Ann Am Thorac Soc 2006; 3(5), 424-427.

59 Chung, K. Y.; Chang, N. S.; Park, Y. K.; Lee, K. H.: *Effect of ultraviolet light on the expression of adhesion molecules and T lymphocyte adhesion to human dermal microvascular endothelial cells.* Yonsei Med . 2002; 43(2): 165-174.

60 Dash, R.; Acharya, C.; Bindu, P. C.; Kundu, S. C.: *Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts.* BMB Rep. 2008; 41(3): 236-241.

61 Dash, R.; Mandal, M.; Ghosh, S. K.; Kundu, S. C.: *Silk sericin protein of tropical tasar silkworm inhibits UVB-induced apoptosis in human skin keratinocytes.* Mol Cell Biochem 2008; 311(1-2): 111-119.

62 Davies, F. M.; Busch, R. K.; Yeoman, L. C.; Busch, H.: *Differences of nucleolar antigens of rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells.* Cancer Res 1978; 38: 1906-1915.

63 de Gruijl, F. R.; Sterenborg, H. J.; Forbes, P. D.; Davies, R. E.; Cole, C.; Kelfkens, G.; van der Leun, J. C.: *Wavelength dependence of skin cancer induction by ultraviolet irradiation of albino hairless mice.* Cancer Res 1993; 53(1), 53-60.

64 de Gruijl, F. R.: *Photocarcinogenesis: UVA vs UVB.* Methods Enzymol 2000; 319, 359-366.

- 65 de Gruijl, F. R.:** *Photocarcinogenesis: UVA vs UVB radiation.* Skin Pharmacol Physiol 2002; 15(5): 316-320.
- 66 De Laat, J.M; Seite, S.; Groenendijk, M.; Van Vloten, W.A.; De Gruijl, F.R.:** *Chronic UVA (365-nm) irradiation induced scratching in hairless mice: dose-time dependency and the effect of ketanserin.* Exp Dermatol 1997; 6(6):292-297.
- 67 El-Domyati, M.; Attia, S.; Saleh, F.; Brown, D.; Birk D.E.; Gasparro, F.; Ahmad, H.; Uitto J.:** *Intrinsic aging vs photoaging: a comparative histopatological, immunohistological and ultrastructural study of skin.* Exp Dermatol 2002; 11(5): 398-405.
- 68 Esteva E.:** *Fotoprotección. Consejos, precauciones y productos solares.* En Offarm 2005; 24(5).
- 69 Falcón Lincheta, L.; Martínez Cardoso, B.:** *Dermatosis provocadas por la luz solar e influencia en la calidad de vida.* Revi Cubana Med Mil 2012; 41(3): 248-255.
- 70 Feng, L.; Wang, Z.:** *Chemopreventive Effect of Celecoxib in Oral Pre-cancers an Cancers.* Laryngoscope 2006; 116(10): 1842-1845.
- 71 Fernández Vozmediano, J.M.; Armario Hita, J.C.:** *Retinoides en Dermatología.* Med Cutan Ibero Lat Am 2003; 31(5): 271-294.
- 72 Fisher, G.J.; Voorhees, J.J.:** *Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that*

induce Ap-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo. In: J Investig Dermatol Symp Proc. 1998; 3(1): 61-68.

73 Fisher, G.L.; Kang, S.; Varani, J.; Bata-Csorgo, Z.; Wan, Y.; Datta, S.; Voorhees, J.J.: *Mechanisms of photoaging and chronological skin aging.* Arch Dermatol 2002; 138 (11): 1462-1470.

74 Fischer, T. W.; Zmijewski, M. A.; Wortsman, J.; Slominski, A.: *Melatonin maintains mitochondrial membrane potential and attenuates activation of initiator (casp-9) and effector caspases (casp-3/casp-7) and PARP in UVR-exposed HaCaT keratinocytes.* J Pineal Res 2008; 44(4): 397-407.

75 Flores, S.; Gorouhi, F.; Maibach, H. I.: *Animal Models.* In: Textbook of Aging Skin. Springer Berlin Heidelberg 2010: 781-785.

76 Fourtanier, A.; Berrebi, C.: *Miniature pig as an animal model to study Photaging.* J. Photochem. Photobiol 1989; 50(6): 771-784.

77 Fujimura, T.; Moriwaki, S.; Takema, Y.; Imokawa, G.: *Epidermal change can alter mechanical properties of hairless mouse skin topically treated with 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃.* J Dermatol Sci 2000; 24(2): 105-111.

78 Garcia, R. L.; Coltrera, M. D.; Gown, A. M.: *Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparison with flow cytometric analysis.* Am J Pathol 1989; 134(4): 733.

79 García M.; Llames, S.; García et al.: *In vivo assessment of*



acure UVB responses in normal and Xeroderma Pigmentosum (XP-C) skin-humanized mouse model. Am J. Physiol 2010; 177 (2):865-72.

80 Garrote, A.; Bonet, R.: *Consejo Farmacéutico sobre fotoprotección.* En Offarm. 2002; (5).

81 Gasparro, F. P. Sunscreens, skin photobiology, and skin cancer: the need for UVA protection and evaluation of efficacy. *Environ Health Perspect* 2000; 108(1):71-78.

82 Gilchrest, B. A.; Park, H. Y.; Eller, M. S.; Yaar, M.: *Mechanisms of Ultraviolet Light-Induced Pigmentation.* *J Photochem Photobiol* 1996; 63(1): 1-10.

83 Glogau, R.; Kane, M.; Beddingfield, F.; Somogyi, C.; Lei, X.; Caulkins, C.; Gallagher, C.: *OnabotulinumtoxinA: a meta-analysis of duration of effect in the treatment of glabellar lines.* *Dermatol Surg* 2012; 38(11): 1794-1803.

84 Gómez García, F.J; Vicente Ortega, V.; Álvarez Sánchez, N.; Yáñez Gascón, J.; Alcaraz Baños, M.; Ortiz Ortiz, L.: *Modelo experimental de fotoenvejecimiento cutáneo por radiación ultravioleta A.* *Rev Esp Patol* 2007; 40, 2: 103-108.

85 González Fresneda, Y.; Peña Sánchez, M.; Sánchez Álvarez, R.; Santana, J. L.: Taninos de diferentes especies vegetales en la prevención del fotoenvejecimiento. *Rev Cubana Invest Biomed* 2001; 20(1): 16-20.

86 Goswami, P. K.; Samant, M.; Srivastava, R.: *Natural Sunscreen Agents: A Review.* *Acad. J. Pharm* 2013; 2(6):458-463.

- 87 Greaves, M.W.; Briffa, D.; Vella, A.: UV-A and the skin. *Brit J of Dermatol* 1981; 105: 477–482.
- 88 Griffiths, C.E.; Maddin, S.; Wiedow, O.; Marks, R.; Donald, A.E.; Kahlon, G.: *Treatment of photoaged skin with a cream containing 0,05% isotretinoin and sunscreens*. *J Dermatolog Tret* 2005; 16(2): 79-86.
- 89 Guercio-Hauer, C.; Macfarlane, D.F.; Deleo, V.A.: *Photo-damage, photoaging and photoprotection of the skin*. *Am Fam Phys* 1994; 50:327-32.
- 90 Gupta, A.; Kaur, C. D.; Jangdey, M.; Saraf, S: *Matrix metalloproteinase enzymes and their naturally derived inhibitors: Novel targets in photocarcinoma therapy*. *Ageing Res Rev* 2014; 13: 65-74.
- 91 Ha, L.; Noonan, F.P.; DeFabo, E.C. et al.: *Animal models of melanoma*. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2005; 10 (2): 86-88.
- 92 Hall, P.A.; Levison, D.A.; Woods, A.L.; Yu, C.C.W.; Kellock, D.B.; Watkins, J.A.; Barnes, D.M.; Gilet, C.E.; Camplejohn, R.O.; Waseem, N.H.; Lane, O.P.: *Proliferating cell nuclear proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms*. *J. Pathol* 1990; 162: 285-294.
- 93 Halliday, G. M.: *Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis*. *Mutat Res* 2005; 571(1): 107-120.
- 94 Hanke, C.W.; Buening, J.: *Sunscreens and sun protection –*

Update 2000 and sun protection – Update 2000. The Skin Cancer Foundation Journal 2000; 18:41-42,86.

- 95 Hattori, Y.; Nishigori, C.; Tanaka, T.; Uchida, K.; Nikaido, O.; Osawa, T.; Toyokuni, S.:** *8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure.* J Invest Dermatol. 1996; 107(5), 733-737.
- 96 Hirose, R.; Kligman, L. H.:** *An ultrastructural study of ultraviolet-induced elastic fiber damage in hairless mouse skin.* J Invest Dermatol. 1988; 90(5), 697-702.
- 97 Holubar, K.:** *Historical, anthropological and biological aspects of sun and skin.* Clinics in Dermatol. 1998; 6: 19-22.
- 98 Honeyman, J.:** *Efectos de las radiaciones ultravioletas en la piel.* Rev Per Dermatol. 2002; 12: 54, 62.
- 99 Hönigsmann, H.:** *Erythema and pigmentation.* J Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2002; 18(2), 75-81.
- 100 Ibbotson, S. H.; Diffey, B. L.; Farr, P. M.:** *The effect of topical indomethacin on ultraviolet-radiation-induced erythema.* Brit J Dermatol. 1996; 135(4), 523-527.
- 101 Ichihashi, M.; Ueda, M.; Budivanto, A.; Bito, T.; Oka, M.; Funkunaga, M.; Tsuru, K. Horikawa, T.:** *UV-induced skin damage.* Toxicol 2003; 89 (1-2): 21-39.
- 102 Jain, A.; Rieger, I.; Rohr, M.; Schrader, A.:** *Antioxidant efficacy on human skin in vivo investigated by UVA-induced chemiluminescence decay analysis via induced chemilumi-*

nescence of human skin. Skin Pharmacol Physiol 2010; 23(5): 266-272.

103Jantschitsch, C.; Weichenthal, M.; Proksch, E.: *IL-12 and IL-23 affect photocarcinogenesis differently*. J Invest Dermatol 2012; 132(5): 1476-86.

104Jean, C.; Bogdanowicz, P.; Haure, M. J.; Castex-Rizzi, N.; Fournié, J. J.; Laurent, G.: *UVA-activated synthesis of metalloproteinases 1, 3 and 9 is prevented by a broad-spectrum sunscreen*. J Photodermatol Photoimmunol Photomed 2011; 27(6): 318-324.

105Jemal, A.; Bray, F.; Center, M. M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D.: *Global cancer statistics*. CA: a cancer journal for clinicians 2011; 61(2): 69-90.

106Johnston, K. J.; Oikarinen, A. I.; Lowe, N. J.; Clark, J. G.; Uitto, J.: *Ultraviolet radiation-induced connective tissue changes in the skin of hairless mice*. J Invest Dermatol 1984; 82(6): 587-590.

107Kambasyashi, H.; Yamashita, M.; Odake, Y.; Takada, K.; Funaka, Y.; Ichihashi, M.: *Epidermal changes caused by chronic low-dose UV irradiation induce wrinkle formation in hairless mouse*. J Dermatol Sci 2001; 27, 1: S19-S25.

108Kang, Y.; Massagué, J.: *Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis*. Cell 2004; 118(3): 277-279.

109Kappes, U. P.; Elsner, P.: *Clinical and photographic scoring of skin aging*. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 2003; 16 (2):

1000-1007.

110Kappes, U. P.; Luo, D.; Potter, M.; Schulmeister, K.; Runger, T. M.: *Short-and long-wave UV light (UVB and UVA) induce similar mutations in human skin cells.* J Invest Dermatol 2006; 126(3): 667-675.

111Kawada, A.: *Protection and Therapy of Photoaging.* Anti-aging medicine 2011; 8(6): 88-91.

112Kim, T. H.; Ananthaswamy, H. N.; Kripke, M. L. et al.: *Advantages of using hairless mice versus haired mice to test sunscreen efficacy against photoimmune suppressions.* Photochem Photobiol 2003; 78(1): 37-42.

113Kim, S. Y.; Kim, S. J.; Lee, J. Y.; Kim, W. G.; Park, W. S.; Sim, Y. C.; Lee, S. J.: *Protective effects of dietary soy isoflavones against UV-induced skin-aging in hairless mouse model.* J Am Coll Nutr 2004; 23(2): 157-162.

114Kimoto-Nira, H.; Suzuki, C.; Kobayashi, M.; Sasaki, K.; Kurisaki, J. I.; Mizumachi, K.: *Anti-ageing effect of a lactococcal strain: analysis using senescence-accelerated mice.* Brit J Nutr 2007; 98(6): 1178-1186.

115Kligman, L. H.: *"Intensification of Ultraviolet-induced Dermal Damage by Infrared Radiation".* Arch. Dermatol. Res 1982; 272: 229-238.

116Kligman, L. H.; Akin, F. J.; Kligman, A. M.: *Prevention of ultraviolet damage to the dermis of hairless mice by sunscreens.* J Invest Dermatol 1982; 78: 181–189.

- 117** Kligman, L. H.; Akin, F. J.; Kligman, A. M.: *The contributions of UVA and UVB to connective tissue damage in hairless mice.* J Invest Dermatol 1985; 84: 272–276.
- 118** Kligman, L. H.; Kaidbey, K. H.; Hitchens, V. M.; Miller, S. A.: *Long wavelength (> 340 nm) UVA-induced damage in hairless mice is dose dependent. Human exposure to ultraviolet radiation: Risks and regulations.* Amsterdam: Elsevier Applied Science Publishers 1987; 77-78.
- 119** Kligman, L. H.: *"Aging and the skin".* Raven Press, New York 1989; 331-346.
- 120** Kligman, L. H.: *"Photoaging. Manifestations, prevention, and treatment."* Clinics in geriatric medicine 5.1. 1989; 235.
- 121** Kligman L. H.: *The ultraviolet-irradiated hairless mouse: a model for photoaging.* J Am Acad Dermatol 1989; 21(3,2): 623-631.
- 122** Kligman, L. H.; Gebre, M.; Alper, R.; Kefalides, N.A.: *Collagen metabolism in ultraviolet irradiated hairless mouse skin and its correlation to histologic observations.* J Invest Dermatol 1989; 93: 210–214.
- 123** Kligman, L. H.: *The hairless mouse and photoaging.* Photochem Photobiol 1991; 54.
- 124** Kligman, L. H.; Gebre, M.: *Biochemical changes in hairless mouse skin collagen after chronic exposure to UVA radiation.* Photochem Photobiol 1991; 54: 233–237.

- 125Kligman, L. H.; Sayre, R. M.:** *An action spectrum for ultraviolet induced elastosis in hairless mice: quantification of elastosis by image analysis.* Photochem Photobiol 1991; 53: 237–242.
- 126Kligman, L. H.:** *UVA-induced biochemical changes in hairless mouse skin collagen: a contrast to UVB effects.* In: Urbach F (ed.). Biologic Responses to UVA Radiation. Valdenmar Publishing Co., Overland Park, KS 1992; 209–215.
- 127Koch, C. M.; Suschek, C. V.; Lin, Q.; Bork, S.; Goergens, M.; Jousen, S.; Wagner, W.:** *Specific age-associated DNA methylation changes in human dermal fibroblasts.* Plus One 2011; 6(2), e16679
- 128Kolappaswamy, K.; Williams, K. A.; Benazzi, C.; Sarli, G.; McLeod Jr, C. G.; Vucenik, I.; DeTolla, L. J.:** *Effect of inositol hexaphosphate on the development of UVB-induced skin tumors in SKH1 hairless mice.* Comp Med 2009; 59(2): 147.
- 129Kraemer, K. H.:** *Sunlight and skin cancer: another link revealed.* Prc Natl Acad Sci USA 1997; 94(1): 11-14.
- 130Kreuzmann, J.J.; Buchker, E.V.:** *A range-finding method for approximating sunscreen efficacy and substantivity using guinea pig.* J Soc Cosmet Chem 1990; (41): 275-81.
- 131Kumakiri, M.; Hashimoto, K.; Willis, I.:** *Biologic changes due to longwave ultraviolet irradiation on human skin: ultrastructural study.* J Invest Dermatol 1977; 69: 392–400.
- 132Kurita, K.; Burgess, S.M.; Sakai, N.:** *Transgenic zebrafish produced by retroviral infection of in vitro-cultured sperm.*

Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101(5): 1263-1267.

133Kurki, P.; Ogata, K; Tan, E.M.: *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/Cyclin in activated human T Lymphocytes.* J. Immunol 1987; 138: 4114-4120.

134Laga, A. C.; Murphy, G. F.: *The translational basis of human cutaneous photoaging: on models, methods, and meaning.* Am J Pathol 2009; 174(2): 357-360.

135Landrigan, P. J.; Espina, C.; Neira, M.: *Global prevention of environmental and occupational cancer.* Environmen Health Perspect 2011; 119(7): 280.

136Lavker, R. M.; Veres, D. A.; Irwin, C. J.; Kaidbey, K. H.: *Quantitative assessment of cumulative damage from repetitive exposures to suberythemogenic doses of UVA in human skin.* Photochem Photobiol 1995; 62: 348-52.

137Lemmel, J.: *Prevención y tratamiento cosmético del envejecimiento cutáneo.* En: Offarm Farmacia y Sociedad 2003; 22(10): 75-82.

138Lopes, L. B.; VanDeWall, H.; Li, H. T.; Venugopal, V.; Li, H. K.; Naydin, S.; Hass, M. A.: *Topical delivery of lycopene using microemulsions: enhanced skin penetration and tissue antioxidant activity.* J Pharm Sci 2010; 99(3): 1346-1357.

139Loudin, A. B.; Kevin, D. D.: *A comparison of sun protective factor (SPF) determinations in guinea pigs and human utilizing artificial light.* Cutan Ocul Toxicol 1985; 4(2): 135-140.

140Llagostera Cuenca, E.: La seda china y la Ruta de la Seda. 2006. Cervantesvirtual.com

141McDaniel, D. H.; Neudecker, B. A.; DiNardo, J. C.; Lewis, J. A.; Maibach, H. I.: *Idebenone: a new antioxidant–Part I. Relative assessment of oxidative stress protection capacity compared to commonly known antioxidants*. J Cosmet Dermatol 2005; 4(1): 10-17.

142Maddin, S.; Lauharanta, J.; Agache, P.; Burrows, L.; Zultak, M.; Bulger, L.: *Isotretinoin improves the appearance of photodamaged skin: Results of a 36-week, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial*. J Am Acad Dermatol 2000; 42:56-63.

143Martínez, A.: *Aceites esenciales*. J Nat Prod. 1996; 59(1): 77-79.

144Martínez, A.; Escalante, X.: *La piel*. Ed. Juliana Constructora Gijonesa 1999; 302.

145Matsumura, Y.; Ananthaswamy, H. N.: *Molecular mechanisms of photocarcinogenesis*. Front Biosci 2002; 7: 765-783.

146Matsumura, Y.; Ananthaswamy, H. N.: *Short-term and long-term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine*. Expert Rev Mol Med 2002; 1-22.

147McCormick, D.; Hall, P.A.: *The complexities of proliferating cell nuclear antigen*. Histopathology 1992; 21: 591-594.

- 148Mestas, J.; Hughes, C. C.:** *Of mice and not men: differences between mouse and human immunology.* J Immunol 2004; 172(5): 2731-2738.
- 149Mitani, H.; Naru, E.; Yamashita, M.; Aranake, K.; Suzuki, T.; Imanari, T.:** *Ergocalciferol promotes in vivo differentiation of keratinocytes and reduces photodamage caused y ultraviolet irradiation in hairless mice.* Photodermal Photoimmunol Photomed 2004; 20: 215-223.
- 150Mittal, A.; Elmets, C. A.; Katiyar, S. K.:** *Dietary feeding of proanthocyanidins from grape seeds prevents photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice: relationship to decreased fat and lipid peroxidation.* Carcinogenesis 2003; 24(8): 1379-1388.
- 151Miyachi, K.; Fritzler, M. J.; Tan, E. M.:** *Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells.* The Journal of Immunology 1978; 121(6): 2228-2234.
- 152Moloney, S. J.; Edmonds, S. H.; Giddens, L. D.; Learn, D. B.:** *The hairless mouse model of photoaging: evaluation of the relationship between dermal elastin, collagen, skin thickness and wrinkles.* Photochem Photobiol 1992; 56(4): 505-511.
- 153Montero, J.:** *Radiación Solar y Fotoprotección.* Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, editor. Dermofarmacia 2004.
- 154Montero, J.:** *Radiación Solar y Fotoprotección.* Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, editor. Atención Farmacéutica en Dermofarmacia 2008.

- 155**Montironi, R.; Galluzi, C.M.; Diamantini, L.; Giannulis, I.; Pisani, E.; Scarpelli, M.: *Prostatic intra-epithelial neoplasm. Expression and location of proliferating cell nuclear antigen in epithelial, endothelial and stromal nuclei.* Virchows Archiv. A. Pathol. Anat 1993; 422: 185-192.
- 156**Mudgil, A. V.; Segal, N.; Andriani, F. et al.: *Ultraviolet B irradiation induces expansion of intraepithelial tumor cells in a tissue model of early cancer progression.* J Invest Dermatol 2003;121(1): 191-197
- 157**Muggil, A.V.; Segal, N.; Andriani, F. et al.: *Ultraviolet B irradiation induces expansion of intraepithelial tumor cells in a tissue model of early cancer progression.* J Invest Dermatol 2003; 121: 191-197.
- 158**Mulero, M.: *Efecto de la radiación ultravioleta (RUV) sobre los procesos de estrés oxidativo e inmunodepresión cutánea. Efecto protector.* Tesis doctoral. Universitat Rovira i Virgili, 2005.
- 159**Muller I.: *Sun and Men: An Ambivalent Relationship.* In Alt-meyer P. Hioffmann K. Stücker M. (edts): Skin Cancer and UV Radiation. In Springer. Verlag. Berlin – Hidelberg 1997; 3-12.
- 160**Muto, J.; Kuroda, K.; Wachi, H.; Hirose, S.; Tajima, S.: *Accumulation of elafin in actinic elastosis of sun-damaged skin: elafin binds to elastin and prevents elastolytic degradation.* J Invest Dermatol 2007; 127(6): 1358-1366. Epub 2006 Nov 30.
- 161**Nakamura, K.; Johnson, W. C.: *Ultraviolet Light Induced*

Connective Tissue Changes in Rat Skin: A Histopathologic and Histochemical Study. J Invest Dermatol 1968; 51(4): 253-258.

162Nathan, C.: *Neutrophils and immunity: challenges and opportunities.* Nat Rev Immunol 2006; 6(3): 173-182.

163Nishigori, C.; Hattori, Y.; Toyokuni, S.: *Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis.* Antioxid Redox Signal 2004; 6: 561-570.

164Norris, P.; Poston, R. N.; Thomas, D. S.; Thornhill, M.; Hawk, J.; Haskard, D. O.: *The expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in experimental cutaneous inflammation: a comparison of ultraviolet B erythema and delayed hypersensitivity.* J Invest Dermatol 1991; 96(5): 763-770.

165Oppel, T.; Karting, H.C.: *Actinic Keratosis: the key event in the evolution from photoaged skin to squamous cell carcinoma.* Therapy base don pathogenetic and clinical aspects. Skin Pharmacol Physiol 2004; 17(2): 67-76.

166Pacheco-Palencia, L. A.; Noratto, G.; Hingorani, L.; Talcott, S. T.; Mertens-Talcott, S. U.: *Protective effects of standardized pomegranate (Punica granatum L.) polyphenolic extract in ultraviolet-irradiated human skin fibroblasts.* J. Agric. Food Che. 2008; 56(18): 8434-8441.

167Paeon, H., Asselineau, D.: *An in vitro approach to the chronological aging of skin by glycation of the collagen: the biological effect of glycation on the reconstructed skin model.* Ann N Y Acad Sci 2005; 1043: 529-532.

- 168Pentland, A. P.; Schoggins, J. W.; Scott, G. A.; Khan, K. N. M.; Han, R.:** *Reduction of UV-induced skin tumors in hairless mice by selective COX-2 inhibition.* Carcinogenesis 1999; 20(10): 1939-1944.
- 169Petersen, B.; Wulf, H. C.** *Application of sunscreen– theory and reality.* Photodermatol Photoimmunol Photomed 2014; 30(2-3): 96-101.
- 170Pongcharoen, S.; Warnnissorn, P.; Lertkajornsin, O.; Limpeanchob, N.; Sutheerawattananonda, M.:** *Protective effect of silk lutein on ultraviolet B-irradiated human keratinocytes.* Biol Res 2013; 46(1): 39-45.
- 171Pons Gimier, L.:** *Cosmética Antienvjecimiento.* In: Dermatología. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. 2004.
- 172Pons Gimier, L.:** *Cosmética Antienvjecimiento.* In: Atención Farmacéutica en Dermatología. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. 2008.
- 173Pons Gimier, L.; Parra Juez, J. L.:** *La piel y sus anejos como sustrato vivo de la Cosmetología.* In: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. 2004.
- 174Pons Gimier, L.; Parra Juez, J. L.:** *Ciencia Cosmética. Bases fisiológicas y criterios prácticos.* 1995 ed. Madrid 2004; 36.
- 175Poswar, F. O.; Fraga, C. A.; Farias, L. C.; Feltenberger, J. D.; Cruz, V. P.; Santos, S. H.; Guimarães, A. L.:** *Immunohistochemical analysis of TIMP-3 and MMP-9 in actinic keratosis,*

squamous cell carcinoma of the skin, and basal cell carcinoma. Pathol Res Pract 2013; 209(11): 705-709.

176Poulsen, J. T.; Staberg, B.; Wulf, H. C.; Brodthagen, H.: *Dermal elastosis in hairless mice after UV-B and UV-A applied simultaneously, separately or sequentially*. Brit J Dermatol 1984; 110(5): 531-538.

177Prieto, L.: *Romper el proceso del envejecimiento cutáneo: activos dermocosméticos*. Med Cutan Iber Lat Am 2010; 38(2): 95-100.

178Quevedo Gualteros, D. M.: *Factores comportamentales hacia la fotoprotección*. Universidad del Rosario. Trabajo de Grado. 2010.

179Raab, W.: *History of Therapeutic UV Radiation*. En Altmeyer P. Hioffmann K. Stücker M. (edts): Skin Cancer and UV Radiation. Springer. Verlag. Berlin – Hidelberg 1997; 13-19.

180Ramos, G. I. C.; Pérez, D. A.: *Antioxidantes en dermatología* Dermatología CMQ 2010; 8 (4): 272-277.

181Ratushny, V.; Gober, M.D.; Hick, R. et al.: *From keratinocyte to cancer: the pathogenesis and modelling of cutaneous squamous cell carcinoma*. J Clin Invest 2012; 122(2): 464-472.

182Reddy, R. M.: *Review Article: Value Addition Span of Silk-worm Cocoon-Time for Utility Optimization*. International Journal of Industrial Entomology 2008; 17(1): 109-113.

- 183Reelfs, O.; Tyrrell, R. M.; Pourzand, C.:** *Ultraviolet a radiation-induced immediate iron release is a key modulator of the activation of NF- κ B in human skin fibroblasts.* J Invest Dermatol 2004; 122(6), 1440-1447.
- 184Reeve, V. E.; Wdyarini, S.; Domanski, D.; Chew, E.; Barnes, K.:** *Protection against photoaging in the hairless mouse by the isoflavone equol.* Photochem Photobiol 2005; 81 (6): 1548-1553.
- 185Región de Murcia Digital [internet].** Available from: http://www.regmurcia.com/servlet/s.SI?sit=c,365,m,2067&r=ReP-12038-DETALLE_REPORTAJESPADRE.
- 186Resinas, M. O.; Martín Gutiérrez, F. J.; Camacho, F.:** *Medidas de la radiación solar ultravioleta en Sevilla.* Actas Dermo-Sifiliográficas 2001; 92(6): 271-275.
- 187Restrepo Bejarano, L. G.; Villegas García, O. L.:** *Plan de mercadeo para la introducción en el mercado dermocosmético colombiano de una línea antiedad.* Universidad Icesi. 2010.
- 188Reyes, E.; Vitale, M. A.:** *Avances en fotoprotección. Mecanismos moleculares implicados.* Piel 2013; 28(04): 235-247.
- 189Rijken, F.; Bruijnzeel, P. L.; van Weelden, H.; Kiekens, R. C.:** *Responses of black and white skin to solar-simulating radiation: differences in DNA photodamage, infiltrating neutrophils, proteolytic enzymes induced, keratinocyte activation, and IL-10 expression.* J Invest Dermatol 2004; 122(6): 1448-1455.

- 190Rijken, F.; Kiekens, R.C.; Bruijnzeel, P.L.:** *Skin-infiltrating neutrophils following exposure to solar-simulated radiation could play an important role in photoageing of human skin.* Brit J Dermatol 2005; 152(2): 321-328.
- 191Rijken, F.; Bruijnzeel, P.L.:** *The pathogenesis of photoaging: the role of neutrophils and neutrophil-derived enzymes.* In J Invest Dermatol Symp Proc 2009; 14 (1): 67-72.
- 192Rodríguez, G.:** *Estructura y funciones de la piel.* En: Manual de Dermatología Básica y Descriptiva. Castro N., Chalela, J.G.; Pérez, M.; Rodríguez, G. Essex Farmacéutica 1995; 17-36.
- 193Rohde, R:** *Imagen espectro radiación solar.* 2007; In: "Luz solar." Wikipedia, La enciclopedia libre. 20 feb 2014, 05:23 UTC. 6 mar 2014, http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Luz_solar&oldid=72692648>.
- 194Samanek, A. J.; Croager, E. J.; Gies, P.; Milne, E.; Prince, R.; McMichael, A. J.; Slevin, T.:** *Estimates of beneficial and harmful sun exposure times during the year for major Australian population centres.* Med J Aust 2006; 184(7): 338.
- 195Sams, W. M.; Smith, J. G.; Burk, P. G.:** *The Experimental Production of Elastosis with Ultraviolet Light.* J Invest Dermatol 1964; 43(6): 467-471.
- 196Samuel, M.; Brooke R. C. C.; Hollis, S.; Griffiths, C. E. M.:** *Intervenciones para la piel fotodañada.* Reproducción de una revisión Cochrane, traducida y publicada en La Biblioteca Cochrane Plus. 2005; 4.

- 197Sánchez-Saldaña, L.; Lanchipa, P.; Pancorbo, J.; Regis, A.;
Sánchez, E.: *Fotoprotectores tópicos*. Rev Per Dermatol
2002; 12(2).
- 198Scharffetter-Kochanek, K.; Brenneisen, P.; Wenk, J.; Her-
rmann, G.; Ma, W.; Kuhr, L.; Wlaschek, M.: *Photoaging of
the skin from phenotype to mechanisms*. Exp Geronto. 2000;
35(3): 307-316.
- 199Schwartz, E.: *Connective tissue alterations in the skin of ul-
traviolet irradiated hairless mice*. J Invest Dermatol 1988;
91(2): 158-161.
- 200Schwartz, E.; Cruickshank, F. A.; Perlish, J. S.; Fleischma-
jer, R.: *Alterations in dermal collagen in ultraviolet irradiated
hairless mice*. J Invest Dermatol 1989; 93(1): 142-146.
- 201Schwartz, E.; Kligman, L. H.: *Topical tretinoin increases the
tropoelastin and fibronectin content of photoaged hairless
mouse skin*. J Invest Dermatol 1995; 104(4): 518-522.
- 202Scherschun, L.; Lim, H. W.: *Photoprotection by Sunscreens*.
Am J Clin Dermatol. 2001; 2: 131-134.
- 203Schulze, R.: *Einige Versuche und Bemerkungen zum Problem
der handelsüblichen Lichtschutzmittel*. Parfüm und Kosmet
1956; 37: 310-65.
- 204Shapiro, M.; Rook, A. H.; Lehrer, M. S.; Junkins-Hopkins,
J. M.; French, L. E.; Vittorio, C. C.: *Novel multimodality bio-
logic response modifier therapy, including bexarotene and
long-wave ultraviolet A for a patient with refractory stage IVa*

cutaneous T-cell lymphoma. J Am Acad Dermatol 2002; 47(6): 956-961.

205 Sharma, M. R.; Werth, V. P.: *Animal models of accurate photodamage: comparisons of anatomic, cellular and molecular responses in C57BL/6J, SKH1 and Balb/c mice*. Photochem Photobiol 2011; 87(3): 690-698.

206 Serna, J.; Vitales, M.; López, M. C.; Molina, A.: *Dermatología*. Farmacia Hospitalaria 2007; 841-875.

207 Setlow, R. B.: *The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis*. Proc Natl Acad Sci USA 1974; 71(9): 3363-3366.

208 Sheikh, S.; Asghar, S.; Ahmad, S.: *Development of HPTLC Qualitative Finger Printing Profile of Almond Oil in Marketed Herbal Cream*. International Journal of Research in Pharmacy & Science 2013; 3(1).

209 Shibata, A.; Nakagawa, K.; Kawakami, Y.; Tsuzuki, T.; Miyazawa, T.: *Suppression of γ -tocotrienol on UVB induced inflammation in HaCaT keratinocytes and HR-1 hairless mice via inflammatory mediators multiple signaling*. J Agric Food Chem 2010; 58(11): 7013-7020.

210 Siegel, R.; Naishadham, D.; Jemal, A.: *Cancer statistics, 2012*. CA: a cancer journal for clinicians 2012; 62(1): 10-29.

211 Sies, H.: *Antioxidant Function of Vitamins*. Ann NY Acad Sci 1992; 669:7-20

- 212Singh, T.; Chaudhary, S. C.; Kapur, P. et al.: *Nitric oxide donor exisulind is a effective inhibitor of murine photocarcinogenesis (dagger)*. Photochem Photobiol 2012; 88(5): 1141-1148.
- 213Sjerobabski Masnec, I.; Poduje, S.: *Photoaging*. Coll Antropol 2008; 32 (2):177-180.
- 214Smetana, K.; Gyorkey, F.; Chan, P. K.; Tan, E.; Busch, H.: *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and human malignant tumor nucleolar antigens (HMTNA) in nucleoli of human hematological malignancies*. Blut 1983; 46(3): 133-141.
- 215Sobajo C.; Behzad F.; Xue-Feng, Y.; Bayat, A.: *Silk: A Potential Medium for Tissue Engineering*. Eplasty. 2008; 8: e47.
- 216Sorg, O.; Antille, C.; Kaya, G.; Saurat, J.M.: *Retinoids in cosmetics*. Dermatol Ther 2006; 19 (5): 289-296.
- 217Suji, G.; Sivakami, S.: *Glucose, glycation and aging*. Biogerontolog. 2004; 5: 365-373.
- 218Sultana, Y.; Kohli, K.; Athar, M.; Khar, R. K.; Aqil, M.: *Effect of pre-treatment of almond oil on ultraviolet B–induced cutaneous photoaging in mice*. J Cosmet Dermatol 2007; 6(1): 14-19.
- 219Sundberg, J. P., King, L. E.: *Morphology of hair in normal and mutant laboratory mice*. EJD, 2001; 11(4): 357-361.
- 220Snyder, D. S.; May, M.: *Ability of PABA to protect mammalian skin from ultraviolet light-induced skin tumors and actinic*

damage. J Invest Dermatol 1975; 65(6): 543-546.

221 Suschek, C. V.; Schewe, T.; Sies, H.; Kröncke, K. D.: *Nitrite, a naturally occurring precursor of nitric oxide that acts like a 'prodrug'*. Biological chemistry 2006; 387(5), 499-506.

222 Suschek, C. V.; Opländer, C.; van Faassen, E. E.: *Non-enzymatic NO production in human skin: Effect of UVA on cutaneous NO stores*. Nitric Oxide. 2010; 22(2), 120-135.

223 Svobodova, A.; Walterova, D.; Vostalova, J.: *Ultraviolet light induced alteration to the skin*. BIOMEDICAL PAPERS-PALACKY UNIVERSITY IN OLOMOUC. 2006; 150(1), 25.

224 Takema, Y.; Hattori, M.; Aizawa, K.: *The relationship between quantitative changes in collagen and formation of wrinkles on hairless mouse skin after chronic UV irradiation*. J Dermatol Sci. 1996; 12(1), 56-63.

225 Takasaki, Y.; Deng, J. s.; Tan, E. M.: *A nuclear antigen associated with proliferation and blast transformación. Its distribution in synchronized cells*. J. Exp. Med. 1981; 154: 1899-1909.

226 Thomas, D. R. Sun Protection Using Sunscreens. skintherapyletter.com 2013

227 Tokura, Y.; Yagi, H.; Ihda, H. et al.: *Evaluation of ultraviolet-A protection by sunscreen agents using a mouse model of contact photoallergy*. J Dermatol Sci. 1994; 7(1): 39-44.

228 Tolleson, W. H.; Cherng, S. H.; Xia, Q.; Boudreau, M.; Yin,

J. J.; Wamer, W. G.; Howard, P. C.; Yu, H.; Fu, P. P.: *Photodecomposition and phototoxicity of natural retinoids*. Int J Environ Res Public Health. 2005 Apr; 2(1): 147-55

229Torras, H.: *¿El bronceado con radiación ultravioleta A es realmente perjudicial para la piel?* Piel. 2004; 19 (7), 345-346.

230Torras, H.; Lecha, M.; Mascaró, J. M.: *PUVA terapia: efectos degenerativos a largo plazo. I. Alteraciones histológicas observadas después de la PUVA terapia*. Med Cutan Iber Lat Am. 1997; 15, 63-70.

231Toschi, L.; Bravo, R.: *Changes in Cyclin/proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis*. J. Cell Biol. 1988; 107: 1623-1628.

232Toyoda, M.; Morohashi, M.: *Morphological alterations of epidermal melanocytes in photoageing: an ultrastructural and cytomorphometric study*. Br J. Dermatol. 1998; 139 (3): 444-452.

233Tsuji, T.; Shrestha, P.; Yamada, K.; Takagi, H.; Shinozaki, F.; Sasaki, K.; Maeda, K.; Mori, M.: *Proliferating cell nuclear antigen in malignant and pre-malignant lesions of epithelial origin in the oral cavity and the skin. An immunohistochemical study*. Virchows Archiv. A Pathol Anat. 1992; 420: 377-383.

234Tupiza, P. F.: *Aprovechamiento de las proteínas de la seda Bombyx mori en la preparación de cosméticos y soportes para el crecimiento de tejidos*. 2010; Facultad de Ingeniería en Biotecnología. ESPE. Sede Sangolquí.

- 235Uitto, J.; Brown, D. B.; Gasparro, F. P.; Bernstein, E. F.:** *Molecular aspects of photoaging.* Eur J Dermatol. 1997; 7(3), 210-214.
- 236Urbach, F.** *Ultraviolet A transmission by modern sunscreens: is there a real risk?* Photodermatol Photoimmunol Photomed. 1996. 9(6), 237-241.
- 237Uribarri, J.; Cai, W.; Peppas, M. et al.:** *Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation end products: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2007; 62: 427-33
- 238Vicente Ortega, V.:** *El peligroso encanto de la belleza (Una aproximación a la patología de la pigmentación cutánea).* Discurso de recepción pública como académico de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Murcia. 4 de noviembre de 1999. Editorial Nogué.
- 239Vostálová, J.; Zdarilová, A.; Svobodová, A.:** *Prunella vulgaris extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT Keratinocytes.* Arch Dermatol Res 2010; 302: 171-181.
- 240Wang, Z. Y.; Agarwal, R.; Bickers, D. R.; Mukhtar, H.:** *Protection against ultraviolet B radiation-induced photocarcinogenesis in hairless mice by green tea polyphenols.* Carcinogenesis 1991; 12(8): 1527-1530.
- 241Wang, C.; Yao, R.; Liu, Z. Zhong, W.; Liu, X.; Wang, Y.:** *Protective effect of polypeptide from Chlamys farreri o hairless mice damaged by ultraviolet A.* Acta Pharmacol Sin 2002; 23

(9): 813-818.

242Wang, S.Q.; Setlow, R.; Berwick, M.; Polsky, D.; Marghoob, A. A.; Kopf, A. W.; Bart, R. S.: *Ultraviolet A and melanoma: A review.* J Am Acad Dermatol 2001; 44: 837-846.

243Whitmore, S.E.; Morison, W.L.; Potten, C. S.; Chadwick, C.: *Tanning salon exposure and molecular alterations.* J Am Acad Dermatol 2001; 44: 775-780.

244Wilgus, T. A.; Koki, A. T.; Zweifel, B. S.; Kusewitt, D. F.; Rubal, P. A.; Oberyshyn, T. M.: *Inhibition of cutaneous ultraviolet light B-mediated inflammation and tumor formation with topical celecoxib treatment.* Mol Carcinog 2003; 38(2): 49-58.

245Winkelmann, R. K.; Baldes, E. J.; Zollman, P. E.: *Squamous Cell Tumors Induced in Hairless Mice with Ultraviolet Light.* J Invest Dermatol 1960; 34(2): 131-138.

246Wlaschek, M.; Tantcheva-Poor, I.; Naderi, L.; Ma, W.; Schneider, L. A.; Razi-Wolf, Z.; Schuller, J.; Scharffetter-Kochanek, K.: *Solar UV irradiation and dermal photoaging.* J Photochem Photobiol B 2001; 63: 41-51.

247Wondrak, G. T.; Jacobson, M. K.; Jacobson, E. L.: *Antimelanoma activity of apoptogenic carbonyl scavengers.* J Pharmacol Exp Ther 2006; 316(2): 805-814.

248Yaar, M.; Gilchrist, B. A.: *Photoageing: mechanism, prevention and therapy.* Br J Dermatol 2007; 157(5): 874-887.

- 249Young, A. R.: *Chromophores in human skin*. Phys Med Bio 1997; 42(5): 789.
- 250Young, A. R.; Chadwick, C. A.; Harrison, G. I.; Nikaido, O.; Ramsden, J.; Potten, C. S.: *The similarity of action spectra for thymine dimers in human epidermis and erythema suggests that DNA is the chromophore for erythema*. J Invest Dermatol 1998; 111(6): 982-988.
- 251Zaidi, M.R.; Day C.P.; Merlino, G.: *From UVs to metastases: modelling melanoma initiation and progression in the mouse*. J Invest Dermatol 2008; 128 (10): 2381-91.
- 252Zanatta, C. F.; Mitjans, M.; Urgatondo, V.; Rocha-Filho, P. A.; Vinardell, M. P.: *Photoprotective potential of emulsions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) against UV irradiation on keratinocytes and fibroblasts cell lines*. Food Chem Toxicol 2010; 48(1): 70-75.
- 253Zhaorigetu, S.; Yanaka, N.; Sasaki, M.; Watanabe, H.; Kato, N.: *Silk protein, sericin, suppresses DMBA-TPA-induced mouse skin tumorigenesis by reducing oxidative stress, inflammatory responses and endogenous tumor promoter TNF- α* . Oncol Rep 2003; 10(3), 537-543.
- 254Zheng, P.; Kligman, L. H.: *UVA-induced ultrastructural changes in hairless mouse skin: a comparison to UVB-induced damage*. J Invest Dermatol 1993; 100(2): 194-199.