



UNIVERSIDAD DE MURCIA

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

Modelo Experimental de
Fotoenvejecimiento: Efectos de Polifenoles

D. Antonio Cano Gómez

2014



**Instituto
Universitario
Investigación
Envejecimiento**

*Instituto Universitario de Investigación
en Envejecimiento*

**Modelo Experimental de
Fotoenvejecimiento: Efectos de
Polifenoles**

D. Antonio Cano Gómez

2014



D. Francisco José García Gómez , Doctor de Universidad del Área de Anatomía Patológica en el Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Modelo experimental de fotoenvejecimiento: efectos de polifenoles", realizada por D. Antonio Cano Gómez, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 2 de junio de 2014



D^a. PALOMA SÁNCHEZ-PEDREÑO GUILLÉN, PROFESORA TITULAR DE DERMATOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGÍA, ESTOMATOLOGÍA, RADIOLOGÍA Y MEDICINA FÍSICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: “**Modelo experimental de fotoenvejecimiento: Efectos de polifenoles**”, realizada por D. ANTONIO CANO GÓMEZ bajo mi inmediata dirección y supervisión y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 3 de junio de 2014.

Fdo. Prof^a. Dr^a. D^a. Paloma Sánchez-Pedreño Guillén

Facultad de Medicina
Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física

Hospital General Universitario Morales Meseguer. 30008 Murcia.
T. 868 88 85 83 – F. 868 88 43 99 – www.um.es/defrmf/



D. Vicente Vicente Ortega, Catedrático de Universidad del Área de Anatomía Patológica en el Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Modelo experimental de fotoenvejecimiento: efectos de polifenoles", realizada por D. Antonio Cano Gómez, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 2 de junio de 2014

A mi compañera, Juana, mi gran amor

A mis hijas Elena y Mercedes

Agradecimientos

No puedo dar por acabado este trabajo sin agradecerse a todas aquellas personas que lo han hecho posible.

Especialmente a D. Vicente Vicente Ortega que tanto en lo académico como en lo personal ha ejercido de “maestro” y sin cuyo empeño y dedicación no me hubiera sido posible llegar hasta aquí.

A D^a Paloma Sánchez-Pedreño Guillén, por haberme atendido cada vez que la he requerido.

A D. Francisco José Gómez García, por haber puesto a mi disposición todo su conocimiento.

A mis compañeros del Servicio de Animales de Laboratorio, D. Enrique Bautista Muñoz, D^a Nuria Garcia Carrillo, D^a Carmen Lagares Martínez, D. Manuel Nortes Pérez, D^a Josefa Martínez Rabadán, D^a Yolanda Martínez Verdú, D^a Fermina Ros Romero y D. Francisco José Zapata Nicolás, sin cuya colaboración esta andadura no habría llegado a buen puerto.

Al personal del Instituto Universitario de Investigación en Envejecimiento, especialmente a D. Manuel José Saura Pujante y D. José Víctor Bolarín Lucas.

A D. Antonio Maurandi López, del Servicio de Cálculo Científico de la Universidad de Murcia, por su muy estimada colaboración.

Y por último, y no menos importante, a mi amigo D. José Rodríguez Martínez.

Índice

Índice

I.	Introducción.....	1
II.	Antecedentes.....	5
	Piel.....	5
	Radiación ultravioleta.	26
	Envejecimiento cutáneo. Fotocarcinogénesis.	37
	Modelos animales de fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis. .	59
	Fotoprotección. Antioxidantes y radicales libres.....	66
III.	Objetivos.....	91
IV.	Material y métodos	95
	Métodos	100
V.	Resultados.....	115
	Estudio macroscópico. Características clínico macroscópicas.....	115
	Estudio microscópico	127
	Estudio inmunohistoquímico.	183
VI.	Discusión	195
VII.	Resumen	233
VIII.	Conclusiones	239
IX.	Bibliografía	243

Introducción

I. Introducción

Desde la antigüedad, el ser humano ha sentido fascinación por los fenómenos de la naturaleza y, entre ellos, por el “astro rey”, el sol. Sus efectos sobre la salud, durante casi toda la existencia de la humanidad han mantenido la misma controversia que los poderes del dios que le representa. De modo que el color moreno de la piel constituía un signo de inferioridad social, a diferencia del blanco, propio de los que no tenían que trabajar al aire libre y sufrir el impacto de sus rayos.

Hasta que en el primer tercio del siglo XX cambia dicho concepto a partir de dos hitos: La concesión del Premio Nobel de Medicina en 1903 a Niels Finsen por su trabajo sobre los efectos beneficiosos del sol en diversas patologías y al nuevo concepto sobre las libertades individuales. Una de los exponentes, en este aspecto, fue Coco Chanel, icono de la moda y referente internacional de la industria del lujo y del feminismo, que en 1929 señaló: *“un color tostado de la piel es el índice de lo chic, de lo que debe llevarse”* (Qiu, 2013). El 5 de julio de 1946 nace el biquini y con él la piel morena, los cosméticos que la favorecen, los solarios, las cámaras de luz ultravioleta... y el aumento progresivo del cáncer.

A partir de ese momento la exposición a la radiación ultravioleta (RUV) se ha incrementado significativamente. Esto se debe a un aumento de la radiación UV solar, como consecuencia de la disminución del ozono estratosférico, pero sobre todo a las actividades de ocio al aire libre, y al aumento de la esperanza de vida en los países industrializados (Grether-Beck, 2005)

La Organización Mundial reconoce las RUV, (incluyendo las camas solares) entre los factores carcinógenos de tipo I. Además de ser responsables y de originar fotoenvejecimiento, definido como el daño superpuesto al envejecimiento intrínseco, caracterizado por un envejecimiento cutáneo más extenso, de presentación más precoz y, sobre todo, de mayor gravedad, ya que engloba la fotocarcinogénesis (Armstrong, 2012) .

De ahí que en la actualidad exista una mayor conciencia social y demanda de las medidas para prevenir y eludir los efectos de la radiación ultravioleta, tales como cremas fotoprotectoras, ventanas con cristales de mayor filtración de la radiación, ropas con alto factor de protección, nutricosméticos con betacarotenos y agentes antioxidantes.

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, como posibles agentes fotoprotectores, de los flavonoides, Apigenina, y los ácidos Carnósico y Rosmarínico, adicionados a la dieta de dichos ratones.

Antecedentes

II. Antecedentes.

Piel

La piel es el órgano más superficial, extenso y de mayor peso del organismo, de forma que, en una persona de alrededor de 170 cm de altura y 70 kg de peso mide casi 2 m² y pesa unos 10 kg, teniendo un grosor entre 1,5 a 4 milímetros, según las distintas zonas corporales (Avcı, 2013).

Estructura

En la piel se distinguen tres tipos de estructuras fundamentales:

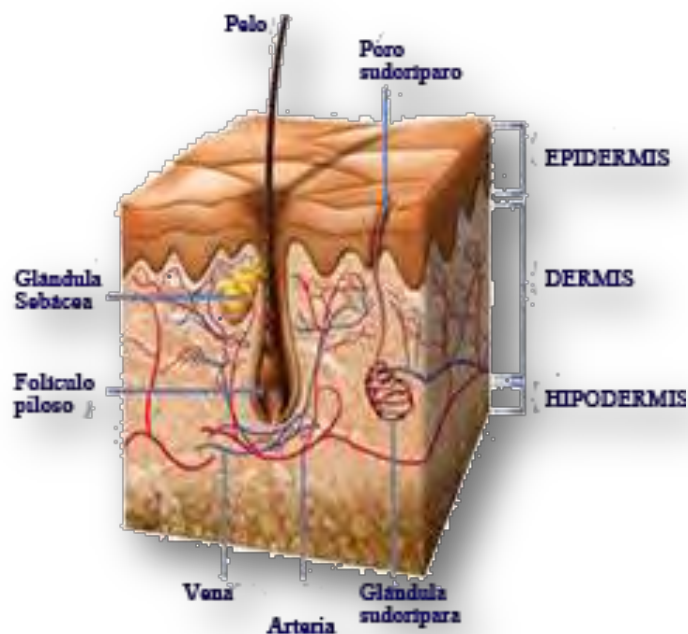


Fig. II-1. Estructura de la piel

la más superficial, denominada **epidermis**, de la que protruyen los folículos pilosos; una intermedia o **dermis**, constituida por tejido conjuntivo, vasos y células, así como la base de los folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas, etc., y la capa más profunda, o **tejido celular subcutáneo**, en la que predomina el tejido adiposo.

La epidermis: Es un epitelio escamoso estratificado queratinizado que se autorregenera. Esta capa es delgada (entre 0.4 y 1.5 mm) y en su parte superior presenta una lámina de queratina laxa. La superficie externa de la epidermis es bastante lisa y plana, pero la unión entre la epidermis y la gruesa dermis, está marcada por los pliegues descendentes de la epidermis (*crestas interpapilares*) que impiden su despegamiento por las fuerzas de cizallamiento.

Las células a partir de mitosis a nivel de la capa basal germinal, inmediatamente por encima de la dermis, sufren cambios madurativos relacionados con la producción de queratina. La capa externa queratinizada sufre una descamación continua y es sustituida gracias al movimiento y maduración progresivos de las células procedentes de la capa germinal; en humanos, el proceso de maduración desde la célula basal hasta el momento de la descamación suele durar de 25 a 50 días, siendo más rápido en las zonas expuestas a las fuerzas de fricción más

intensas. Intercaladas entre los **queratinocitos** se encuentran las células residentes e inmigrantes: **melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel.**

Las fases de este proceso dinámico se reflejan en cuatro estratos con morfología distinta:

● **Estrato o capa basal:** es la capa germinal de la epidermis. La actividad mitótica proporciona un suministro constante de nuevos queratinocitos que sustituyen a los perdidos por el desgaste y la descamación normales. El queratinocito es una célula derivada del ectodermo y es el principal tipo celular de la epidermis, constituyendo al menos el 80 % del total de células. La diferenciación del queratinocito consta de una serie de modificaciones morfológicas y eventos metabólicos, cuidadosamente programados, cuyo punto final es un queratinocito muerto (corneocito) que contiene filamentos de queratina, proteínas de la matriz y una membrana plasmática reforzada por proteínas con lípidos asociados a su superficie.

El estrato basal contiene queratinocitos mitóticamente activos, en forma de columna, que se adhieren mediante filamentos de queratina a la zona de la membrana basal a nivel de los hemidesmosomas, y a las células circundantes mediante desmosomas. Originan las células diferenciadas de las capas epidérmicas más

superficiales. El estudio ultraestructural revela la presencia de vacuolas unidas a la membrana, que contienen melanosomas transferidos desde los melanocitos por fagocitosis (Haass, 2005). El pigmento dentro de los melanosomas contribuye a la coloración general de la piel que se percibe macroscópicamente (Grimes, 2006). Los estudios de cinética celular sugieren que las células de las capas basales presentan diferentes potenciales proliferativos (células madre, células amplificadoras de tránsito, células posmitóticas), e investigaciones in vivo e in vitro apuntan a que existen células madre epidérmicas de larga vida (Blanpain, 2006).

La existencia de una población adicional de células progenitoras, dentro de la superficie de la capa basal epidérmica, está sostenida por numerosas investigaciones, tanto in vivo como in vitro. Estas supuestas células madre basales parecen ser clonogénicas, progresan rápidamente a través de la fase de síntesis del ciclo celular y se dividen infrecuentemente durante la autorrenovación estable. Además, estas células son capaces de dividirse en respuesta a agentes exógenos y endógenos. Los primeros experimentos con trazadores de linaje en la epidermis identificaron que los queratinocitos están organizados en columnas verticales de células progresivamente diferenciadas, que se denominan unidades proliferativas epidérmicas (Potten, 1981)

El segundo tipo de célula, las células amplificadoras de tránsito de la capa basal, surgen como un subgrupo de células hijas producidas por la división de las células madres. Estas células proporcionan el volumen de las divisiones celulares necesarias para la autorrenovación estable y son las células más frecuentes en el compartimiento basal. Después de pasar por varias divisiones celulares, estas células dan origen a la tercera clase de células basales epidérmicas, las células posmitóticas, que corresponden a la diferenciación terminal.

Aunque durante mucho tiempo se creyó que se desprendían de la lámina basal para migrar a una posición más superficial (suprabasal) de la epidermis, evidencias recientes sugieren que la división asimétrica de las células basales en relación con la membrana basal puede dar origen directamente a una célula hija suprabasal en vías de diferenciación (Lechler, 2005). En los humanos, el tiempo de tránsito normal de una célula basal, desde el momento en que pierde contacto con la capa basal hasta el momento en que ingresa en el estrato córneo, es al menos de 14 días. Estos periodos pueden alterarse en estados hiperproliferativos o de detención del crecimiento.

● **Estrato espinoso:** llamado así por el aspecto “espinoso” que le confieren los desmosomas de unión a las células cuando se observan microscópicamente, está formado por las células que se encuentran en

proceso de crecimiento y que inician la síntesis de queratina. Las células espinosas suprabasales son de forma poliédrica con un núcleo redondeado. A medida que se diferencian y se desplazan hacia arriba a través de la epidermis, se tornan más aplanadas y desarrollan orgánulos denominados gránulos laminares. Las células espinosas también contienen filamentos de queratina organizados alrededor del núcleo e insertados periféricamente a los desmosomas.

Las células espinosas retienen las queratinas estables K5/K14 que se producen en la capa basal, pero no sintetizan nuevo ARNm para estas proteínas, excepto en trastornos hiperproliferativos. Por el contrario, la nueva síntesis del par de queratinas K1/K10 se produce en esta capa epidérmica. Estas queratinas son características de un patrón de diferenciación epidérmica y por consiguiente se denominan queratinas específicas de la diferenciación o específicas de la queratinización. Sin embargo, este patrón normal de diferenciación se modifica hacia la vía alternativa en los estados hiperproliferativos.

Los desmosomas corresponden a modificaciones de la superficie celular dependientes del calcio que promueven la adhesión de las células epidérmicas y la resistencia al estrés mecánico (Yin, 2004). Dentro de cada célula hay una placa desmosómica que contiene los polipéptidos placoglobina, desmoplaquinas I y II, queratocalmina,

demoyoquina y placofilina. Las glucoproteínas transmembranas (desmogleínas 1 y 3, y desmocolinas I y II, miembros de la familia de las cadherinas) confieren las propiedades adhesivas de la porción extracelular de los desmosomas, denominada área central. Mientras que los dominios extracelulares de las cadherinas forman parte del área central, los dominios intracelulares se insertan dentro de la placa, uniéndolos al citoesqueleto de filamentos intermedios (queratina). Aunque los desmosomas están relacionados con las uniones adherentes, estas últimas se asocian con microfilamentos de actina en las interfases célula-célula, mediante un conjunto distinto de cadherinas y las moléculas adaptadoras de catenina intracelular (Kottke, 2006)

Los gránulos laminares también se forman en esta capa de células epidérmicas. Estos orgánulos secretorios liberan precursores de los lípidos del estrato córneo en el espacio intercelular. Los gránulos laminares contienen glucoproteínas, glucolípidos, fosfolípidos, esteroides libres y numerosas hidrolasas ácidas, incluyendo lipasas, proteasas, fosfatasas ácidas y glucosidasas. Las glucosilceramidas, precursoras de las ceramidas y componentes predominantes de los lípidos del estrato córneo también se encuentran en estas estructuras (Herman, 2000).

● **Estrato granuloso:** se caracteriza por gránulos de queratohialina intracelulares que contribuyen al proceso de queratinización. La capa

granulosa es el sitio de generación de numerosos componentes estructurales que forman la barrera epidérmica, así como también numerosas proteínas que procesan estos componentes (Segre, 2006). Los gránulos queratohialinos están compuestos principalmente por profilagrina, filamentos de queratina y loricrina. En esta capa comienza a formarse la envoltura de células queratinizadas. La liberación de profilagrina desde los gránulos queratohialinos produce la escisión dependiente de calcio de la proteína polimérica profilagrina en monómeros de filagrina. Estos monómeros de filagrina se agregan con la queratina para formar macrofilamentos. Eventualmente, la filagrina se degrada en moléculas, incluyendo ácidos urocánico y pirrolidocarboxílico, que contribuyen a la hidratación del estrato córneo y a filtrar la radiación UV. La loricrina es una proteína rica en cisteína que forma el componente proteico principal de la envoltura queratinizada constituyendo más del 70 % de su masa. Después de la liberación de los gránulos queratohialinos, la loricrina, junto con la involucrina, cistatina A, pequeñas proteínas ricas en prolina (SPR1, SPR2 y cornifina), elafina y envoplaquina se unen posteriormente mediante enlaces cruzados con la membrana plasmática por la acción de transglutaminasas tisulares (TGM, principalmente TGM 3 y 1) para formar la envoltura de células queratinizadas (Huber, 1995).

La etapa final de la diferenciación de las células granulosas incluye la destrucción programada de la misma célula. Durante este proceso, en el que la célula granulosa se transforma en un corneocito terminalmente diferenciado, un mecanismo apoptótico produce la destrucción del núcleo y de casi la totalidad del contenido celular, con excepción de los filamentos de queratina y la matriz filagrina.

● **Estrato córneo:** corresponde a las células aplanadas y fusionadas que han perdido el núcleo y en las que predomina la proteína fibrosa queratina. Esta capa proporciona a la piel la protección mecánica y constituye una barrera para la pérdida de agua y la penetración de sustancias solubles desde el ambiente (Segre, 2006). La barrera del estrato córneo está formada por un sistema de dos compartimientos de corneocitos enriquecidos en proteínas y depleccionados de lípidos, rodeados por una matriz lipídica extracelular continua. Estos dos compartimientos tienen funciones algo independientes aunque complementarias que constituyen en conjunto la “actividad barrera” de la epidermis. La regulación de la permeabilidad, descamación, actividad contra los péptidos microbianos, exclusión de toxinas y absorción química selectiva son todas funciones primarias de la matriz lipídica extracelular. Por otro lado, el refuerzo mecánico, la hidratación, la iniciación de la inflamación mediada por citocinas y la protección del

daño por exposición a radiación UV son todas funciones a cargo de los corneocitos.

Otras células epidérmicas.

Melanocitos: son células dendríticas derivadas de la cresta neural que sintetizan pigmentos, residen principalmente en la capa basal (Passeron, 2005). Mediante microscopía óptica estas células se reconocen por su citoplasma de tinción pálida, núcleo ovoide y coloración de los melanosomas que contienen el pigmento y que son los orgánulos distintivos de los melanocitos. Las interacciones queratinocito-melanocito, constituyen la denominada *unidad melano-epidérmica*, que forma un complejo funcional de gran variabilidad constituyendo una barrera continua frente a la radiaciones solares, pero que constituye un factor de riesgo para la aparición del cáncer cutáneo. Estas son críticas para la homeostasis y diferenciación del melanocito, e influyen en la proliferación, formación de dendritas y melanización. El número de melanocitos es el mismo en todas las razas, con una gran variación en su capacidad de sintetizar melanina y transportarla a los queratinocitos adyacentes (Vicente, 1999)

Células de Merkel: son mecanorreceptores tipo I de adaptación lenta que se localizan en los sitios de alta sensibilidad táctil (Halata, 2003). Están presentes entre los queratinocitos basales en regiones particulares del organismo, incluso la piel con pelo, la piel sin pelo de los dedos, labios, regiones de la cavidad oral y la vaina externa de la raíz del

folículo piloso. Como otras células no queratinocitos, las células de Merkel muestran un citoplasma con una tinción pálida. Los marcadores inmunohistoquímicos de las células de Merkel incluyen los péptidos de queratina K8, K18, K19 y K20. La queratina K20 está restringida a las células de Merkel de la piel y por lo tanto es el marcador más fiable. Ultraestructuralmente, se identifican con facilidad por los gránulos del núcleo denso, unidos a la membrana, que se agrupan opuestos al aparato de Golgi y proximales a un axón no mielinizado. Estos gránulos son similares a los gránulos neurosecretorios de las neuronas y contienen sustancias similares a neurotransmisores y marcadores de células neuroendocrinas, incluso metencefalina, péptido intestinal vasoactivo, enolasa, específica de las neuronas y sinaptofisina.

Células de Langerhans: son células dendríticas, presentadoras y procesadoras de antígenos, localizadas en la epidermis (Valladeau, 2005). Aunque no son exclusivas de la epidermis, constituyen entre el 2 y el 8 % de la población total de células de la epidermis. Se encuentran en su mayor parte en una posición suprabasal, aunque están distribuidas a lo largo y ancho de todas las capas: basal, espinosa y granulosa. Al microscopio, presentan una tinción pálida y tienen núcleos convolutos. El citoplasma de estas células contiene estructuras pequeñas con forma de bastones o raquetas denominados gránulos de

las células de Langerhans o gránulos de Birbeck. Su función principal es la de unir y presentar los antígenos a los linfocitos T de la epidermis. Sus funciones se deterioran por la exposición a la RUV, sobre todo RUV-B.

Unión Dermoepidérmica.

La unión dermoepidérmica (UDE) es una zona de la membrana basal que forma la interfase entre la epidermis y la dermis. La principal función de la UDE es unir la epidermis con la dermis y viceversa, para proporcionar resistencia contra las fuerzas externas que podrían desgarrarlas. Sirve como soporte de la epidermis, determina la polaridad del crecimiento, dirige la organización del citoesqueleto en las células basales, produce señales de desarrollo y cumple funciones de barrera semipermeable (Ghohestani, 2001; Uitto, 2005).

Dermis.

La dermis es un sistema integrado de elementos fibrosos, filamentosos, difusos y celulares del tejido conjuntivo, en el que se localizan las redes vasculares y nerviosas, los apéndices derivados de la epidermis y contiene distintos tipos de células residentes: fibroblastos, macrófagos, células cebadas o mastocitos y células circulantes transitorias del sistema inmunitario. La dermis es el constituyente mayor de la piel y le confiere flexibilidad, elasticidad y fuerza tensil. Protege al organismo del daño mecánico, fija agua, contribuye a la regulación térmica e incluye receptores de los estímulos sensoriales. La dermis interactúa con la epidermis para mantener las propiedades de ambos tejidos, colabora durante el desarrollo en la morfogénesis de la UDE y los apéndices epidérmicos, y contribuye a la reparación y remodelación de la piel después de sufrir heridas.

Está compuesta por dos regiones principales, la dermis papilar superior y la dermis reticular más profunda. Estas dos regiones son fácilmente identificables en una sección histológica, y difieren en la organización del tejido conjuntivo, densidad celular y patrones nerviosos y vasculares. La dermis papilar limita con la epidermis, se amolda a su contorno y tiene un espesor que no supera al doble de la epidermis.

La dermis reticular constituye la masa principal de la dermis, Está compuesta principalmente por fibrillas de colágeno de gran diámetro, organizadas en fascículos grandes de fibras entretrejidas, con fibras elásticas ramificadas que rodean a los fascículos. En los individuos normales, las fibras elásticas y los haces de colágeno aumentan de tamaño en forma progresiva hacia la hipodermis. El plexo subpapilar, un plano horizontal de vasos, marca los límites entre la dermis papilar y reticular. El límite inferior de la dermis reticular se define por la transición del tejido conjuntivo fibroso al tejido conjuntivo adiposo de la hipodermis.

La matriz del tejido conjuntivo de la dermis está compuesta principalmente por tejido colágeno y fibroso elástico (Burgeson, 1992). Estos tejidos se combinan con otro formado por moléculas de tejido conjuntivo no fibroso que incluyen algunas glucoproteínas filamentosas, los proteoglicanos y glucosaminoglicanos de la sustancia fundamental (Kielty, 1997).

En términos de sus componentes no celulares, el colágeno constituye la masa principal de la dermis; representa el 75 % del peso seco de la piel y le proporciona tanto la fuerza tensil como la elasticidad. Los colágenos intersticiales, con una banda periódica, constituyen la proporción más grande de colágeno en la dermis del adulto (tipo I, 80-

90 %; tipo III, 8-12 % y tipo V, < 5 %). Estos tipos de colágeno contribuyen a regular el diámetro de las fibrillas. Se localiza principalmente en la dermis papilar y en la matriz que rodea la membrana basal de los vasos y a nivel de la UDE. El colágeno tipo VI está asociado con las fibrillas y se encuentra en el espacio interfibrilar, El tipo IV está restringido a la lámina basal de la UDE, los vasos y los apéndices de la epidermis. Las fibras elásticas devuelven a la piel su forma normal después de haberse contraído o deformado (Christiano, 1994).

Los fibroblastos, macrófagos y células cebadas o mastocitos son constituyentes habituales de la dermis, que se encuentran principalmente en la región papilar y rodeando los vasos del plexo subpapilar. El fibroblasto es una célula derivada del mesénquima que migra a través de los tejidos y es responsable de la síntesis y degradación de las proteínas de la matriz del tejido conjuntivo fibroso y no fibroso, y de numerosos factores solubles. Los fibroblastos proporcionan un marco estructural a la matriz extracelular y actúan en la curación y cicatrización de las heridas, aumentando su actividad proliferativa y sintética durante estos procesos.

Los monocitos y macrófagos dérmicos constituyen el sistema fagocítico mononuclear de las células de la piel.

Hipodermis o subcutis.

El tejido de la hipodermis aísla al organismo, sirve como suplemento de reserva energética, acolchado y protección de la piel y permite su movilidad sobre las estructuras subyacentes. El límite entre la dermis reticular profunda y la hipodermis es una transición brusca de un tejido conjuntivo dérmico predominantemente fibroso a un tejido subcutáneo fundamentalmente adiposo. A pesar de esta clara diferencia anatómica, las dos regiones están todavía integradas de forma estructural y funcional, mediante redes de nervios y vasos, y mediante la continuidad de los apéndices epidérmicos. Los folículos pilosos en crecimiento activo tensan la piel y se extienden hacia la grasa subcutánea, y es aquí donde se encuentran las glándulas sudoríparas.

Los adipocitos forman la masa principal de células de la hipodermis (Holst, 2002). Están organizados en lóbulos definidos por tabiques de tejido conjuntivo fibroso. Los nervios, vasos y linfáticos están localizados dentro de los tabiques e inervan, nutren y drenan la región. La síntesis y almacenamiento de grasa continúa durante toda la vida por la acumulación en las células adiposas o por reclutamiento de nuevas células del mesénquima indiferenciado.

Funciones.

La piel también es uno de los órganos con mayor número de funciones, entre las que destacan: protección, secreción de productos sintetizados por algunos de sus anejos, excreción de distintos tipos de sustancias, termorregulación, sensación y, fundamentalmente, comunicación. Estos hechos explican la gran complejidad de su estructura anatómica e histológica.

Protección: La función más importante de la piel es formar una barrera efectiva entre el "interior" y el "exterior" del organismo, proporcionando protección frente a la luz ultravioleta y las agresiones mecánicas, químicas y térmicas; su superficie relativamente impermeable evita la deshidratación y actúa como una barrera física frente a la invasión por microorganismos. La barrera física recae principalmente en el estrato córneo, aunque las capas epidérmicas nucleadas, en particular las uniones intercelulares y las proteínas del citoesqueleto, proporcionan otros elementos importantes. La barrera química/bioquímica consiste en lípidos, ácidos, enzimas hidrolíticas, péptidos antimicrobianos y macrófagos. La barrera inmunológica está compuesta por los componentes humorales y celulares del sistema inmune (Proksch, 2008).

El estrato córneo (SC) sirve como la principal barrera contra la penetración percutánea de los productos químicos y los microorganismos y es capaz de resistir las fuerzas mecánicas (Madison, 2003). Además está involucrado en la regulación del intercambio de agua del organismo con la atmósfera, conocida como la pérdida de agua transepidérmica.

Sensación: Gracias a los órganos receptores, la inervación cutánea está en condiciones de percibir los estímulos de presión, térmicos y dolorosos, transmitirlos al sistema nervioso central y permitir al individuo una adaptación a las condiciones ambientales externas. Los corpúsculos y las terminaciones nerviosas de la sensibilidad son altamente especializados, existen receptores específicos para el calor, para el frío, para el dolor, para el prurito. La sensibilidad a la presión varía según las zonas del cuerpo humano, por ejemplo en las muñecas y en la planta del pie es tres veces y media superior que en el abdomen o en la frente. Si un estímulo de presión sobre la piel aumenta, la sensibilidad táctil se manifiesta primariamente como una sensación de presión y luego con una de dolor (Critchley, 2002).

Termorregulación: La piel actúa como aislante o como regulador térmico. La función de termorregulación se basa en el flujo de sangre a los vasos cutáneos y a las glándulas sudoríparas. La alternancia de

vasoconstricción y vasodilatación en los capilares lleva a un rápido cambio en el flujo hemático de acuerdo con la temperatura ambiental. Las glándulas sudoríparas ejercitan un importante papel en la regulación térmica; de hecho, una gran cantidad de calor se elimina del organismo con la evaporación del sudor y esto sucede también cuando la secreción no es visible. El panículo adiposo, abundante en la zona hipodérmica, tiene una baja conductividad térmica e interviene en esta función de termorregulación de la piel: por esta causa la piel mantiene el resto del cuerpo a una temperatura adecuada, independientemente de la temperatura externa dentro de ciertos límites (Falk, 1998).

Secreción y excreción. A través de la piel son eliminados catabolitos y otras sustancias de desecho del interior del organismo. La piel elimina CO₂, agua y grasa, así como iones sodio, pequeñas cantidades de potasio, magnesio, calcio y cloro, gracias a la acción de las glándulas exocrinas (Falk, 1998).

Función metabólica. El tejido adiposo subcutáneo constituye un depósito primordial de energía, sobre todo en forma de triglicéridos. La vitamina D se sintetiza en la epidermis, como complemento de la obtenida a través de las fuentes dietéticas.

Comunicación. La piel es la encargada de recibir los estímulos del exterior a través de las terminaciones nerviosas. Asimismo es el espejo de los sentimientos y emociones interiores. Por este motivo, no es de extrañar que este órgano constituya una pieza clave en la imagen exterior de una persona (Fernández-Abascal, 2007).

Radiación ultravioleta.

La luz ultravioleta (UV) es el término utilizado para designar la porción del espectro electromagnético que se encuentra entre la luz visible y los Rayos X. No existe acuerdo en cuanto a los límites precisos del espectro UV. El límite superior generalmente se establece con referencia a las longitudes de onda corta detectables por el ojo humano (alrededor de 380 nm). La delimitación del límite inferior presenta mayores dificultades.

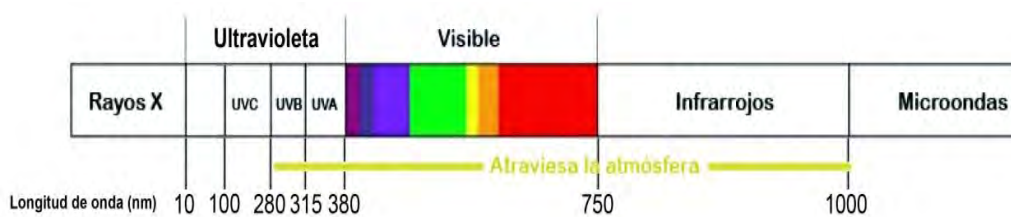


Fig. II-2 Espectro de la radiación solar

Las radiaciones UV se denominan "radiaciones no ionizantes", en contraste con "las radiaciones ionizantes", como los Rayos X. Sin embargo, no existe una clara división, y longitudes de onda de alrededor de 10 nm, clasificada por algunos autores como dentro del rango ultravioleta, producen efectos ionizantes. El rango de UV por debajo de 100 nm es comúnmente conocida como la región "UV de

vacío", porque la radiación es absorbida en su paso a través del aire y sólo se puede transmitir a través del vacío.

El interés biomédico de la radiación UV ha dado lugar a la subdivisión del extremo superior del espectro UV. La radiación ultravioleta (RUV) comprende cerca del 5% de la radiación solar terrestre y se define como aquellas longitudes de onda entre los 100 y los 400 nm. Por designación oficial de la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE), se subdivide en UVA (315 a 400 nm), UVB (280 a 315 nm) y UVC (100 a 280 nm). En época reciente, los UVA se dividieron en UVA I (340 a 400 nm) y UVA II (320 a 340 nm) porque los efectos de los UVA II son similares a los de los UVB.

La radiación UV del sol sobre la superficie de la tierra es de alrededor del 95 al 98% de UVA y del 2 al 5% de UVB, en tanto que todos los UVC se absorben por completo por el ozono de la estratósfera. Esta última región también ha sido descrita como "germicida", ya que incluye las longitudes de onda más eficaces en la inactivación de los microorganismos (Shama, 2000). La cantidad y la composición precisa de la radiación UV solar dependen de diversos factores, en particular del ángulo de cenit solar, que varía con la hora del día, la estación y la latitud, la concentración de ozono estratosférico, la polución, las nubes y la altitud.

Efectos de la radiación UV sobre la piel: La radiación ultravioleta (RUV) es uno de los mayores estímulos que inducen la pigmentación en la piel humana (Miyamura, 2007). La exposición a la radiación UV causa daños en el ADN, y por lo tanto la acumulación de melanina, podemos entenderla como una respuesta adaptativa de los melanocitos para prevenir daños en el ADN (Winter, 2001). Aunque tanto los rayos UVB como UVA producen bronceado después de la exposición al sol, dan lugar a diferentes respuestas pigmentarias que se definen principalmente por el paso del tiempo, es decir, inmediato y persistente oscurecimiento de la piel como reacción típica a los rayos UVA, así como un bronceado retardado, producido por UVB (Hönigsmann, 2002).

Los efectos clínicos agudos de la exposición a la luz solar o a las radiaciones UV artificiales consisten en eritema (quemadura solar) y

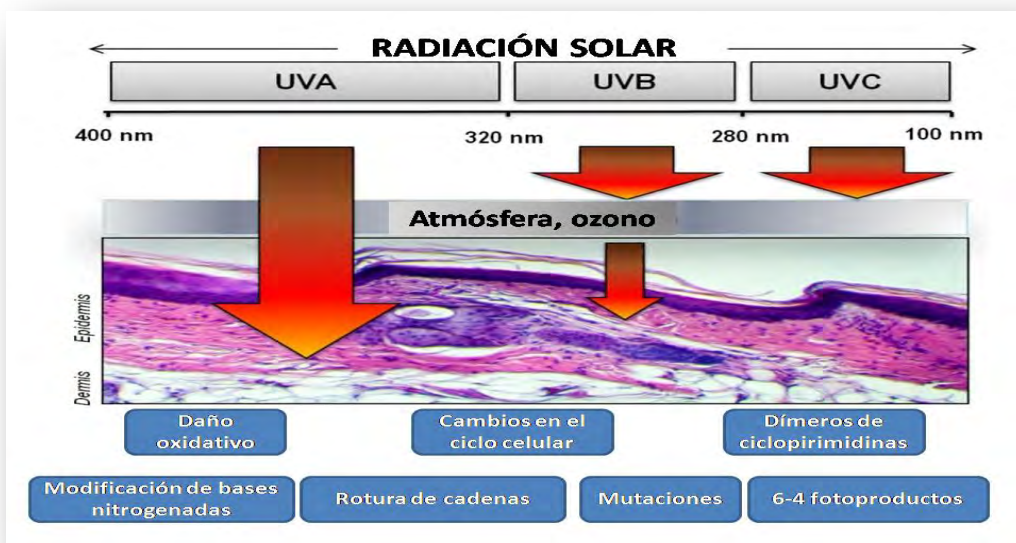


Fig. II-3. Efectos de las RUV sobre la piel

pigmentación (bronceado), así como engrosamiento de la epidermis, en particular, el estrato córneo según la intensidad y precocidad de la aparición. También hay otras reacciones biológicas, tales como la inmunosupresión y la fotosíntesis de la vitamina D. La mayor parte de la exposición a la RUV de la mayoría de los humanos proviene de la luz solar, pero existen otras fuentes, tales como lámparas de fototerapia, camas solares, aparatos de soldadura por arco, etc, que pueden producir efectos similares. El eritema y la respuesta individual al bronceado de la piel humana están, básicamente, determinados por la herencia genética. Los estudios indican un posible papel de polimorfismos en el receptor MSH (Melanocyte Stimulating Hormone) (Valverde, 1995), aunque probablemente haya otros genes involucrados.

El eritema (quemadura solar) es una reacción cutánea inflamatoria aguda que sigue a la exposición prolongada de la piel a la radiación ultravioleta. Se asocia con los síntomas clásicos de la inflamación, tales como enrojecimiento, calor, dolor y edema. Las reacciones más intensas comprenden el dolor y ampollas. Debido a que es fácilmente observable por métodos no invasivos y puede ser controlado a través del tiempo, el eritema se utiliza como el punto final para muchos estudios fotobiológicos en la piel. En general, la intensidad

de la quemadura está determinada por la energía total absorbida por la piel, y por lo tanto las dosis bajas durante largos períodos de tiempo darán lugar a quemaduras del mismo grado que dosis altas durante un corto período de tiempo (Meanwell, 1989).

Las quemaduras producidas por el sol causan ardor, escozor, dolor, y algunas veces se acompañan de síntomas sistémicos como dolor de cabeza, náuseas y vómitos en los casos más graves. Aunque las quemaduras solares se asocian generalmente a las personas de piel clara, también las sufren los individuos de piel oscura, si se exponen a dosis adecuadas de luz solar. La única diferencia, es que en estos últimos, el eritema es difícil de percibir, debido a su mayor pigmentación de la piel. Los síntomas de las quemaduras solares, son similares, tanto para los sujetos de piel oscura, como para los de piel clara (Kolias, 1996).

El grado de las quemaduras solares depende tanto del estado de la piel (fototipo, hidratación de la misma, edad del individuo, zona expuesta...) como de los factores ambientales (longitud de onda, factores geográficos, reflexión del ambiente y factores climáticos). Las personas con piel bronceada requieren 3.5 veces más dosis de exposición para causar eritema que las de piel blanca. De la misma

forma, los individuos negros requieren hasta 30 veces más dosis de radiación.

La hidratación de la piel también es un factor importante, ya que la RUV penetra en la piel húmeda con mayor facilidad que en la piel seca. El eritema puede variar con la edad. Los bebés y las personas mayores tienden a tener menores umbrales de eritema (Gilchrest, 1982). También varía con la localización anatómica: la cara, el cuello y el tronco requieren dosis más altas que las extremidades, debido a las variaciones en el grosor de la piel. Otro factor influyente es la exposición previa a las radiaciones (Young, 1998).

En este sentido, Fitzpatrick en 1975, consideró seis tipos fundamentales de piel según su reacción ante las RUV solar:

Fototipo	Acción del sol sobre la piel	Características pigmentarias	Suceptibilidad al cáncer
I	Presenta intensas quemaduras solares. Casi nunca se broncea y se descama de forma ostensible.	Individuos de piel muy clara, ojos azules, pelirrojos y con pecas en la piel, habitualmente no está expuestas al sol y es de color blanco lechoso	Alta
II	Se quema fácil e intensamente, pigmenta ligeramente y descama de forma notoria	Individuos de piel clara, pelo rubio, ojos azules y pecas, cuya piel, que no está expuesta habitualmente al sol, es blanca	Alta
III	Se quema moderadamente y se pigmenta correctamente.	Razas caucásicas (europeas) de piel blanca que no está expuesta habitualmente al sol.	Moderada
IV	Se quema moderada o mínimamente y pigmenta con bastante facilidad y de forma inmediata al exponerse al sol.	Individuos de piel morena o ligeramente amarronada, con pelo y ojos oscuros (mediterráneos, mongólicos, orientales)	Baja
V	Raramente se quema, pigmenta con facilidad e intensidad (siempre presenta reacción de pigmentación inmediata).	Individuos de piel amarronada (amerindios, indostánicos, árabes e hispanos)	Muy baja
VI	No se quema nunca y pigmenta intensamente	Razas negras	Muy baja

Tabla II-1 Fototipos (Fitzpatrick, 1975).

Mecanismos de formación del eritema: La radiación solar es absorbida por los cromóforos endógenos (Young, 1997). La epidermis contiene distintos cromóforos que se activan según sea el rango de la radiación UV; estos son los ácidos nucleicos, el ácido urocánico, aminoácidos aromáticos (proteínas) y los precursores de la melanina. Las reacciones fotoquímicas por parte de estas biomoléculas dan lugar a alteraciones en el funcionamiento de la piel, produciendo, entre otros efectos, el eritema.

El cromóforo mejor estudiado para la UVB es el ADN nuclear. La absorción de radiación UV por los nucleótidos lleva a la formación de fotoproductos del ADN, principalmente dímeros de la pirimidina. Por lo tanto, el mayor efecto de la radiación UVB y UVA de onda corta, parece ser el daño directo al ADN (Brash, 1997; Kraemer, 1997; Young, 1998) aunque el perjuicio oxidativo indirecto ocurre en un segundo plano, debido al efecto de reacciones de fotosensibilización endógena producida por las longitudes de onda mayores de los rayos UVA (Burren, 1998).

Los queratinocitos epidérmicos son las estructuras más dañadas, aunque con longitudes de onda de mayor penetración también se deterioran los fibroblastos y el endotelio vascular (Gilchrist, 1990).

Probablemente como resultado del daño provocado en el DNA y otros cromóforos, después de la irradiación UV, se sintetizan y liberan citoquinas y mediadores de la inflamación. Los mediadores farmacológicos más importantes de la quemadura son los eicosanoides (como las prostaglandinas), la histamina, las cininas, las citocinas así como otros factores quimiotácticos (Soter, 1990; Svobodova, 2006).

En conjunto, estas sustancias regulan la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular y en los queratinocitos, desempeñando un importante papel en el reclutamiento y en la activación de las células mononucleares y neutrófilos, provocando de esta forma, vasodilatación e inflamación.

Algunos estudios han demostrado un aumento transitorio en los niveles de histamina cutánea, que vuelven a su estado basal en 24 h (Hawk, 1983; Clydesdale, 2001). Sin embargo, la adición de antihistamínicos no afecta a la inducción del eritema, lo que apunta a que existen otros mediadores involucrados de forma más directa. El aumento de las concentraciones cutáneas de prostaglandinas y sus precursores (araquidonato) es evidente 24 horas después de la exposición a UV de la piel abdominal en humanos (Black, 1978).

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 UVB hasta 24 h; sin embargo, en la fase más tardía, se mantiene sin cambios (Snyder, 1974; Ibbotson, 1996).

En particular el ácido araquidónico y la prostaglandina E_2 y $F_{2\alpha}$ muestran niveles elevados a las 6 horas de la exposición, alcanzando un pico máximo entre las 18 y las 24 h, cuando la reacción inflamatoria está en su apogeo, y regresando a valores basales a las 48 h, momento en el que el eritema ha disminuido sólo en parte. También se ha demostrado la presencia en la piel irradiada de bradiquinina en las primeras fases de la inflamación (Greaves, 1978).

Otras citoquinas encontradas en piel postirradiada con UV son las interleuquinas (IL-1, 6, 8, 10, 12) y el factor de necrosis tumoral α . También se ha demostrado un aumento de las concentraciones de la sustancia P y de calcitonina (Ibbotson, 1996; Berking, 2005). Algunos de estos agentes causan vasodilatación, lo que determina su papel en la formación del eritema.

Asimismo las IL-6 e IL-10 parecen jugar un papel importante en los síntomas sistémicos de la fototoxicidad (quemadura solar) y de la inmunosupresión (Malina, 2002).

Además del daño en el ADN nuclear, la RUV produce otros efectos moleculares en los receptores de membrana y vías de señalización que regulan la actividad transcripcional. 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 h después de la exposición, y la ELAM-1 (molécula de adhesión intercelular-1) en las células superficiales endoteliales del plexo venular a las 24 h, encontrándose una disminución a las 72 h (Norris, 1991).

Por lo tanto, la expresión genética puede ser alterada con independencia del daño sufrido por el ADN. La existencia de tales mecanismos de regulación molecular indica vías moleculares paralelas o adicionales, pero los mecanismos celulares y efectores diana del eritema aún no han sido identificados.

Otros trabajos sugieren un papel importante del óxido nítrico como causa de la vasodilatación. Recientemente se ha demostrado que el óxido nítrico (NO) era producido por los queratinocitos después de la irradiación UVB (Suschek, 2010).

Envejecimiento cutáneo. Fotocarcinogénesis.

La piel, como los restantes órganos de la economía, va a sufrir los efectos del paso del tiempo, fenómenos que se conocen como proceso de **envejecimiento cronológico, intrínseco o fisiológico**; pero además, va a sufrir otro relacionado con factores exógenos o ambientales en el que va a jugar un papel primordial las radiaciones ultravioleta solares, denominado **envejecimiento extrínseco o fotoenvejecimiento**.

Podemos diferenciar, por tanto, dos procesos de envejecimiento de la piel: intrínseco y extrínseco. La variabilidad genética individual, determina el envejecimiento **intrínseco**, producido por el transcurso del tiempo. Por definición, este tipo de envejecimiento es inevitable por lo que no podemos modificar su evolución introduciendo cambios en el comportamiento humano.

Por el contrario, el **envejecimiento extrínseco** es generado por factores de origen externo, tales como la exposición crónica al sol, el tabaquismo, el consumo excesivo de alcohol, la mala nutrición, etc. La exposición a estos “contaminantes”, no es inevitable y conduce al envejecimiento prematuro de la piel.

De estos factores externos, la exposición al sol es considerado como el más importante y perjudicial para la piel. De hecho, el 80 % del

envejecimiento facial se cree que es debido a la exposición crónica al sol (Uitto, 1997), sobre todo en individuos que no tienen la protección natural asociada con altos niveles de melanocitos en la piel (Robinson, 1999).

El **envejecimiento intrínseco, cronológico o fisiológico** se produce como consecuencia del paso del tiempo. Los cambios se producen en parte como resultado de la acumulación del daño endógeno debido a la formación continua de especies reactivas de oxígeno (ROS), que se generan por la oxidación durante el metabolismo celular. A pesar de que el sistema posee mecanismos de defensa antioxidante, el daño generado por ROS afecta a componentes celulares tales como membranas, enzimas y ADN (Yaar, 2003).

Este tipo de envejecimiento tiene una base genética, pero también se debe a la disminución de los niveles de hormonas sexuales. Los telómeros, una porción terminal del cromosoma eucariota, tienen un papel importante. Con cada división celular, la longitud de los telómeros humanos se acorta, de manera que en los fibroblastos de la piel más del 30% de la longitud de los telómeros se pierde durante la edad adulta (Engelhardt, 1998). Los telómeros son secuencias cortas de bases que se disponen del mismo modo en todos los mamíferos

(TTAGGG). La enzima telomerasa es responsable de su mantenimiento. Parece que los telómeros son los responsables de la longevidad.

El acortamiento progresivo de la secuencia del telómero (50-100 pb por mitosis) a través de los sucesivos ciclos de replicación se opone a la protección de los extremos de los cromosomas, evitando así fusiones de extremo a extremo, lo cual es incompatible con la función celular normal. La mayoría de las células tienen la capacidad para unos 60 a 70 duplicaciones posnatales durante su ciclo de vida y posteriormente, llegar a la senectud, siendo viable pero incapaz de proliferación. Este caso facilita las fusiones cromosómicas de extremo a extremo que resulta en desorden del cariotipo con la apoptosis subsecuente, por lo tanto actúa como "reloj biológico".

La piel envejecida intrínsecamente es lisa y sin manchas, y se caracteriza por patrones geométricos normales, con algunas líneas de expresión exageradas. Histológicamente, la piel manifiesta atrofia epidérmica y dérmica, reducción de las crestas epidérmicas, así como la reducción del número de fibroblastos y mastocitos (Frenske, 1986; Roupe, 2001). Además, se observa un aumento en el número de fibrillas de colágeno, así como de la proporción de colágeno III/colágeno I (Lovell, 1987).

Envejecimiento extrínseco o fotoenvejecimiento. Las áreas expuestas de la piel (cara, pecho y brazos) muestran principalmente este tipo de envejecimiento, como resultado de los efectos acumulativos de la radiación ultravioleta. Las arrugas, las lesiones pigmentadas (como efélides, léntigos, e hiperpigmentación irregular) y las lesiones despigmentadas (por ejemplo, hipomelanosis guttata) son signos clínicos de la piel fotoenvejecida. También pueden observarse en la piel fotoenvejecida pérdidas en el tono y la elasticidad, junto con una mayor fragilidad, áreas de púrpura debido a la debilidad de los vasos sanguíneos y lesiones benignas (acrocordones, queratosis, y telangiectasias).

Según la escala Glogau (1997) de fotoenvejecimiento, los pacientes con un historial significativo de exposición al sol, probablemente recibirán una calificación mayor de lo esperado para su edad, al igual que los pacientes con antecedentes de exposición al sol mínima es probable que la puntuación sea más baja de lo esperado (Glogau, 1997).

La identificación histopatológica de la piel fotoenvejecida es peculiar, ya que se caracteriza por atrofia epidérmica, elastosis, y diferentes alteraciones de las fibras colágenas y elásticas. En particular, la piel, sometida a fotoenvejecimiento extremo o severo, presenta

fragmentación, enmarañamiento y más solubilidad de las fibras de colágeno (Lavker, 1979). Las fibras elásticas también experimentan fragmentación y pueden presentar progresiva reticulación y calcificación (Yaar, 2003). Este deterioro notable de las fibras colágenas y elásticas se ha demostrado que progresa con la exposición continuada a la RUV. En general, el envejecimiento de la piel se caracteriza por falta de elasticidad, mayor fragmentación y fragilidad de las fibras de colágeno (Roupe, 2001).

La mayoría de los cambios que se producen en la piel a medida que envejecemos son acelerados por la exposición solar. Estos cambios los clasificaremos en clínicos, funcionales e histopatológicos.

Clasificación del fotoenvejecimiento.

En 2010, Costelo-Branco realizó una clasificación del fotoenvejecimiento basándose en características clínicas y microscópicas.

Características clínicas o macroscópicas.

Fotoenvejecimiento leve, que se produce entre los 28 y los 35 años de edad. Se corresponde con un fotoenvejecimiento temprano manifestado por: cambios leves de la pigmentación, ausencia de queratosis, y arrugas de profundidad mínima.

Fotoenvejecimiento moderado, típico entre los 35 y los 50 años, caracterizado por arrugas finas y paralelas. Aparecen líneas en las comisuras de la boca y de los ojos, léntigos incipientes, se aprecian queratosis actínicas palpables no visibles. Se observa también alopecia temporal y occipital.

Fotoenvejecimiento importante, entre los 50 y los 60 años, cuyas características son la estabilización de las arrugas de expresión en la frente, así como las peribucales y periorbitarias. De la misma forma se intensifica el patrón geométrico de la piel y aparecen discromías (manchas, lentiginosis,...). La piel presenta sequedad y descamación, apareciendo telangiectasias y queratosis visibles.

Fotoenvejecimiento severo, se presenta a partir de los 60 años y está caracterizado por la presencia de arrugas totales en la región facial y prácticamente en todas las zonas descubiertas; se acentúa la profundidad de los surcos cutáneos. La piel se presenta engrosada, de forma irregular, adquiriendo un aspecto granuloso, y nodular. La coloración de la piel se torna amarillenta-grisácea, aparecen léntigos de mayor tamaño e hipocromías. Se hacen patentes lagos sanguíneos (hematomas) y las queratosis, pueden transformarse en carcinomas.

Características microscópicas.

En la piel envejecida, la intersección de la epidermis y la dermis, conocida como la unión dermoepidérmica (UDE), está alterada, es decir, la epidermis de mayor edad manifiesta una UDE aplanada, y por lo tanto, el área de conexión disminuye proporcionalmente.

Reducción del turnover celular epidérmico: Entre los treinta y ochenta años de vida, la tasa de renovación de la epidermis disminuye del 30% al 50% (Yaar, 2003). El tiempo de tránsito por el estrato córneo fue fijado por Kligman en 20 días en los individuos jóvenes y 30 días o más en personas mayores (Lèvêque, 2001). Este alargamiento del ciclo celular en los adultos coincide con una tasa de reemplazo de estrato córneo prolongada, atrofia epidérmica, cicatrización más lenta de las heridas y a menudo descamación menos efectiva.

En este sentido, se ha observado que los pacientes mayores requieren el doble de tiempo para volver a reepitelizar tras los procedimientos de dermoabrasión para rejuvenecimiento en comparación con pacientes más jóvenes (Orentreich, 1969). La cascada de cambios relacionados con la desaceleración de la renovación celular, da lugar al desarrollo de pilas de corneocitos que hacen que la superficie de la piel presente un aspecto áspero y sin brillo.

Dermis: Aproximadamente el 20% del espesor dérmico desaparece a medida que las personas envejecen. La dermis madura muestra una disminución de células y una progresiva avascularización (Frenske, 1986). Cambios en la producción de colágeno y fragmentación de las fibras elásticas, son características normales de la dermis envejecida. De la misma forma, la dermis fotoenvejecida, presenta desorganización de las fibrillas de colágeno y cúmulos anormales de elastina (Fisher, 1997; El Dommiati, 2002). El colágeno, la elastina y los glicosaminoglicanos son los tres componentes estructurales primarios de la dermis.

Colágeno: El principal componente estructural de la dermis y la proteína más abundante en los seres humanos, es el colágeno, y es responsable de conferir fuerza y sostén a la piel humana. Con el tiempo, las proteínas estructurales y los componentes principales de la piel se deterioran, dando lugar a signos del envejecimiento cutáneo. La piel envejecida intrínsecamente se caracteriza por una atrofia epidérmica y dérmica, siendo las alteraciones del colágeno muy importantes en el proceso de envejecimiento (Frenske, 1986).

De la masa de la piel seca, el 70% está compuesto por colágeno (Gniadecka, 1998). En la piel envejecida, el colágeno se caracteriza por el enmarañamiento de sus fibrillas, organizadas en fascículos, que

parecen estar en desorden, en comparación con el patrón observado en la piel más joven (Frenske, 1986). Además, se ha observado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que los fibroblastos maduros tienen bajos niveles de síntesis de colágeno. En la piel humana, la relación entre los tipos de colágeno también cambia con la edad.

Un componente integral de la UDE, el colágeno IV, proporciona el entramado estructural para otras moléculas y desempeña un papel clave en el mantenimiento de la estabilidad mecánica. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de colágeno IV entre la piel expuesta al sol y la no expuesta. Sin embargo, se han observado niveles más bajos de colágeno IV en la base de las arrugas en comparación con los flancos de las mismas. La estabilidad mecánica de la UDE, que puede verse afectada por la pérdida de colágeno IV, contribuye a la formación de arrugas (Contet-Audonneau, 1999).

El colágeno VII es el componente principal en la estabilización de las fibrillas que unen la zona de la membrana basal a la dermis papilar subyacente. En un estudio se identificaron un número significativamente menor de fibrillas de anclaje en pacientes con la piel expuesta al sol de forma crónica en comparación con los controles normales.

En los últimos 15 años la patología inducida por la radiación UV y el daño sufrido por el colágeno ha sido ampliamente descrita. Se sabe que la exposición a la radiación UV regula la síntesis de varios tipos de enzimas cuya función es la degradación de colágeno, conocidas como metaloproteinasas de la matriz (MMPs).

En primer lugar, la exposición UV produce un aumento en la cantidad del factor de transcripción *c-jun*; *c-fos*, el otro factor de transcripción involucrado en esta cascada transcripcional, está presente sin la necesidad de exposición a rayos UV. *c-jun*, tras combinarse con la proteína *c-Fos*, conforma el *factor de transcripción AP-1*. A su vez, AP-1 activa los genes de MMP que estimulan la producción de colagenasa, gelatinasa y estromelisina. La degradación del colágeno está mediada por la activación de AP-1 y por la inhibición del factor de crecimiento transformante (TGF) β de señalización (Rittie, 2002).

La investigación en seres humanos ha demostrado que en cuestión de horas de exposición a UVB, se producen MMPs, específicamente colagenasa y gelatinasa, (Fisher, 1996). Asimismo, repetidas exposiciones a RUVB genera una síntesis sostenida de MMP (Fisher, 1997). Dado que la colagenasa ataca y degrada al colágeno, elevaciones de colagenasa y otras MMPs, mantenidas en el tiempo,

probablemente produzcan la desorganización y destrucción de las fibras de colágeno identificados en la piel fotoenvejecida.

En particular, estas MMPs pueden representar el mecanismo a través del cual bajan los niveles de colágeno I en respuesta a la exposición UV. La radiación UV produce sobre la superficie celular la activación de los receptores del factor de crecimiento y de las citoquinas, por lo que los investigadores han determinado que el envejecimiento de la piel (extrínseco e intrínseco) se caracteriza por la elevación de la actividad de AP-1 y la expresión de MMP, inhibición de la señalización de TGF- β , así como reducción de la síntesis del colágeno y una mayor degradación del mismo (Rittie, 2002). Estos cambios pueden ser agravados por el fotoenvejecimiento.

Elastina: Las alteraciones de las fibras elásticas están tan fuertemente asociadas con el fotoenvejecimiento cutáneo, que la elastosis, una acumulación de elastina amorfa, se considera patognomónica del fotoenvejecimiento. De este modo, la RUV induce engrosamiento y enrollamiento de las fibras elásticas en la dermis papilar. Estos cambios también se producen en la dermis reticular como resultado de repetidas exposiciones a la radiación UV (Heras, 2007).

El estudio con microscopía electrónica de las fibras elásticas en la piel expuesta a RUV ha puesto de manifiesto una reducción del número de microfibrillas y un aumento de áreas interfibrilares, de la complejidad de la forma y estructura de las fibras y el número de inclusiones densas de electrones (Takuo, 1981). Además, pequeñas cantidades de azúcar y de lípidos y un nivel anormalmente elevado de aminoácidos polares se han encontrado en la elastina extraída de la piel de pacientes de edad avanzada (Frenske, 1986). La etiología subyacente de los cambios relacionados con la edad de la elastina no está tan bien estudiada como los cambios producidos en el colágeno, sin embargo, se cree que metaloproteinasas de la matriz juegan un importante papel, ya que se ha demostrado que MMP-2 degradan la elastina (Scharffetter-Kochanek, 2000).

En la piel sometida a fotodaño, como respuesta inicial, se observa la presencia de una mayor cantidad de tejido elástico. El nivel de exposición al sol determina la magnitud de la respuesta hiperplásica. Como consecuencia de la degeneración de las fibras de elastina, la piel pierde elasticidad y resistencia (Matsuoka, 1989). Una piel que ha experimentado esta fotodegeneración, se caracteriza por cambios en el patrón normal de las fibras elásticas, apareciendo en su lugar fibras inmaduras, llamadas oxitalán, que se encuentran en la dermis papilar.

Estas fibras forman una red en la piel joven que sube perpendicularmente desde la sección superior de la dermis papilar a la parte inferior de la membrana basal. Esta red desaparece gradualmente con la edad (Bouissou, 1988). En consecuencia, la elasticidad de la piel se va perdiendo con la edad (Ecoffier, 1989). La flacidez observada en los ancianos se debe en gran parte a esta pérdida de elasticidad.

Glicosaminoglicanos (GAG): Los GAGs, junto con el colágeno y la elastina, son los principales componentes de la piel y son los responsables del aspecto de la misma. Estas cadenas de polisacáridos, formadas por la repetición de disacáridos unidos a un núcleo proteico, desempeñan un importante papel, ya que son capaces de retener agua hasta 1000 veces su volumen.

Entre los numerosos tipos de GAGs, destaca el ácido hialurónico (HA), el dermatán sulfato (que son los de mayor prevalencia entre los GAGs) y el sulfato de condroitina. Estos compuestos confieren a la piel su aspecto sonrosado, suave e hidratado, y se considera que ayudan a mantener el equilibrio salino. Varios estudios sugieren que los GAGs, en particular, HA, son capaces de reducir los síntomas del fotoenvejecimiento (Ghersetich, 1994). Algunos estudios ofrecen resultados contradictorios, sin embargo, sugieren que no hay cambios en el nivel de GAGs en la piel envejecida (Pearce, 1972).

La piel fotoenvejecida se caracteriza por niveles reducidos de ácido hialurónico (HA) y niveles elevados de sulfato de condroitina. Este patrón también se observa en el tejido cicatricial (Bernstein, 1996). En la piel de los jóvenes, el HA se encuentra alrededor de las fibras de colágeno y de elastina, particularmente, donde éstas se entrecruzan. En la piel envejecida, este tipo de asociación con HA desaparece (Ghersetich, 1994). Es posible que la disminución en los niveles de HA, y su separación del colágeno y la elastina, así como la disminución de la retención de agua, puedan estar involucrados en los cambios observados en la piel envejecida, tales como arrugas, disminución de la elasticidad y de la turgencia y disminución de la capacidad para sostener la microvasculatura de la piel.

Como el HA puede retener unas 1000 veces su peso en agua, ayuda a la piel a conservar y mantener la humedad. Se encuentra distribuido por todo el tejido conectivo y es producido principalmente por los fibroblastos y queratinocitos de la piel (Tammi, 1991). El HA se localiza no sólo en la dermis, sino también en los espacios intercelulares de la epidermis, especialmente en el estrato espinoso medio; sin embargo, tanto en el estrato córneo como en el estrato granuloso no encontramos HA (Sakai, 2000).

Melanocitos: Con la edad, sufren una reducción entre el 8 y 20 % por década. Clínicamente, este descenso corresponde también a una reducción en el número de nevos melanocíticos en individuos de edad avanzada (Frenske, 1986). La piel de los individuos de mayor edad es menos capaz de protegerse del sol, porque la melanina, cuya producción se reduce en los ancianos, absorbe las radiaciones ultravioleta carcinógenas. Por lo tanto, las personas mayores son más susceptibles al desarrollo de cánceres inducidos por el sol.

Vascularización: La piel envejecida ha demostrado a través de numerosos estudios ser relativamente avascular. Gilchrest, en 1982, describió una reducción del 35% en el calibre de la sección venosa de la piel envejecida en comparación con la piel joven. Esta pérdida en la red vascular es especialmente notable en la dermis papilar, con la desaparición de las asas capilares verticales. La reducción de la vascularización se ha relacionado con un descenso del flujo sanguíneo, el agotamiento del intercambio de nutrientes, la inhibición de la termorregulación, la disminución de la temperatura de la superficie cutánea y la palidez cutánea.

Papel de los radicales libres en el fotoenvejecimiento:

El proceso de envejecimiento se considera, que al menos en parte, es debido a la formación y actividad de los radicales libres, también conocidos como especies reactivas del oxígeno (ROS). Están compuestos por moléculas de oxígeno con un electrón no apareado y se originan por varios factores tanto exógenos como endógenos, tales como la exposición a RUV, la contaminación, el estrés, el tabaquismo y los procesos metabólicos normales. Además, algunas evidencias sugieren que los radicales libres provocan alteraciones en las vías de expresión de los genes, que a su vez contribuyen a la degradación del colágeno y la acumulación de elastina, signos característicos de la piel fotoenvejecida (Scharffetter-Kochanek, 2000). Los antioxidantes neutralizan los radicales libres mediante el suministro de otro electrón, la cesión de un par de electrones a una molécula de oxígeno y la estabilización del proceso.

Fotocarcinogénesis y cáncer cutáneo.

En la actualidad se calcula que se producen entre dos y tres millones de cánceres de piel no melanoma cada año a nivel mundial. Uno de cada tres cánceres diagnosticados es un cáncer de piel y, de acuerdo con la Skin Cancer Foundation Statistics, uno de cada cinco estadounidenses desarrollará cáncer de piel a lo largo de su vida (Skin Cancer Foundation, 2012). Además, estimaciones de la American Cancer Society indican que se produjeron 12.190 muertes por cáncer de piel en 2012 (Siegel, 2012).

La prevalencia del cáncer de piel en las sociedades occidentales ha aumentado exponencialmente en los últimos años. Así, durante el año 2012, en EE.UU. se diagnosticaron más de ochenta y un mil nuevos casos de cáncer cutáneo (incluidos los carcinomas espinocelulares (SCC) y los carcinomas basocelulares (BCC)) y alrededor de 76.000 serán melanomas (Siegel, 2012).

La carcinogénesis cutánea es un proceso de múltiples pasos que comprende la iniciación, promoción y progresión tumoral. Aunque son muchos los factores etiológicos implicados en estos procesos, la exposición crónica a la radiación solar está considerada como la causa principal del cáncer de piel en humanos (Flip, 2009). Así diversos

estudios epidemiológicos han demostrado que existe correlación entre la latitud de residencia y tasas de incidencia y mortalidad por melanoma en poblaciones homogéneas (Hu, 2004). Igualmente, el cáncer de piel se puede producir en animales de laboratorio por irradiación UV (Cano, 2010). De la misma forma, pacientes con trastorno genético que provoca deficiencias en los procesos de reparación del ADN dañado por la radiación UV son propensos a desarrollar cáncer de piel en las áreas expuestas (Sidwell, 2006).

La mejor evidencia a favor de la exposición solar como factor desencadenante, consiste en que los incrementos han sido mayores en las localizaciones que se encuentran expuestas de modo intermitente, tales como el tronco y las extremidades, con una pequeña variación en la incidencia de los melanomas de cabeza y cuello (Green, 1993). En este caso, suele atribuírsele la responsabilidad al aumento de la exposición recreativa. También se ha sospechado de la deplección del ozono: dado que la curva de absorción en la región de los rayos UVB posee una pendiente pronunciada, pequeñas variaciones en la concentración de ozono afectan a la penetración de las radiaciones de manera considerable.

Las características de la exposición que conducen a cada lesión maligna son diferentes. La exposición acumulativa a lo largo de la vida

tiene una fuerte asociación con la aparición de SCC (Rosso, 1996). En cambio, el BCC y la queilitis actínica (QA) parecen depender de que se alcance un determinado umbral de exposición UV, a menudo en la juventud (Gallagher, 2005). Algunos estudios de caso-control relacionan al melanoma con una exposición intensa temprana en la vida, y la aparición de una o dos quemaduras solares ampollosas duplica el riesgo de presentación del tumor (Gilchrest, 1999).

Daño del ADN inducido por la RUV: Se ha establecido que los cánceres son producto de la acumulación de lesiones en el ADN y que varios genes desempeñan un papel crucial en la carcinogénesis, comportándose bien como oncogenes o como genes supresores de tumores. La radiación ultravioleta produce lesiones en el ADN, que se creen las responsables de los cánceres de piel producidos por la radiación solar. Actualmente, incluso en la queratosis actínica, lesión precancerosa, se pueden ver algunos cambios genéticos (Veaudry, 2010).

La primera etapa de la carcinogénesis inducida por la radiación solar ocurre cuando los fotones de la radiación UVB promueven la formación de fotoproductos de las pirimidinas del ADN, del tipo de dímeros de pirimidina-ciclobutano y pirimidina (6-4) pirimidona. Estos fotoproductos se producen por la unión covalente de pirimidinas

adyacentes, y se suelen producir en zonas en las que hay residuos de pirimidina consecutivos, que son las zonas preferidas de la mutación (Schuch, 2010).

Estudios previos sugieren que los fotoproductos de dipirimidina son los principales implicados en la citotoxicidad y mutagénesis en las lesiones del ADN inducidas por UV (Grebneva, 2006). Los rayos UVA requieren dosis 1000 veces mayor para inducir daño biológico (Woollons, 1999). La radiación UVA induce la generación de dímeros de tipo ciclobutano que contienen timina, produce menores cantidades de purinas y pirimidinas oxidadas y provoca roturas aisladas en las hebras del ADN (Douki, 2003).

La radiación ultravioleta produce una impronta característica cuando interactúa con el ADN, que permanece en el tumor aún décadas después, como se ha demostrado en bacterias (Miller, 1985). Un fotoproducto 6-4 dímero de tipo ciclobutano puede conducir a una mutación de dos formas diferentes. Al copiar la lesión durante la replicación del ADN, la ADN-polimerasa puede interpretar la citosina dañada como una timina e insertar una adenina como complementaria. En la etapa siguiente de la replicación, la polimerasa inserta de manera correcta una timina como complementaria a dicha adenina, obteniendo como resultado una sustitución C→T. A pesar de que el dímero

pirimidina de tipo ciclobutano TT es el fotoproducto más frecuente y mejor conocido, las timinas no son mutagénicas dado que el gen XPV codifica una polimerasa especial (Polymerase η (Pol eta)) que agrega adeninas complementarias a un dímero de tipo ciclobutano conformado por timinas (Ling, 2003).

Una alternativa es que surja una mutación porque los dímeros de tipo ciclobutano aceleran la desaminación de sus citosinas a uracilo, lo que conduce a una sustitución C \rightarrow T, produciéndose en este caso errores de la polimerasa η (Yu, 2001). En cualquiera de los casos, las mutaciones C \rightarrow T solo ocurren cuando una citosina se ubica junto a una timina o a otra citosina, ya que los fotoproductos UV más importantes ligan pirimidinas adyacentes. Si la mutación se da en dos citosinas adyacentes, el resultado será CC \rightarrow TT. Este patrón distintivo de mutación C \rightarrow T en que la C yace junto a otra pirimidina, incluida CC \rightarrow TT, es característico de la radiación ultravioleta, y se denomina mutación distintiva por RUV.

La complicación más grave de la exposición crónica a la radiación ultravioleta solar corresponde al cáncer cutáneo que, usualmente, empieza por lesiones precancerosas de larga evolución, denominadas queratosis actínicas en la piel o queilitis actínica en el labio; son lesiones engrosadas, erosivas, escamosas, ligeramente infiltradas y que, si se

dejan a su evolución, pueden malignizar. Los cánceres cutáneos procedentes de los queratinocitos con el carcinoma basocelular, de larga evolución y que no suele originar metástasis y el carcinoma espinocelular, de evolución más rápida y comportamientos más agresivo. No obstante, los tumores de mayor gravedad son los procedentes de los melanocitos, los melanomas.

Modelos animales de fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis.

Con el objetivo de reproducir experimentalmente los efectos de las radiaciones ultravioleta y ensayar tratamientos preventivos frente a las mismas, han sido desarrollados en los últimos años diferentes modelos animales, principalmente sobre ratones hairless (Sharma. 2011).

El primer intento de estudiar el daño inducido por la radiación UV en tejido conectivo en un modelo animal data de 1964, cuando *Sams y colaboradores* provocaron elastosis en la piel de la zona dorsal del tronco afeitado de un ratón. Realizaron su experimento con cinco grupos de 20 animales albinos cada uno pertenecientes a la cepa ICR, sobre los que ensayaron los efectos de la radiación ultravioleta sola, producida por una lámpara Hanovia de cuarzo caliente a una distancia de 50 cm cinco sesiones por semana o en combinación con el aceite de crotón. Este aceite contiene una de las pocas proteínas vegetales tóxicas conocidas: la crotina, la cual a su vez consiste en una mezcla de crotonalina y crotoglobulina, albuminoides tóxicos con propiedades antigénicas semejantes a las de las toxinas bacterianas. Las biopsias de las muestras tomadas a los animales determinaron que la elastosis comenzó alrededor de los folículos pilosos. También se desarrolló más rápidamente en el grupo tratado con aceite de crotón en combinación

con la RUV que en los animales que recibieron sólo radiación ultravioleta (Sams, 1964).

Desafortunadamente, las dosis de UV necesaria para dañar el tejido conectivo del ratón, supera la necesaria para producirla en los seres humanos. De igual forma, la creencia de que los ratones con pelo no son un modelo adecuado para las respuesta humana a la radiación UV está basada en que los tumores inducidos por UV fueron fibrosarcomas en lugar de los carcinomas de células escamosas que se observan en humanos expuestos crónicamente a estas radiaciones (Grady, 1941).

En 1960, cuando *Winkelmann y colaboradores* informaron que tanto en el ratón sin pelo, como en humanos, se desarrolló carcinoma de células escamosas después de la exposición crónica a la UV, este animal se convirtió rápidamente en el modelo de elección para el estudio de la carcinogénesis por RUV. En este estudio, ratones fueron expuestos diariamente a radiación ultravioleta durante siete meses. Se utilizó una fuente de luz ultravioleta de 85 vatios (bombilla H85-C3), colocada a 30 centímetros de los ratones que se irradiaron durante 35 minutos al día. Cuando se desarrollaron los tumores, algunos de ellos fueron extirpados para el examen histológico, al resto se les permitió desarrollarse hasta la muerte del animal o hasta que la superficie

cutánea estuvo comprometida. Los tumores se desarrollaron en los cuatro ratones utilizados, de forma difusa en la superficie dorsal incluyendo la cabeza, el cuello y el dorso. En todos los casos hubo múltiples lugares de origen y se observaron tumores múltiples. A las cuatro o cinco semanas muchos de los tumores se convirtieron en masas nodulares de 1 a 2 cm. de diámetro con ulceración central. También se observaron lesiones cutáneas papilomatosas, que rápidamente formaron costras hemorrágicas. En ningún caso se produjeron en orejas, ojos, o el dorso de las patas, así como en las superficies que no habían sido irradiadas por la luz ultravioleta (Winkelmann, 1960).

Una vez instaurado el modelo, se comenzaron a estudiar diferentes sustancias y tratamientos con el objetivo de impedir o inhibir el daño en la piel de los animales. Así, *Snyder y May (1975)* estudiaron el efecto preventivo de un protector solar (ácido paraaminobenzoico) contra la carcinogénesis cutánea, y observaron que los ratones hairless irradiados sin protección desarrollaron elastosis (Snyder, 1975). El primer estudio diseñado específicamente para producir elastosis en un ratón sin pelo fue en 1980. *Berger y colaboradores*, utilizaron ratones desnudos (Ng/-) cepa albina, que normalmente tienen bien desarrollada la red de fibras elásticas (Berger, 1980). Este efecto, también se observa

en el ratón SKH1. Estos últimos ratones se crían en condiciones SPF, con el resultado de que desarrollan más fácilmente inflamación al ser expuestos a la radiación UVB y a los irritantes tópicos.

El ratón *hairless* fue utilizado por primera vez para estudiar los diversos aspectos histológicos producidos por fotoenvejecimiento por Kligman en el año 1982 (Kligman, 1982). Estos ratones presentan una mutación en el gen *Hr*.

El gen *Hr* codifica un corepresor transcripcional altamente expresado en la piel de mamíferos. En el ratón, se han identificado alelos recesivos de este gen, lo que da como resultado la ausencia de pelo en animales homocigotos. Las mutaciones en el ortólogo humano, también se han asociado con alopecia congénita.

Aunque se han desarrollado una gran variedad de cepas sin pelo, los ratones outbred SKH1 son los más utilizados en la investigación dermatológica. Estos ratones albinos e inmunocompetentes, permiten la fácil manipulación de la piel, la aplicación de agentes tópicos y la observación de la respuesta cutánea a la exposición a RUV. La cicatrización de heridas, la respuesta fotobiológica aguda y la carcinogénesis cutánea se han estudiado ampliamente en ratones SKH1. Además, los tumores inducidos en estos ratones se asemejan, tanto

morfológica y molecularmente a los tumores malignos humanos inducidos por RUV (Benavides, 2009).

Inicialmente, en estos ratones, el pelo se desarrolla normalmente. A partir de día 13-14, se produce una rápida y completa pérdida del pelo, al principio en los párpados, prosiguiendo en sentido caudal. A las tres semanas de vida, los animales han perdido completamente el pelo, exceptuando algunas vibrisas. La piel de los ratones SKH1 es rugosa, rugosidad que aumenta con la edad. Las uñas son largas y retorcidas. La epidermis de los dos sexos es similar en espesor, pero la dermis es más gruesa y la hipodermis más delgada en el macho que en la hembra (Oberyszyn, 2008).

Los ratones hairless son animales adecuados para el estudio de los efectos agudos producidos por RUV, evitando los efectos asociados al afeitado o a la depilación química. La dosis mínima de eritema (MED) es la dosis menor de RUV que causa inflamación cutánea perceptible. En ratones SKH1 la MED para fuentes de luz UV empleadas comúnmente es de 2.240 J/m^2 (Wilgus, 2000). Los SKH1 desarrollan una reacción típica de quemadura solar, caracterizada por edema, eritema e inflamación (Clydesdale, 2001). El pico de la respuesta postirradiación se produce a las 48 horas. Los aumentos de flujo sanguíneo y de la permeabilidad vascular, y la expresión alterada de las moléculas de adhesión,

promueven el reclutamiento de células inflamatorias, particularmente neutrófilos y monocitos. 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 de crecimiento que promueven un mayor reclutamiento de células inflamatorias y la reparación de los tejidos. De esta forma, la piel sin pelo del SKH1 es adecuada para el estudio de compuestos de aplicación tópica que alteran la respuesta inflamatoria inducida por RUV (Wilgus, 2003).

Asimismo, el ratón SKH1 se ha utilizado ampliamente para estudiar el mecanismo, la prevención y tratamiento de las alteraciones de la piel relacionadas con la edad. Los cambios inducidos por la radiación UV en la dermis de ratones SKH1 incluyen alteraciones de las fibras elásticas, la degradación del colágeno y glicosaminoglicanos, aumento asociado con alteración de la actividad de las metaloproteasas de la matriz. Expuestos crónicamente a la radiación UV, los ratones SKH1 desarrollan arrugas, que aparecen como importantes pliegues horizontales en el dorso. Estas difieren de las arrugas en el hombre que surgen después de sólo unas pocas semanas de la exposición a la radiación UV y por estar asociada a anomalías de la epidermis en lugar de cambios dérmicos (Sharma, 2011).

En nuestro estudio hemos elegido el ratón SKH1 atendiendo a sus características, tales como facilidad de manejo y mantenimiento, por su docilidad e inmunocompetencia, a la vez que por presentar una piel muy sensible a los efectos de la RUV, por ser albinos y sin pelo.

Fotoprotección. Antioxidantes y radicales libres.

La fotoprotección corresponde a las medidas encaminadas a evitar los efectos nocivos de la RUV. Se distinguen dos tipos:

66

Natural: La que proporciona el propio organismo como **respuesta defensiva** a la RUV. La más importante es la formación de melanina o bronceado. Ofrece poca protección, en torno a un FPS de 4. También el aumento del grosor de la capa córnea, que asimismo proporciona poca protección, alrededor de un FPS de 2, ya que es un efecto a corto plazo, pues a largo plazo se adelgaza la epidermis por efecto del fotoenvejecimiento. Las más efectivas son permanecer a la sombra (puede reducir la incidencia de la radiación ultravioleta entre 50 y 95%), el uso de ropa específica (que se comercializa etiquetada con FPS), de sombreros de ala ancha y de gafas de sol que bloqueen las RUV.

Fotoprotectores: Se clasifican en físicos, químicos y agentes antioxidantes.

Los protectores solares **físicos** son compuestos de aplicación tópica que reflejan o dispersan la radiación UV.

En la actualidad, se utilizan principalmente dos compuestos: el dióxido de titanio (TiO₂) y óxido de zinc (ZnO), que, ofrecen ventajas con respecto a los químicos. Ambos principios activos son productos fotoestables y producen un efecto protector solar. Presentan además tasas bajas de potencial alergénico y de sensibilización. El ZnO extiende la protección a los rayos UVA (hasta 380 nm) (Pinnell, 2000), aunque la protección RUV del ZnO es baja en comparación con otros filtros químicos.

Los **químicos** absorben la radiación a través de sus estructuras de anillos aromáticos conjugados. Tras la exposición RUV, los electrones de estos compuestos se activan y se hacen inestables. Con el tiempo, los electrones vuelven a su estado estable y liberan la energía en forma de calor (Bech-Thomsen, 1992).

Los agentes **antioxidantes**, son compuestos de aplicación tópica o consumo oral que tratan de evitar los efectos nocivos de la RUV producidos a través de la formación de radicales libres.

Los protectores solares se han convertido, de modo casi exclusivo, en la forma de protección utilizada por el ser humano, cuando participa en actividades al aire libre (Cokkinides, 2006), a pesar de que buscar la sombra y usar ropa protectora proporcionan mejor

protección. Sin embargo, su uso rutinario ha demostrado reducir el cáncer de piel y retardar el proceso de fotoenvejecimiento. Los protectores solares son eficaces para disminuir el número de queratosis actínica y los cánceres de células escamosas (CCS) (Green, 1999). En cuanto a los carcinomas de células basales (CCB), el beneficio del uso de fotoprotectores no es concluyente. No se ha demostrado una reducción estadísticamente significativa de CCBs con el uso rutinario de protectores solares. Sin embargo, hay una tendencia general que muestra una disminución en la incidencia de CCB (Van der Pools, 2006). En cuanto al papel protector frente al melanoma, existe controversia, centrada principalmente sobre si usar protector solar puede conducir a una mayor incidencia de melanoma. Algunos estudios epidemiológicos muestran acción preventiva, mientras que otros muestran mayor incidencia del melanoma. Un meta-análisis concluyó que el uso los protectores solares es seguro, y que el uso de los mismos no aumenta el riesgo de desarrollar melanoma (Dennis, 2003).

La protección contra la radiación UVA también se ha evaluado en el modelo experimental de fotoenvejecimiento. Usando protectores solares de amplio espectro, *Kligman y Zheng*, irradiaron ratones sin pelo con longitudes de onda larga de alta intensidad de UVA durante 32 semanas, con una dosis acumulativas de 8000 J/cm^2 (Kligman, 1995). Un

protector solar que absorbe bien en la longitud de onda larga UVA fue altamente protector contra el fotoenvejecimiento inducido por longitudes de onda mayores de 340 nm. *Harrison et al* informaron que la adición de un filtro UVA al 2 % a un protector solar SPF-2 de UVB, proporcionaba protección contra daño histológico producido a las 16 semanas de radiación solar con estimulación suberitemal (Harrison, 1991). El protector solar sin el filtro de rayos UVA no fue efectivo. Este estudio sugiere que incluso la exposición casual a corto plazo, puede requerir protección de bajo SPF de amplio espectro y no solo protección UVB.

Antioxidantes y radicales libres

Los compuestos polifenólicos constituyen uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos en el reino vegetal, con una lista de más de 8000 estructuras que sigue en continuo crecimiento (Benavente García, 2008). Existen numerosas clasificaciones, pero normalmente se agrupan según el número de anillos fenólicos que contienen y en función de cómo se unen entre sí. Se distinguen dos grandes grupos de moléculas, flavonoides y no flavonoides, siendo el primero el más numeroso.

Los polifenoles son metabolitos secundarios de plantas y están generalmente involucrados en la defensa contra la radiación ultravioleta o la agresión por patógenos (Beckman, 2000). En los alimentos, los polifenoles pueden contribuir a darles sabor amargo, astringencia, color, olor y estabilidad a la oxidación. Hacia el final del siglo XX, los estudios epidemiológicos y meta-análisis asociados sugieren que el consumo a largo plazo de dietas ricas en polifenoles ofrecen cierta protección contra el desarrollo de cánceres, enfermedades cardiovasculares, diabetes, osteoporosis y enfermedades neurodegenerativas (Graft, 2005).

Son compuestos naturales encontrados en la mayoría de las frutas, verduras y cereales. Frutas tales como uvas, manzanas, peras, cerezas y otras bayas contienen hasta 200-300 mg de polifenoles por cada 100 gramos de peso fresco. Los productos fabricados con estas frutas, también contienen polifenoles en cantidades importantes. Por ejemplo, un vaso de vino tinto, una taza de té o un café contienen aproximadamente 100 mg de polifenoles. Los cereales, las legumbres y el chocolate también contribuyen a la ingesta polifenólica (Scalbert, 2005).

Clases de polifenoles	Origen y descripción
Ácidos Fenólicos	Los ácidos fenólicos son moléculas simples, como el ácido cafeico y el ácido cumárico. Los ácidos fenólicos forman un grupo diverso que incluye ácidos ampliamente distribuidos como el hidroxibenzoico y el hidroxicinámico. Compuestos hidroxicinámicos (p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico) se encuentran con mayor frecuencia como ésteres simples de ácidos hidroxicarboxílicos o glucosa, mientras que los compuestos del ácido hidroxibenzoico (p-hidroxibenzoico, ácido gálico, ácido elágico) están presentes principalmente como formas de glucósidos. El ácido elágico se encuentra en las granadas. El café es particularmente rico en ácidos fenólicos ligados, tales como el ácido cafeico, ácido ferúlico y el ácido p-cumárico. Los ácidos fenólicos encontrados en los arándanos son el ácido gálico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido p-cumárico y ácido vanílico
Flavonoides	Los flavonoides son una subclase de polifenoles y están ampliamente distribuidos en la naturaleza. La estructura polifenólica de los flavonoides y taninos les hace muy sensibles a las enzimas oxidativas
Antocianinas	Las antocianinas y antocianidinas son un gran grupo de pigmentos solubles en agua que se encuentran en un gran número de frutas, verduras y flores, las uvas en particular, el extracto de semilla de uva, y las bayas. Bayas de arándano y otros tienen una alta concentración de antocianinas.
Catequinas o flavanoles	Se encuentran principalmente en las hojas de té. Las hojas de té y semillas de uva tiene el monómero flavan-3-oles catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, epicatechingallate y el galato de epigalocatequina-3
Flavonas	La Apigenina, luteolina. La manzanilla tiene una buena cantidad de Apigenina
Flavonoles	Los flavonoides se encuentran en altas concentraciones en las cebollas, manzanas, vino tinto, el brócoli, el té y Ginkgo Biloba. Los más comunes son los flavonoides quercetina, kaempferol y miricetina. Los flavonoides incluyen también fisetina, isoquercitrin y el hyperoside
Flavononas	Hesperidina y naringina son flavanonas
Isoflavonas	La genisteína y la daidzeína se encuentran en la soja
Lignanós	Los lignanos se encuentran en los frutos secos y cereales integrales. La linaza tiene un alto contenido de lignanos
Proantocianidinas	Estos se encuentran en las uvas, vino tinto, y corteza de pino. Pycnogenol es un extracto de corteza de pino. Extracto de semilla de uva proporciona una fuente concentrada de polifenoles, muchos de los cuales son las proantocianidinas. El vino tinto es rico en proantocianidinas polifenoles, complejos. Las proantocianidinas comparten propiedades comunes con otros polifenoles, en particular, su capacidad de reducción y la capacidad de quelar iones metálicos
Procianidinas	Catequinas oligoméricas se encuentran en altas concentraciones en el vino tinto, las uvas y las semillas de uva, el cacao, arándanos, las manzanas y en suplementos como el Pycnogenol. Las manzanas contienen muchos tipos de polifenoles, y los componentes principales son las procianidinas oligoméricas
Estilbenos	El resveratrol se encuentra en la piel de las uvas de color oscuro
Taninos	Los taninos se encuentran en el vino tinto, el té, y las nueces. Son moléculas grandes. Muchos flavonoides también se presentan en forma de moléculas de gran tamaño (taninos). Estos incluyen los taninos condensados (proantocianidinas), taninos derivados y taninos hidrolizables.

Tabla II-2. Breve descripción de algunos polifenoles y sus fuentes de obtención. (Nichols, 2010)

Flavonoides

Existen diversos estudios que demuestran los beneficios aportados por las dietas ricas en vegetales. Distintos autores han confirmado que la ingesta abundante de frutas y verduras reduce el riesgo de padecer, desde enfermedades inflamatorias (Ghiringhelli, 2012) a varios tipos de cáncer (gástrico, de esófago, de próstata, etc.) (Buck-Gu, 2009). Aunque hay numerosas moléculas implicadas en estos efectos saludables, probablemente el grupo más importante sea el de los flavonoides (Afaq, 2011).



Fig. II-4. Flor de Tillandsia aeranthos. El pigmento que le da el color a sus brácteas es un flavonoide.

En mamíferos, estas moléculas tienen diversas acciones: son antioxidantes tanto directos, como indirectos; antiinflamatorios; antitumorales, afectando a todas las etapas de la carcinogénesis; fotoprotectores; protegen el sistema cardiovascular y nervioso (Benavente García, 2008). Muchos de los efectos son mediados por su capacidad de regular distintas enzimas o rutas de señalización; así, modulan el metabolismo del ácido araquidónico, la cascada de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK), las rutas de la proteína quinasa (PK) C y de PKB/Akt, o el factor de transcripción factor nuclear (NF)- κ B (Del Rio, 2010).

Los flavonoides son compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura que consta de dos anillos de benceno unidos por una cadena de tres átomos de carbono formando un heterociclo oxigenado (C₆-C₃-C₆). El gran número de estos compuestos surge de las diversas combinaciones de múltiples metoxilo hidroxilo, y O-glucósido sustituyentes de grupo sobre la base benzo-pirona (C₆-C₃-C₆) básica benzo- γ -pirona (C₆-C₃-C₆) (Benavente-García, 1997). Los flavonoides se clasifican en seis clases principales, según la conexión entre los anillos B y C, el estado de oxidación y los grupos funcionales del anillo C: flavanoles, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonoles y antocianidinas (Nichols, 2010).

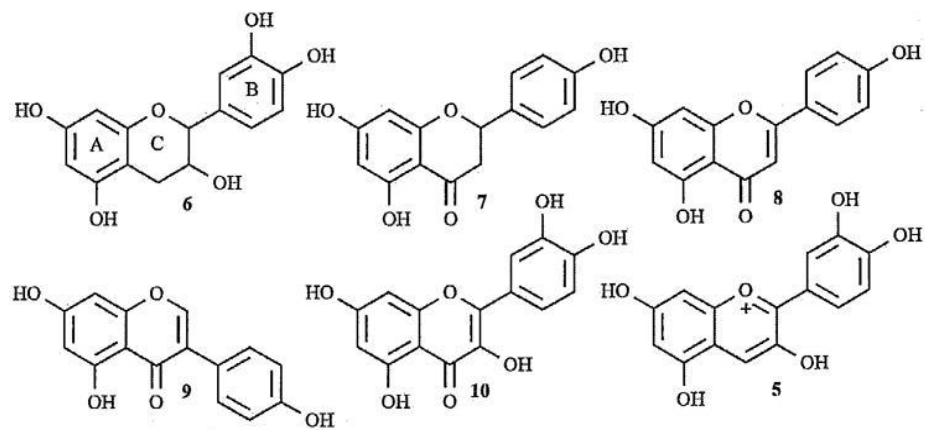


Fig. II-5. Estructura química de flavonol, (\pm)-catequina (6); flavanona, naringenina (7); flavona, Apigenina (8); isoflavona, genisteina (9); flavonol, quercetina (10); y antocianina y cianidina (5) (Welch, 2008).

Propiedades saludables de los flavonoides

76

Diversos estudios han encontrado asociación entre el consumo total de flavonoides, de algunos subgrupos o de flavonoides individuales y el riesgo de sufrir distintas enfermedades crónicas. Probablemente sea la relación inversa entre el consumo de flavonoides y el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares la mejor establecida. Así, el consumo de flavonoides, especialmente de flavonoles, ha demostrado reducir el riesgo de mortalidad y morbilidad por este tipo de patologías (Grassi, 2009).

Otros autores han encontrado evidencias de los efectos protectores de la ingesta de flavonoides en la dieta frente al cáncer, aunque estos resultados son todavía controvertidos. García-Closas y colaboradores (1999) demostraron una asociación inversa entre el consumo total de flavonoides, de quercetina o de kaempferol, y el riesgo de padecer cáncer de estómago, mientras que en otro estudio, la ingesta de catequinas se asoció con menor incidencia de cáncer rectal y del tracto digestivo alto (Arts, 2001). Las dietas ricas en quercetina o miricetina han demostrado proteger frente al cáncer de pulmón y de próstata, respectivamente, en hombres, y en ese mismo estudio, se encontró una tendencia a un menor riesgo de cáncer de mama en mujeres con alta ingesta de quercetina (Knekt, 2002). Varios trabajos

han encontrado que el consumo de isoflavonas previene el desarrollo de distintos cánceres, especialmente los relacionados con hormonas (Adlercreutz, 1995; Scalbert, 2005; Gates, 2009) mientras que los flavonoles y las flavonas, y mas concretamente, la Apigenina, protegen frente al cáncer de ovarios (Gates, 2007) y de mama (Patel, 2007). Sin embargo, otros estudios no encuentran ninguna relación entre el consumo de dietas ricas en estos compuestos y el cáncer (Wang, 2009).

Además existen numerosos trabajos experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo*, sobre los efectos de los flavonoides, que han demostrado ejercer numerosos efectos biológicos como eliminadores de radicales libres, antioxidantes, antimutagénicos, radio y fotoprotectores, antiinflamatorios, antivirales; disminuyen los niveles plasmáticos de colesterol LDL, inhiben la agregación plaquetaria, reducen la proliferación celular, bloquean el ciclo celular, inducen apoptosis, disminuyen el estrés oxidativo, aumentan la eficacia de enzimas detoxificantes, estimulan el sistema inmune y además, resultan poco tóxicos (Patel, 2007; Benavente García, 2008; Alcaraz, 2009).

En nuestro estudio hemos utilizado los siguientes compuestos fenólicos:

Apigenina

La Apigenina (4', 5, 7 trihidroxiflavona) es una flavona abundante en vegetales como el apio y perejil, en las flores de la manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y presente en numerosas plantas aromáticas



como la menta, la mejorana, el orégano, el tomillo, la salvia o el romero. También se encuentra en pequeñas cantidades en otros alimentos como las alcachofas, el vino tinto, la miel, las lechugas, el zumo de pomelo, los chiles, la cebolla roja, el nabo o el té verde (Manach, 2004; Usda, 2007).

Durante siglos, la Apigenina ha sido utilizada en la medicina tradicional y alternativa a través de plantas ricas en esta flavona. Así, la flor de la pasión se ha empleado para tratar el asma, el insomnio, la enfermedad de Parkinson, la neuralgia o el herpes zóster. La manzanilla, en distintas formulaciones, se ha usado para calmar la gastritis y la indigestión, o para reducir la inflamación cutánea y otros problemas dermatológicos (Patel, 2007).

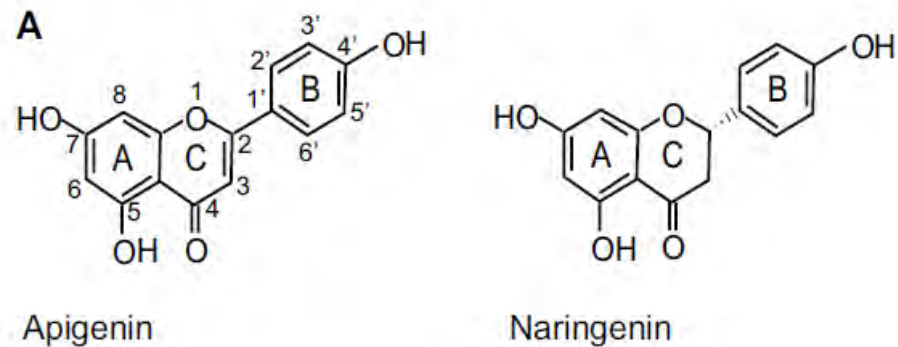


Fig. II-6. Representación esquemática de la estructura química de las flavonas Apigenina y naringenina (Arango, 2013)

La Apigenina deriva de la flavanona naringenina mediante la formación de un doble enlace en el anillo C de la estructura flavonoide. A pesar de su similar estructura, naringenina y Apigenina elicitán actividades biológicas significativamente diferentes (Vargo, 2006). Apigenina, no así naringenina, induce apoptosis en varias líneas celulares cancerosas (Choi, 2009) y tiene una potente actividad antiinflamatoria inhibiendo la ruta que desencadena la activación de NF- κ B (Nicholas, 2007).

Efecto antioxidante de la Apigenina

En el organismo, las especies reactivas de oxígeno (ROS; radicales hidroxilo y peroxilo, oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno) y de

nitrógeno (RNS; NO, NO₂) son generadas constantemente. El anión superóxido (O₂⁻), el radical hidroxilo (.OH) y el peroxilo (R-OO.) se forman secuencialmente a partir del oxígeno. Este mecanismo puede ser desencadenado por numerosos factores, entre ellos la radiación solar (Benavente-García, 2002; Alcaraz, 2009).

Las ROS oxidan distintas biomoléculas, entre ellas el DNA, las proteínas o los lípidos de membrana. En condiciones normales, las especies reactivas son rápidamente inactivadas por antioxidantes y enzimas, que mantienen un equilibrio; pero este equilibrio puede verse desbordado por la síntesis masiva de radicales libres en respuesta a distintos estímulos (Benavente-García, 2002; Yaar, 2007).

Además, algunos estudios han demostrado la capacidad de ciertos flavonoides de inhibir la actividad de la xantina oxidasa, enzima productora de radicales libres de oxígeno, disminuyendo de esta forma el daño oxidativo (García Lafuente, 2009). Por otra parte, la capacidad antioxidante de los flavonoides podría influir directamente en la expresión y modulación de algunos genes. Varios polifenoles han demostrado activar al factor de transcripción relacionado con NF-E2 p45 (Nrf) 2, permitiendo así la transcripción de genes inducidos por xenobióticos y antioxidantes, cuya expresión es un mecanismo muy importante de protección frente al estrés oxidativo (Crozier, 2009).

Apigenina y cáncer

Los efectos de la Apigenina se han demostrado en diferentes tipos de cánceres como el de mama (Choi, 2009), próstata (Shukla, 2005), pulmón (Li, 2007) y hematológicos (Budhraja, 2012). Los estudios han revelado que la Apigenina inhibe el crecimiento celular del cáncer de páncreas in vitro mediante la inducción de la detención del ciclo celular (Uijiki, 2006) e induce la apoptosis a través de diferentes vías de transducción de señalización celular, incluyendo el factor nuclear kB (NF-kB) (Helbig, 2003), p53 (Zheng, 2005), y PI3K/Akt (Way, 2004). La Apigenina también se ha utilizado para inhibir la activación transcripcional de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) a través del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) y el sitio de unión para reducir específicamente la expresión de HIF-1 α (Li, 2007).

Ácido Carnósico

El ácido Carnósico (CA), que se encuentra principalmente en *Rosmarinus officinalis*, es un diterpeno fenólico. Este compuesto es conocido como un antioxidante y su actividad in vitro es más alta que la

82

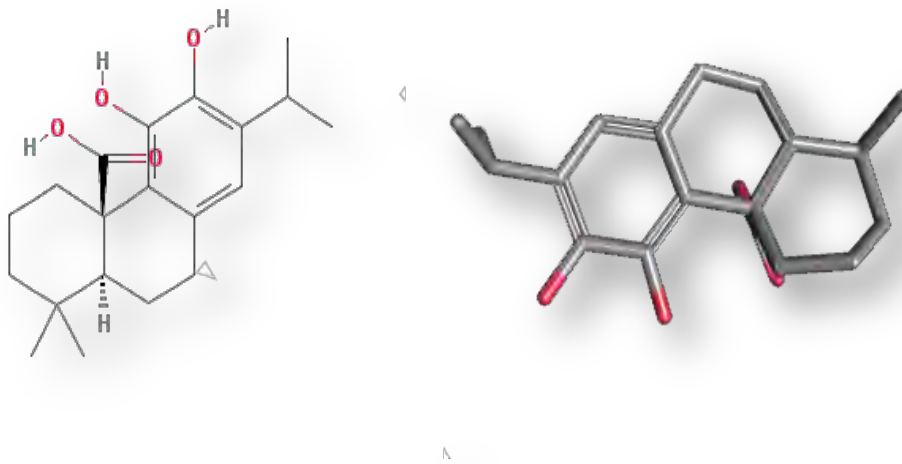


Fig.II-7. Estructura y conformación 3D del ácido Carnósico

de los antioxidantes sintéticos más utilizados, tales como BHT y BHA (Richheimer, 1996). La potente actividad antioxidante de CA, in vitro, está asociada con su capacidad para eliminar los radicales libres (Auroma, 1992).

Rosmarinus officinalis, la especia más popular de la familia Lamiaceae, es una fuente rica en ácido Carnósico (AC) y carnosol (COH). Se ha informado que el AC tiene diferentes actividades farmacológicas,

tales como la inhibición de la proliferación de las células de leucemia promielocítica humana HL-60 y U937 (Danilenko, 2003) así como propiedades antiinflamatorias, al reducir la expresión de



moléculas de adhesión inducida por citoquinas, bloquear la adherencia de los monocitos a las células endoteliales, (Yu, 2009) y evitar la migración de células musculares lisas aórticas humanas mediante la supresión de la expresión de MMP (Yu, 2008). También se ha demostrado la acción antitumoral de la AC en tres líneas humanas de cáncer de colon con diferentes antecedentes genéticos: Caco-2 (p53m), LoVo (p53wt) y HT29 (p53wt). Se encontró que el CA reduce la viabilidad celular mediante la inducción de la apoptosis en la línea celular Caco-2, e inhibe la capacidad de la migración de células, probablemente debido a la inhibición de la actividad de la proteasas uPA y MMP-9. Además, CA inhibe la COX-2, de mRNA y los niveles de proteínas (Barni, 2012).

Ácido Rosmarínico.

El ácido Rosmarínico (1-carboxi-2-(2,4-dihidroxifenil) éster etílico

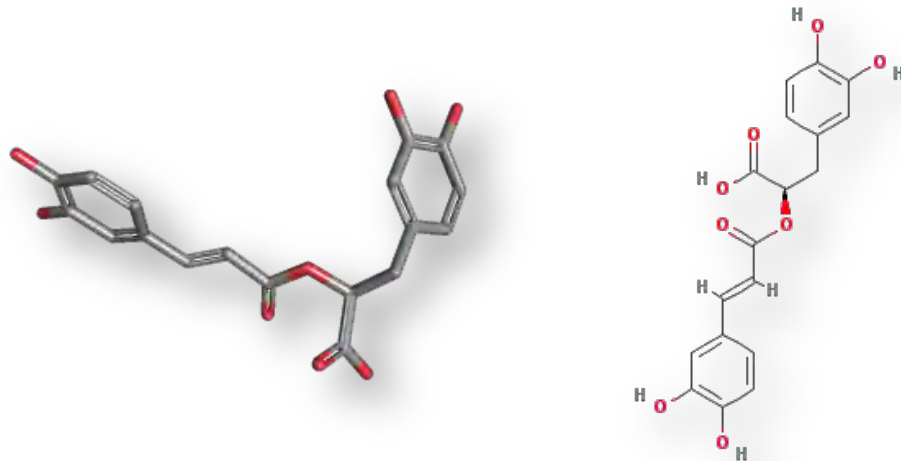


Fig.II-8. Estructura química y conformación 3D del ácido Rosmarínico.



del ácido trans-cafeico, se encuentra comúnmente en especies del Boraginaceae y la Nepetoideae subfamilia de la Lamiaceae, sobre todo, *Rosmarinus officinalis* L. (Del Baño, 2003).

El ácido Rosmarínico (AR) posee diversas actividades

biológicas: antiviral, antibacteriana, antiinflamatorias y antioxidante. La

presencia de AR en plantas medicinales, hierbas y especias tiene efectos beneficiosos y saludables. En las plantas, AR se supone que contribuye a la defensa de las mismas. Extractos de plantas que contienen AR tienen un excelente potencial como antioxidantes para la preservación de alimentos (Frankel, 1996). El efecto farmacológico del AR ha sido demostrado actuando a través de la inhibición de varios procesos inflamatorios dependientes del complemento. Por lo tanto, tiene un gran potencial como agente terapéutico y en el control de las enfermedades de la activación del complemento (Peake, 1991). También se sabe que tiene efectos tales como la captación de radicales libres de oxígeno (Nuytinck, 1986) y la inhibición de la elastasa.

Estudios más recientes confirman que ésteres del ácido cafeico tales como AR muestran alta actividad específica antioxidante, retardo del agotamiento de la vitamina E, disminución de la producción de lisofosfaditilcolina y previenen la oxidación de LDL, compatible con su actividad anti-inflamatoria y el papel anti-ateroesclerótica en condiciones fisiopatológicas (Cartron, 2001). AR también inhibe la proliferación celular inducida por citoquinas (Makino, 2000) y suprime la sinovitis en un modelo murino de artritis inflamatoria inducida por colágeno (Youn, 2003). Asimismo, la adición de extracto de *Prunella vulgaris* y su principal componente, ácido Rosmarínico, redujo

la producción de ROS y la disminución de IL-6 libre en cultivos de células HaCaT expuestos a radiación UVB (Vostálová, 2010).

Objetivos

III. Objetivos

- 1º.** Desarrollar un modelo de fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis mediante exposición crónica a RUV en ratones desnudos SKH1.

- 2º.** Estudiar los efectos quimiopreventivos de los flavonoides Apigenina, y los ácidos Carnósico y Rosmarínico añadidos sobre el modelo anterior a través de estudio clínico patológico.

- 3º.** Determinar la tasa de proliferación celular de los tumores desarrollados por los animales, mediante la inmunotinción con el marcador PCNA

Material y métodos

IV. Material y métodos

Animales



Fig. IV-1. Ratón SKH1 hembra

Los animales utilizados fueron ratones SKH-1/CRL, hembras. Son animales eutímicos e inmunocompetentes procedentes, del Servicio de Animales de Laboratorio (SAI; nº REGA ES300305440012) de la

Universidad de Murcia, nacidas el día 15 de diciembre de 2009, por lo que a la fecha del inicio del tratamiento (16/01/2010), tenían 33 días de vida. El peso de los animales se muestra a continuación:

96

Grupo experimental	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Grupo I (Control)	10	17,90	20,60	19,19	0,88
Grupo II (CAR)	10	18,00	21,90	19,72	1,09
Grupo III (AK)	10	18,09	22,00	20,00	1,00
Grupo IV (ROS)	10	19,00	21,50	20,00	1,10

Tabla IV-1. Peso de los animales al inicio del experimento.

Los animales fueron mantenidos y utilizados siguiendo las disposiciones del REAL DECRETO 1201/2005 de 10 de octubre sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Eran pesados semanalmente, con el fin de ajustar la cantidad de compuestos polifenólicos a ensayar y conseguir la concentración efectiva en plasma.

Además establecimos un protocolo de supervisión del bienestar de los animales, siguiendo las *Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research* (Workman, 2010), donde se observaban y valoraban los siguientes parámetros:

1. El no comer ni beber durante un período de 24 a 48 h, dando como resultado emaciación o deshidratación.
2. Pérdida consistente o rápida de peso corporal que alcanzaba el 20 % en cualquier momento o el 15% si se mantenía durante 72 horas, en comparación con el peso antes del tratamiento de ratones adultos o los controles no tratados.
3. Hipotermia persistente.
4. Sangrado o descarga mucopurulenta de cualquier orificio.
5. Respiración trabajosa, sobre todo si se acompañaba de secreción nasal y/o cianosis.
6. Ganglios linfáticos o bazo agrandados.
7. Parálisis de las extremidades posteriores o debilidad.
8. Anemia manifestada por síntomas tales como mucosas pálidas o medidas hematológicas.
9. Distensión abdominal importante o ascitis que superara el 10% del peso corporal de los controles no tratados de la misma edad.
10. Incontinencia o diarrea durante un período de 48 h.
11. Tumores que interfirieran en la locomoción o causaran vocalizaciones o comportamiento anormales.

Se estableció como criterio de punto final, la presentación de cualquiera de los síntomas descritos anteriormente.

Lámpara

El modelo de lámpara utilizado para la irradiación UVA de los animales fue *Philips Type HB 554/01/A con 8 tubos Philips Performance S 100W*, que emite en un espectro de 220 a 425 nm y un pico máximo de 364 nm (69.1 W/m^2 UVA y $1,6 \text{ W/m}^2$ UVB). (Nielsen, 2008)

98



Fig. IV-2. Detalle de la cama solar Philips Type HB 554/01/A.

Compuestos polifenólicos

Utilizamos los siguientes compuestos:

- Ácido Carnósico (C₂₀H₂₈O₄).
- Apigenina potásica (C₁₅H₁₀O₅).
- Ácido Rosmarínico (C₁₈H₁₆O₈).

Fueron proporcionados por Furfural Español, S.A. (Murcia). El extracto concentrado de ácido Carnósico (80% de pureza HPLC) se disolvía en etanol absoluto; así mismo la Apigenina se disolvió en agua; ambos se añadieron a una molienda de pellets de la dieta estándar que se utiliza para la alimentación de roedores en el SAL de la Universidad de Murcia. Posteriormente se preparaba en una amasadora eléctrica y se formaban los pellets, que eran secados en estufa a 80 ° C durante 24 horas. El ácido Rosmarínico, procedente de extracto de melisa se disolvió en agua y se añadió al agua de bebida.

Métodos

Los animales fueron divididos en 4 grupos de 10 ratonas cada uno:

- Grupo I (control). Alimentación dieta estándar + RUV.
- Grupo II. Adición a la dieta estándar de ácido Carnósico + RUV.
- Grupo III. Adición a la dieta estándar de Apigenina potásica + RUV.
- Grupo IV. Adición a la dieta estándar de ácido Rosmarínico + RUV.

Los tres agentes fueron administrados a la dosis de 1 mg/animal/día.

Procedimiento experimental.

Los animales permanecieron en su alojamiento habitual (miniaisladores de metacrilato con espacio para pienso y botella de agua, colocados en rack con presión positiva) con agua y comida *ad libitum* durante 10 días, transcurridos los cuales fueron sometidos a irradiación.



Fig. IV-3. Detalle de los microaisladores donde se mantenían los animales.

Para las sesiones de exposición a la radiación UVA, eran colocados en jaulas de PVC con separadores individuales para cada ratón y una cubierta de celosía metálica. A continuación eran situados bajo la lámpara de luz UV, a una distancia foco/animal de 20 cm. Las sesiones de irradiación se realizaron tres veces por semana durante 60 minutos mientras duró el experimento, que hicieron un total de 80 sesiones. La energía suministrada por sesión fue de $21,1 \text{ J/cm}^2$, por lo que al final del ensayo, la energía total proporcionada a cada animal fue de 1.688 J/cm^2 .



Fig. IV-4 Detalle de los separadores donde se colocaban los animales para las sesiones RUV.

Análisis macroscópico.

Los animales fueron pesados semanalmente, y durante esta sesión se observaba con detalle su piel, buscando cambios en los tejidos que indicaran la presencia de lesiones.

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

1. Semana en la que al menos la mitad de los animales del grupo presentaron la primera lesión (DT 50).
2. Área total lesionada.
3. Tamaño medio de las lesiones.
4. Incidencia de lesiones neoplásicas malignas.

Para la primera variable, 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 el criterio para la determinación de la presencia de lesión, el que esta tuviera las siguientes medidas: área mayor o igual a 1 mm² y perímetro mayor o igual 3,5 mm.

Para la cuantificación de la segunda y tercera 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.



Fig. IV-5. Animal fotografiado junto a papel milimetrado.

Método anatomopatológico.

Tras acabar los experimentos, los animales fueron sacrificados mediante exanguinación total por punción cardiaca, previamente anestesiados con Isoflurano, realizando la necropsia. Extirpamos la piel del lomo, así como vísceras (pulmones, hígado y riñones). Todas las muestras cutáneas y viscerales fueron fijadas en formol neutro tamponado al 10 %, al menos durante 48 horas y posteriormente incluidas en parafina por el método habitual, para ser seccionadas a 5 μ teñidas con H.E.



Fig IV-6. Centro de inclusión en parafina y procesador histológico.

Las muestras teñidas con HE fueron observadas y valoradas por dos patólogos experimentados con microscopio Leica 0000, con el objeto de detectar las características propias de los carcinomas de células escamosas o de células basales, anotando la presencia o ausencia de las citadas lesiones.



Fig IV-7. Microtomo y microscopio

Método inmunohistoquímico.

Las muestras se remitieron al Servei d'experimentación animal del Parc Científic de Barcelona, con el fin de realizar el estudio inmunohistoquímico. Como control positivo se utilizó piel de ratones de la misma cepa no irradiados.

108

Técnica inmunohistoquímica

Para la realización de la técnica se utilizó una muestra de cada animal.

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 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 primario monoclonal contra PCNA (Dako) a dilución 1:200 durante toda la noche a 4°C. Entonces, se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario Goat anti-mouse biotinado (Dako) durante 1h a temperatura ambiente, y finalmente se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Cultek) a dilución 1:100

durante 1h más a temperatura ambiente. El revelado de la inmunotinción se hizo con diaminobenzidina (Sigma-Aldrich) durante 3,5 minutos, y las muestras contrastaron con Hematoxilina de Mayers.

Evaluación e interpretación de los resultados

Todas las preparaciones fueron escaneadas para ser estudiadas mediante análisis de imagen (Servicio de Análisis de Imagen del SAI de la UMU). En la interpretación de los patrones de inmunotinción con PCNA, se consideró positiva la tinción nuclear. Para obtener el grado de proliferación, se valoró el número de células fuertemente positivas en 3 campos con magnificación de 40x de las áreas con mayor intensidad de tinción o “hot spots” del frente de invasión tumoral en el caso de los carcinomas invasores y de las capas basales en el caso de los carcinomas in-situ.

Método estadístico

Se realizó en colaboración con la Cátedra de Bioestadística de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, utilizando el software ANOVA SPSS® v19.0 (SPSS® Inc., Chicago, USA) mediante el que efectuamos los siguientes procedimientos estadísticos:

110

En primer lugar realizamos un análisis exploratorio con el fin de contrastar las hipótesis de normalidad y homocedasticidad.

En cuanto a la hipótesis de normalidad, calculamos el contraste estadístico Shapiro Wilk (indicado para muestras $n < 30$). Como prueba de homegenidad de varizanzas, utilizamos el contraste estadístico de Levene.

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, mediana y los valores máximos y mínimos.

En segundo lugar, para determinar el grado de asociación estadística entre las variables de estudio, se realizó el análisis de varianza de un factor, complementado 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 en la variable área lesionada. Consideramos como estadísticamente significativo los valores $p < 0.05$.

Resultados.

V. Resultados

Estudio macroscópico. Características clínico macroscópicas

115

Piel normal



Fig V-1. Ratón SKH1 sin exposición a RUV



Fig V-2. Detalle de la piel del lomo de los ratones sin exposición a RUV.

A lo largo del experimento todos los animales sometidos a la exposición de las radiaciones ultravioleta presentaron múltiples lesiones, diferenciándose entre los animales de los diferentes grupos por el tiempo de presentación, extensión, intensidad, etc. cuyas características más relevantes consistían en:

Eritema

Estaba caracterizado por zonas extensas de enrojecimiento que afectaban al lomo y a la porción posterior de la cabeza y el cuello, de distribución difusa. Se presentaba a partir de la primera sesión de exposición a las radiaciones UV, y en el transcurso del experimento se hacía permanente, mostrando un patrón reticulado, variando la coloración a rojo-violácea. En las últimas fases del estudio mostraba aspecto telangiectásico.



Fig V-3. Eritema citáneo.



Fig V-4. Piel del lomo afectada por eritema. Sesión 20.

Patrón geométrico cutáneo

El patrón geométrico característico de la piel, en estos animales, se iba haciendo de modo similar, más ostensible con el aumento del número de exposiciones a las radiaciones.



Fig V-5. Acusado patrón geométrico en la zona dorsal de ratón SKH1 del grupo control.

Arrugas

A partir de la 4^a-6^a semana de la exposición se iban haciendo patentes las arrugas cutáneas, que en principio eran longitudinales y se presentaban a lo largo de todo el dorso; conforme avanzaba el número de exposiciones se hacían más irregulares acompañándose de áreas cutáneas de engrosamiento irregular. También se disponían de forma radial alrededor de las lesiones ulceradas y tumorales.

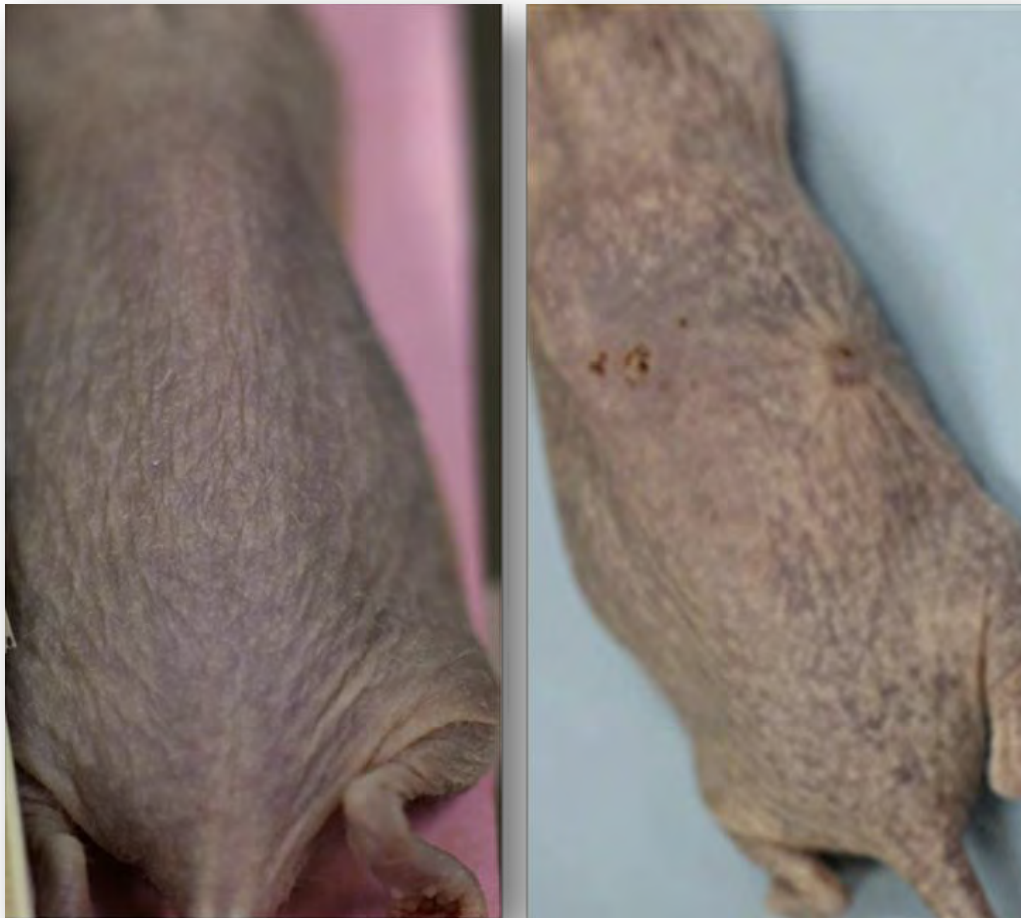


Fig V-6. Arrugas muy pronunciadas.

Engrosamiento nodular cutáneo

Era un fenómeno de presentación progresiva, de forma que a partir de las 50-60 sesiones eran de observación constante y difusa en el dorso de los animales controles.



Fig V-7. Patrón nodular cutáneo

Lesiones eritemato-escamosas

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

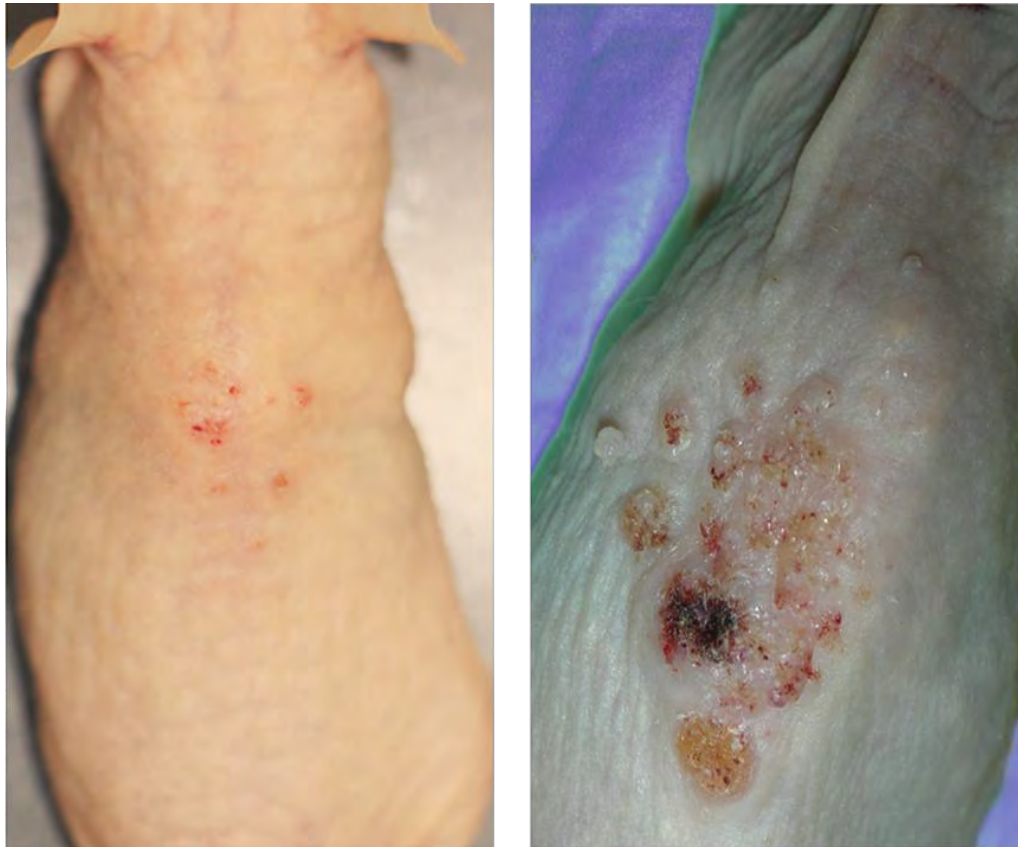


FIG V-8. LESIONES ERITEMATO-ESCAMOSAS.

Lesiones ulceradas

Generalmente de bordes irregulares, a veces engrosados, de lenta evolución, unas veces en el seno de las áreas eritematosas y en otras áreas se disponían de forma individualizada.



Fig V-9. *Lesiones ulceradas.*

Lesiones nodulares vegetantes

Se solían presentar a partir de 60 sesiones con mayor frecuencia y generalmente múltiples. La mayoría de ellas se encontraban en relación con las zonas de engrosamiento queratósico mientras que en otras ocasiones se presentaban de forma aislada. Las de mayor volumen se solían ulcerar e incluso presentar áreas deprimidas centrales de aspecto crateriforme con costras queratósicas

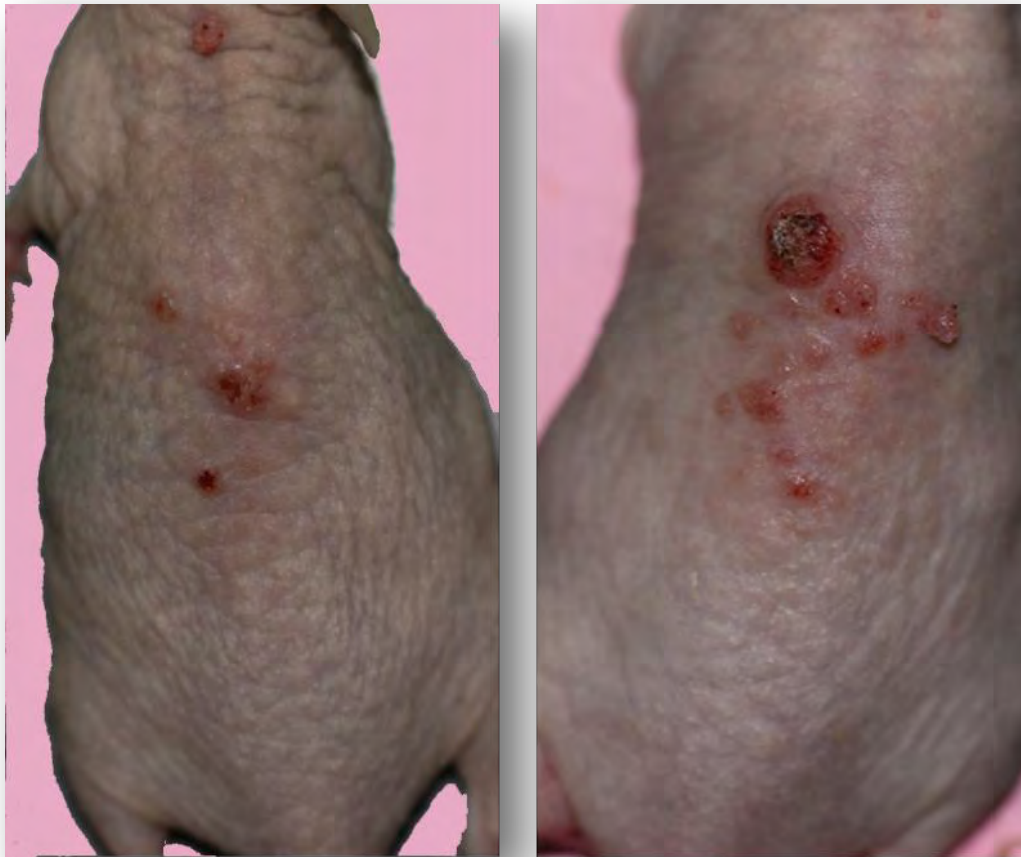


Fig V-10. Lesiones nodulares vegetantes.



Fig V-11. Lesiones nodulares vegetantes.

Lesiones quísticas

Con alguna frecuencia y en algunos animales se observaban lesiones quísticas de aspecto fluctuante, de diámetro variable.

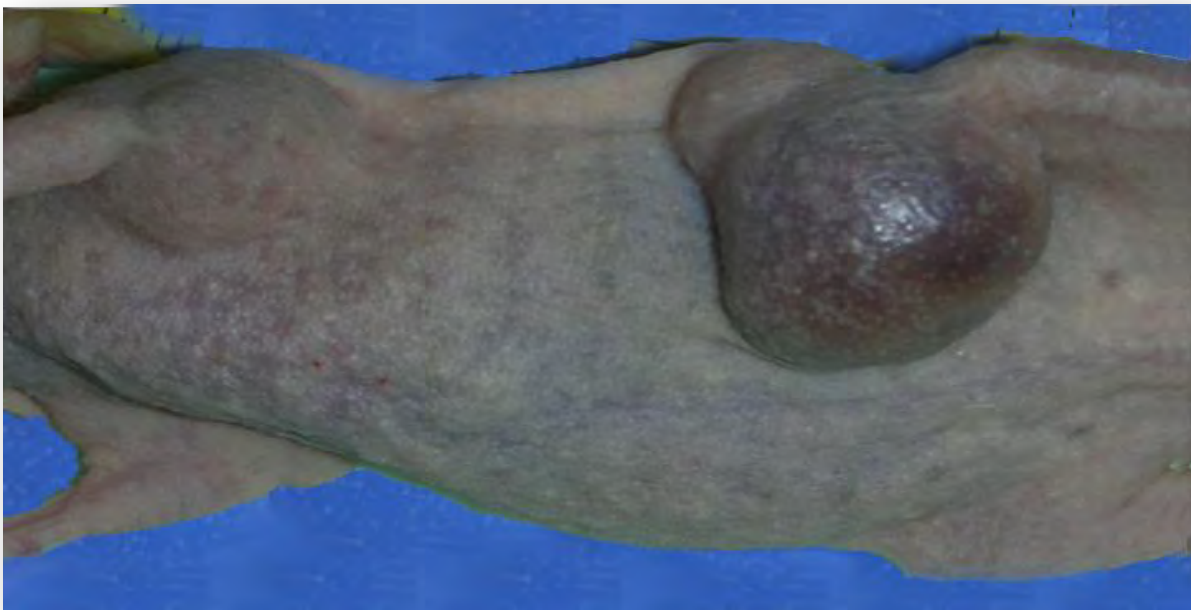


Fig V-12. . Lesiones nodular-quísticas en zonas inguinales y axilares de un animal perteneciente al grupo III.

Estudio microscópico

Epidermis normal

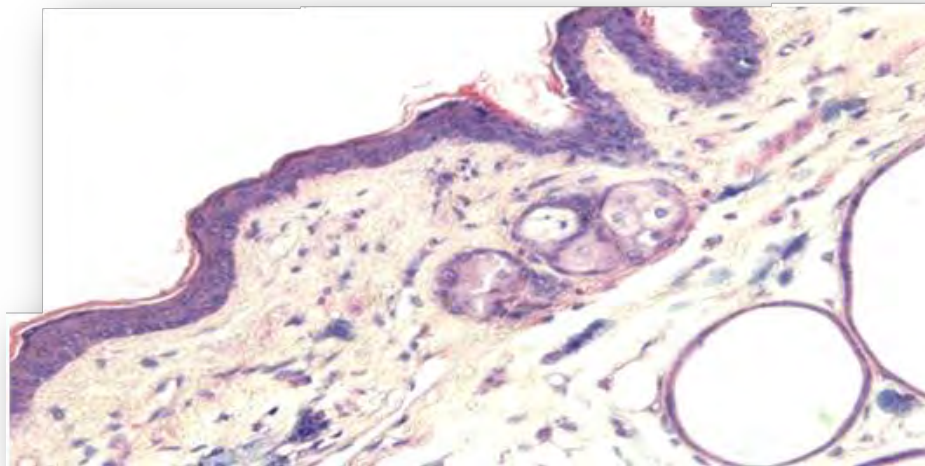
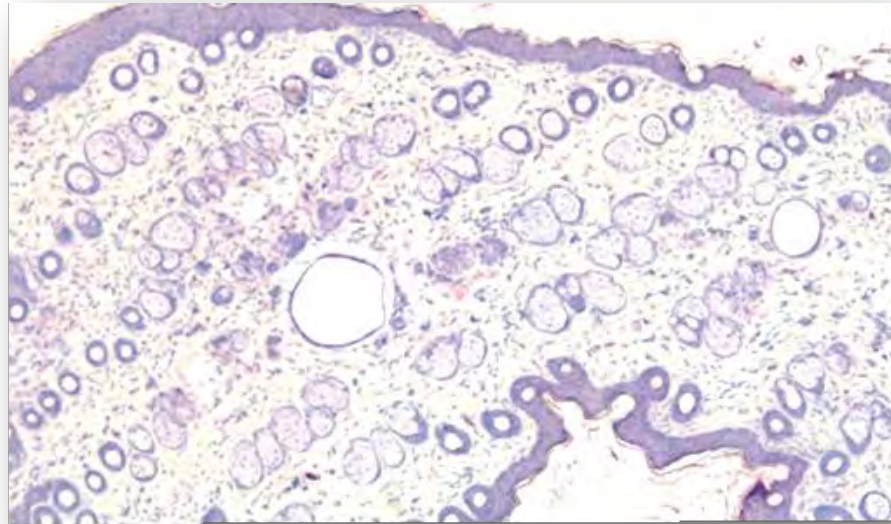


Fig V-13. Piel de características normales, constituida por 4 a 8 capas de queratinocitos y capa córnea dermo papilar con numerosas glándulas sebáceas y folículos atrófico-quísticos. (HE. 125 X).

Epidermis de los animales tratados con RUV

En general presentaba los siguientes fenómenos

128

Atrofia:

De distinto grado, y generalmente en áreas alternando con otras en que la epidermis mostraba espesor normal o incluso con zonas de acantosis irregular. Se caracterizaba por disminución del espesor de la epidermis debido al aplanamiento de los queratinocitos así como a la disminución en el número de capas.

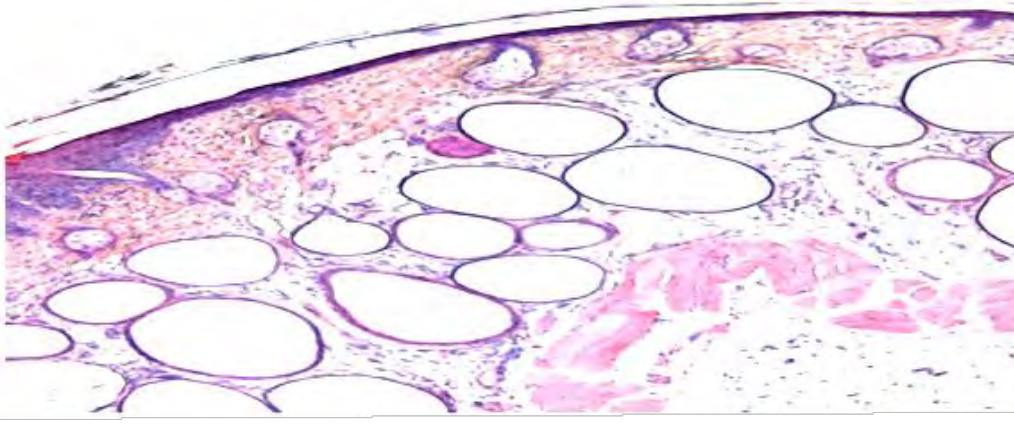


Fig V-14. Atrofia.

Hiperplasia de células basales

Fenómeno frecuentemente observado en las áreas cutáneas próximas a las zonas con otras alteraciones (displasia, carcinoma, etc.) aunque a veces se observaban como focos aislados. Estaban constituidos por la presencia de varias hileras (entre 3 y 8) de queratinocitos basales, de morfología poligonal con núcleos voluminosos y citoplasmascitoplasmas escasos. Los ejes mayores de los núcleos se situaban perpendicularmente a la membrana basal epidérmica. Los nucléolos eran voluminosos y en ocasiones se observaba alguna figura de mitosis

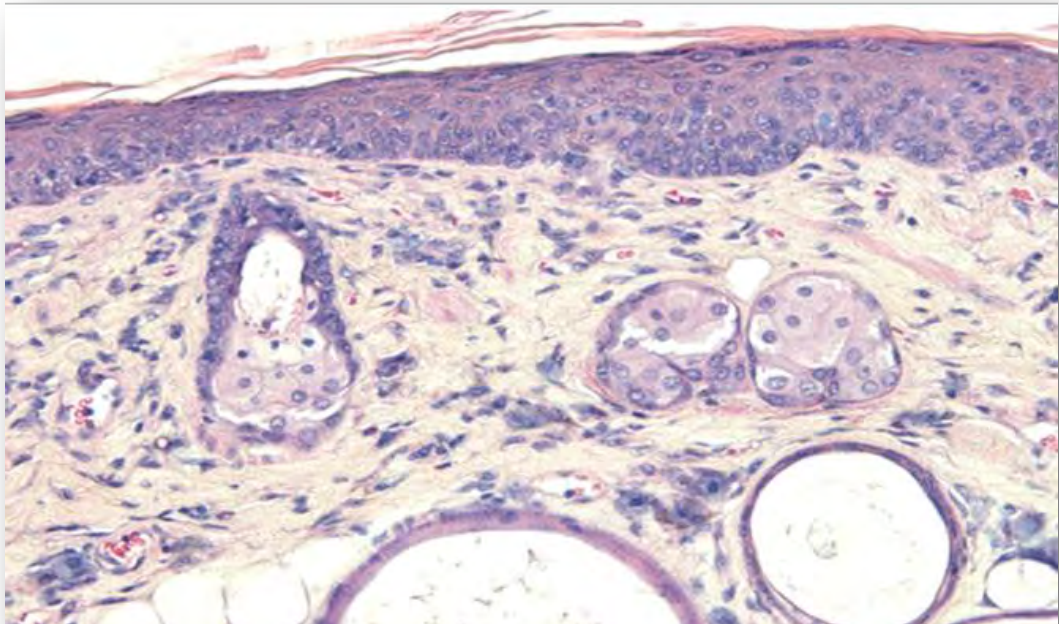


Fig V-15. Hiperplasia de células basales.

Acantosis acompañada de papilomatosis

130

Caracterizada 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.

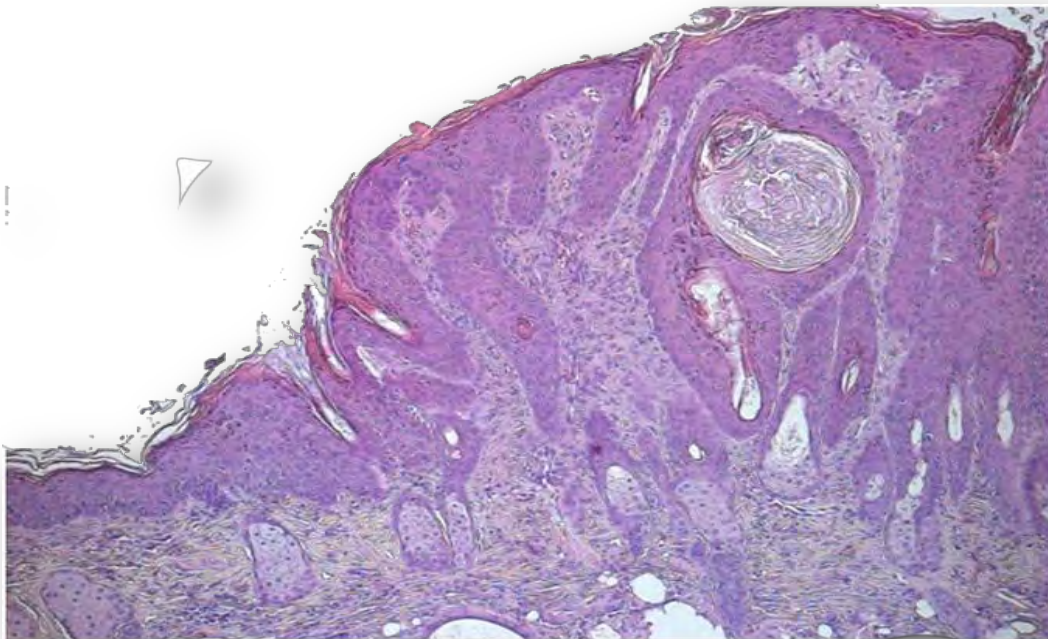


Fig V-16. Acantosis con papilomatosis.

Hiperqueratosis

Constituidas por varias hileras de células totalmente queratinizadas y anucleadas con patrón denso en hojaldre

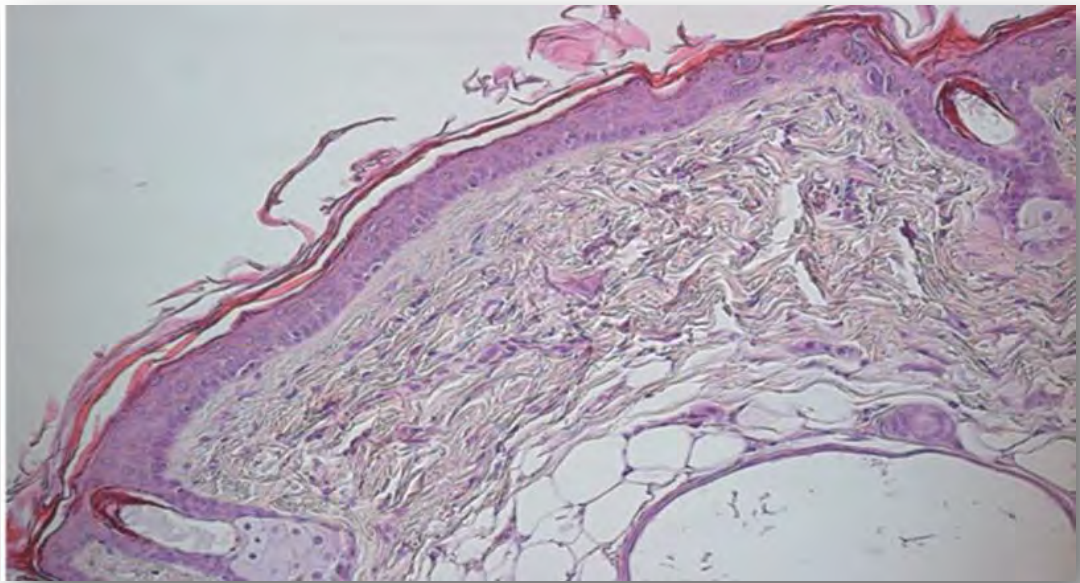


Fig V-17. Hiperqueratosis.

Paraqueratosis. Hipergranulosis

Presencia de núcleos en las células queratinizadas de los estratos epidérmicos más superficiales.

Disqueratosis

Caracterizada por la queratinización de queratinocitos de forma individualizada, preferentemente de los del estrato espinoso de Malpighio

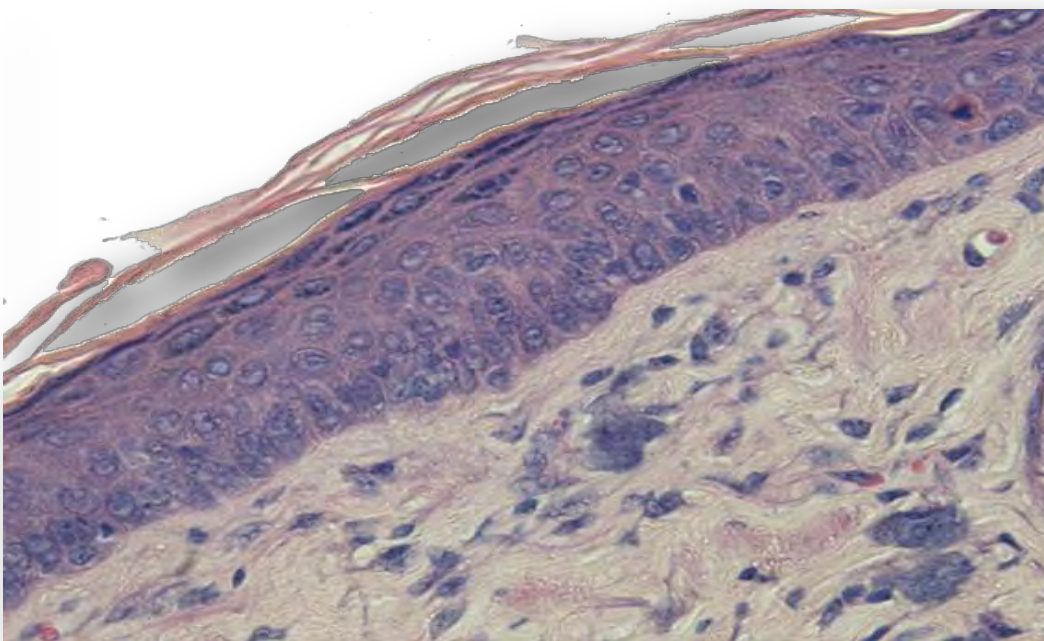


Fig V-18. Disqueratosis.

Displasia

Lesiones muy frecuentemente observadas, tanto de forma aislada como acompañadas de áreas cutáneas que mostraban frecuentes fenómenos descritos previamente, así como en la vecindad de las lesiones neoplásicas malignas.

Respecto al grado de intensidad, predominaban las de grado I, siendo las menos frecuentes las de grado III.

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 del epitelio, a la mitad o más de dos tercios de la misma, respectivamente.

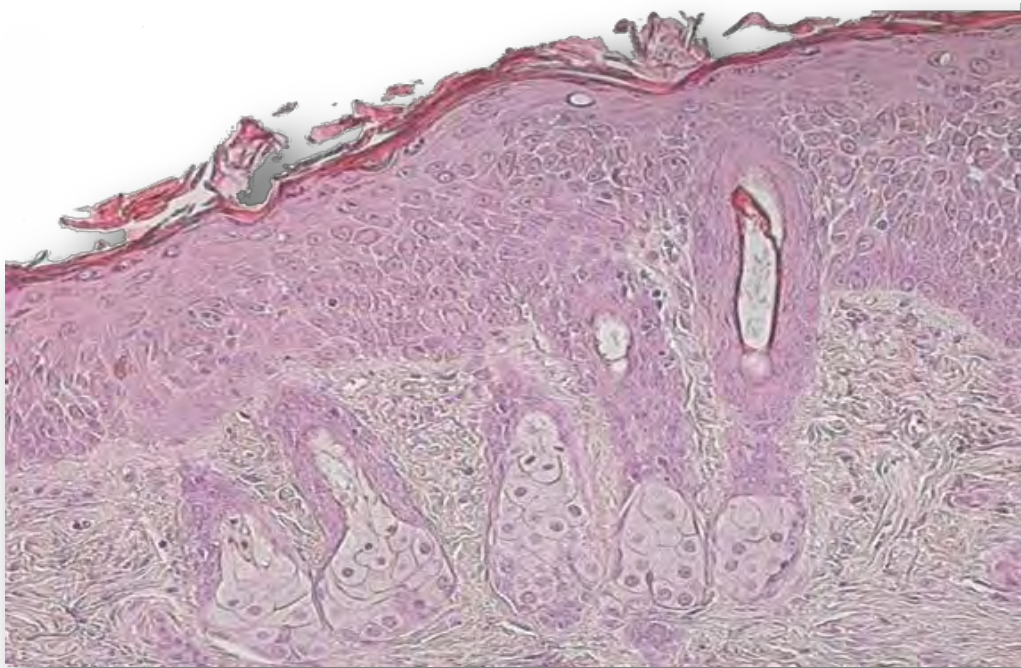


Fig V-19. Displasia leve moderada.

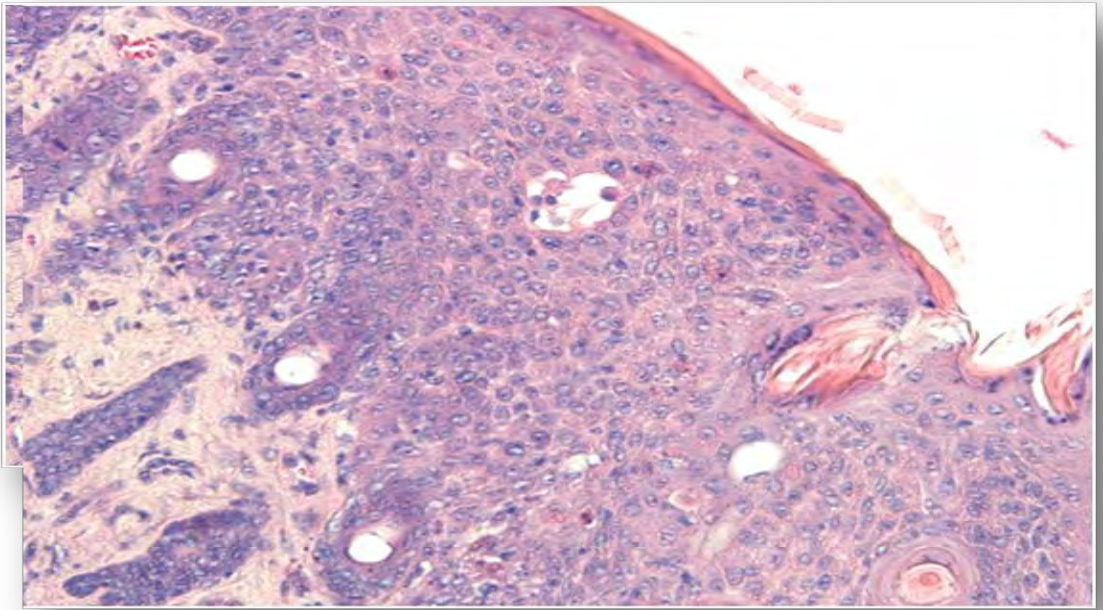


Fig V-20. Displasia

Carcinoma in situ

Caracterizado 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

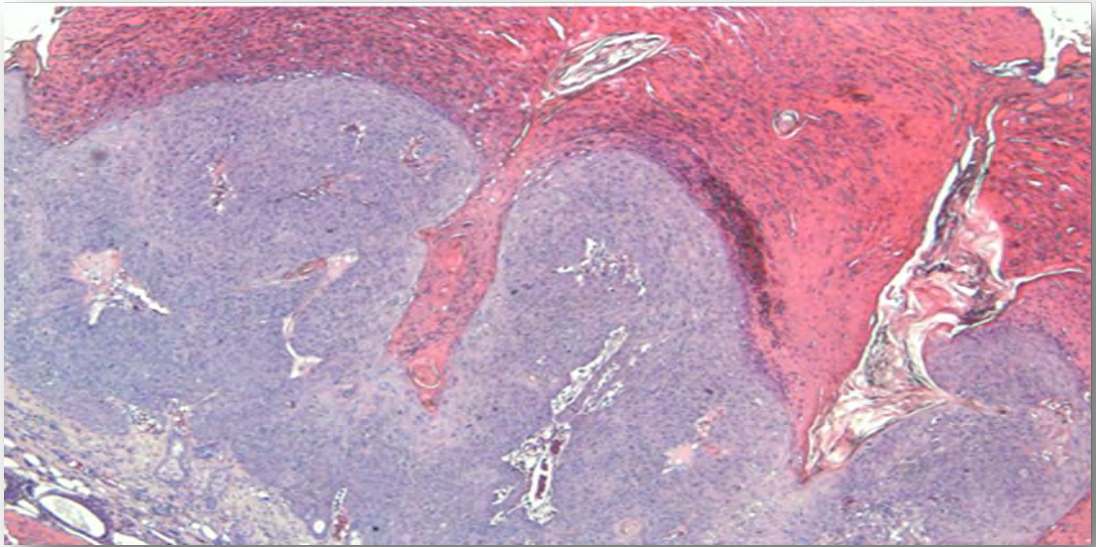
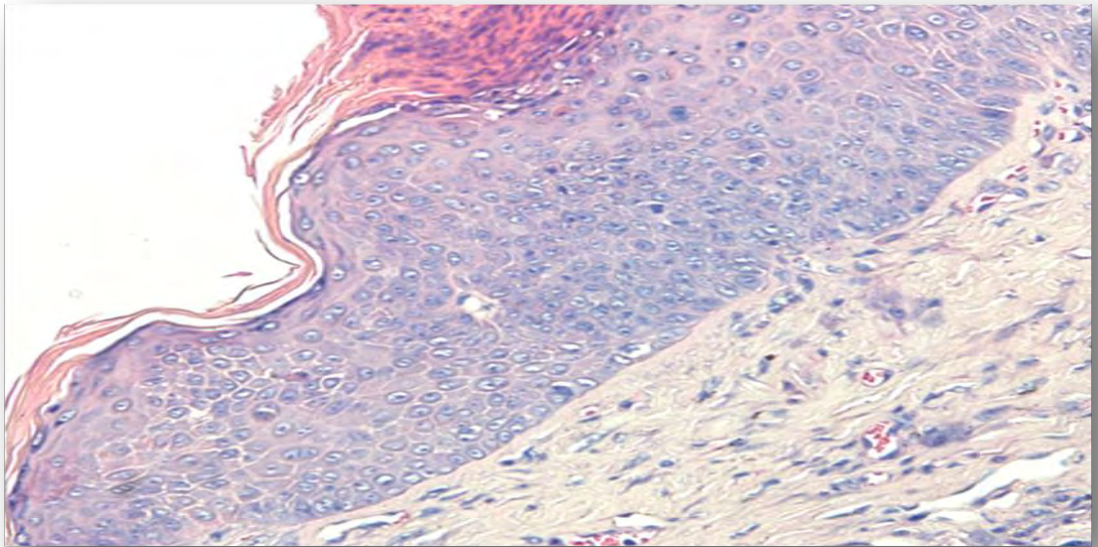


Fig V-21. Carcinoma in situ

Carcinoma microinvasor

En el que además del componente epidérmico de características similares a las del carcinoma "in situ" antes descrito, se caracterizaba porque en diversas zonas existían cordones epiteliales irregulares con atipias celulares marcadas que infiltran sobrepasando la membrana basal e infiltrando la dermis papilar, en la que se observan pequeños focos epiteliales aislados de similar morfología.

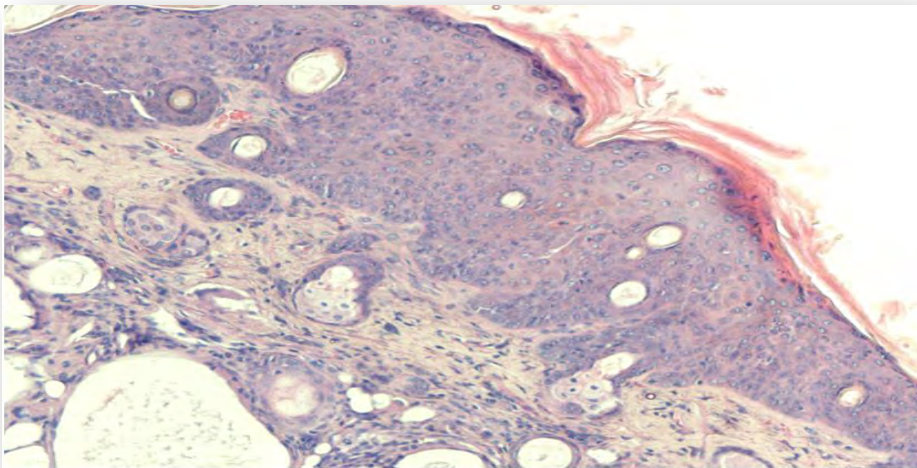


Fig V-22. Carcinoma microinvasor.

Carcinoma 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.

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 eran escasas las mitosis monstruosas. Las células se disponen en cordones amplios e irregulares, que desde la epidermis infiltran la dermis subyacente y con frecuencia el músculo esquelético subyacente

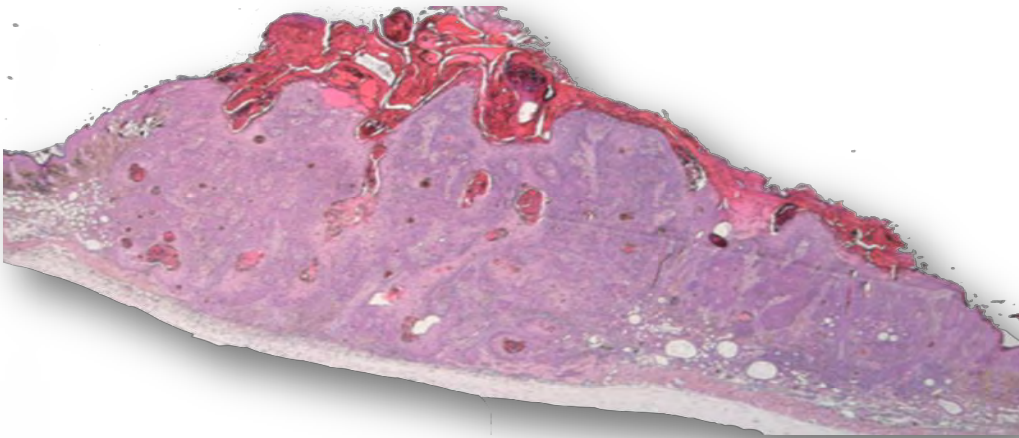


Fig V-24. Carcinoma de células escamosas.

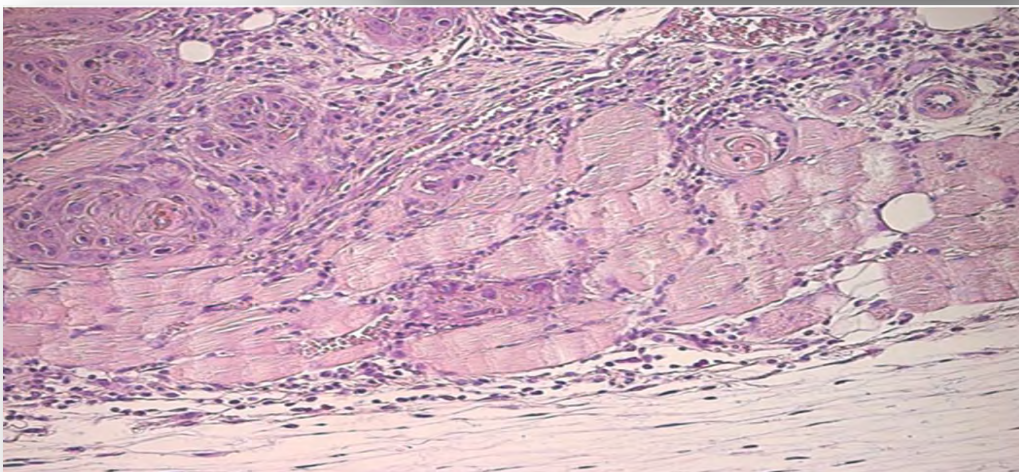
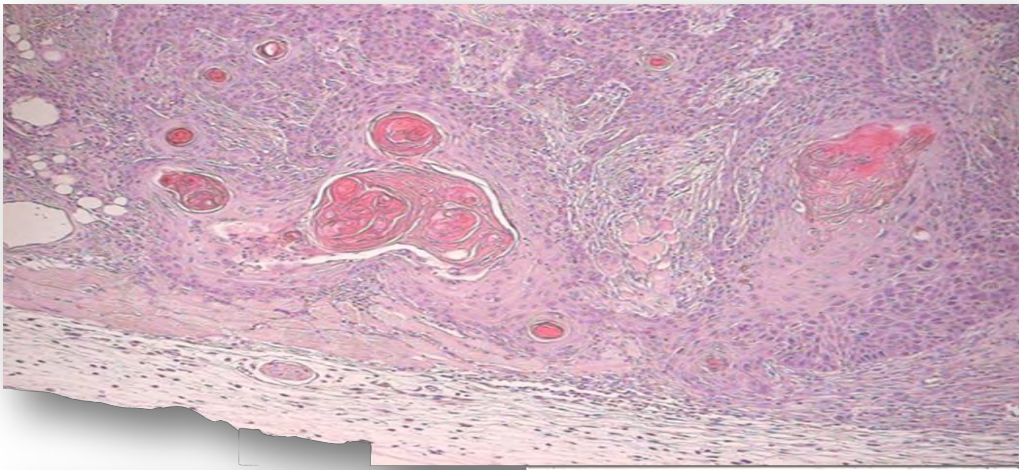


Fig V-23. Detalle de carcinoma de células escamosas (HE, 150 X).

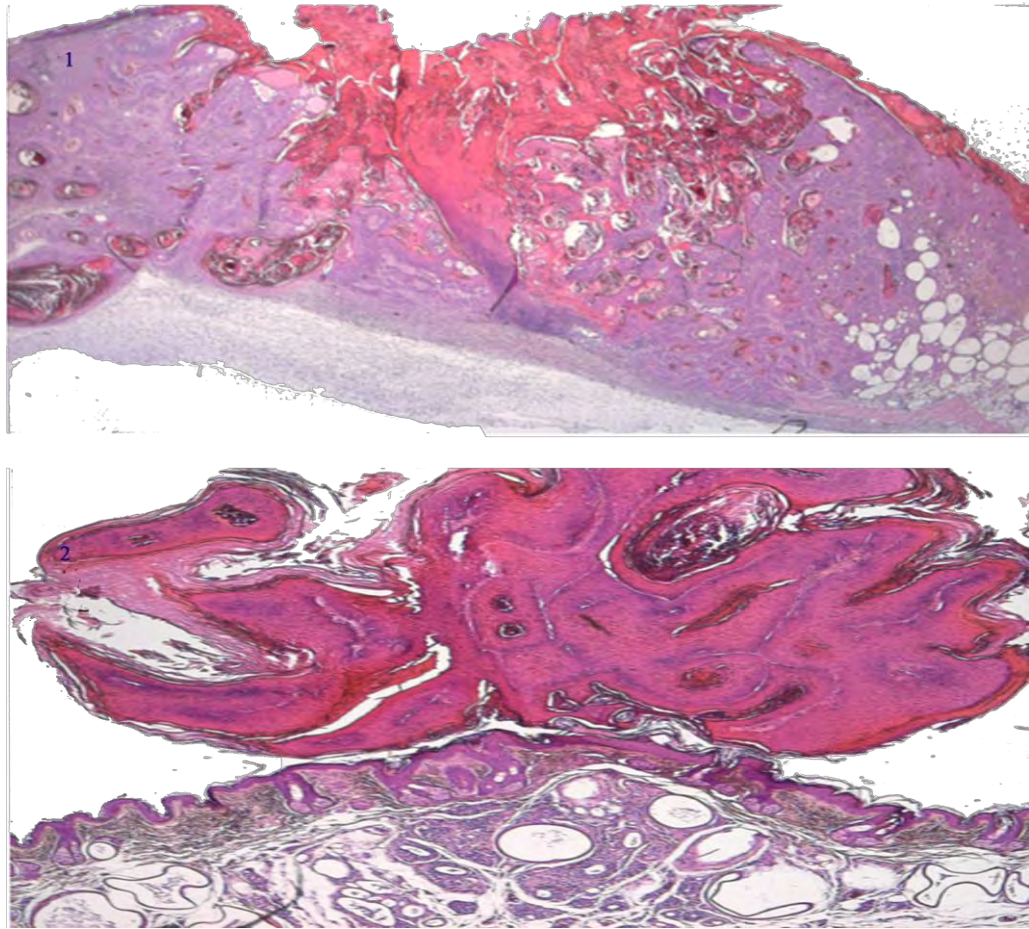


Fig V-25. Carcinoma de células escamosas y tumor vegetante.

Dermis

En la dermis era una observación constante la expansión de la dermis papilar por aumento tanto de los capilares sanguíneos como de la sustancia intercelular.

En la dermis reticular destacan los fenómenos de desorganización de la estructura general como de la disposición del

entramado de las fibras colágenas y elásticas, distinguiéndose tres grados de disposición:

- I. En el que predominan las fibras mal organizadas dispuestas preferentemente de forma individualizadas;
- II. En el que las fibras con estas características alternaban con zonas en que se disponían en acúmulos irregulares y compactos de elastina, ligeramente basófilos; y
- III. En el que observamos un predominio marcado de los acúmulos compactos de elastina.

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

Evolución de las lesiones.

Macroscópicamente

Grupo I (control): Los primeros signos observados en los animales tratados exclusivamente con RUV, correspondió con la presentación de eritema difuso, predominantemente en toda la zona del lomo, cabeza y orejas, que se presentaba desde la primera sesión y que durante las primeras 3 o 4 semanas era de carácter pasajero, pues desaparecía entre 30 y 60 minutos tras acabar la exposición a las radiaciones. A partir de la 5ª semana se hacía permanente y mostraba un aspecto reticular telangiectásico característico.

A partir de ese periodo (5 o 6 semanas) 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.

A continuación, se presentaron las arrugas cutáneas que eran prominentes a partir de la sexta semana; en principio eran de disposición longitudinal en el dorso de los animales, alternado con otras zonas cutáneas de engrosamiento irregular. Estas lesiones se mantenían durante todo el experimento.

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 estaban fijados a planos profundos generalmente.

A partir de 60 sesiones, era muy frecuente la presencia de lesiones tumorales nodulares, generalmente múltiples con rápida tendencia a la ulceración. Con menos frecuencia las lesiones tumorales adoptaban un aspecto verrucoso o papiloforme.

✿ En la semana 60, al menos la mitad de los animales del grupo (n=10), presentaba la primera lesión (DT50=60), objetivada según los criterios que establecimos anteriormente.

✿ Asimismo, la superficie media ocupada por lesiones, fue de 190,429 mm².

✿ De la misma forma, el tamaño medio de las lesiones en este grupo correspondió a 62,649 mm².

Microscópicamente:

Durante las primeras semanas casi las únicas observaciones microscópicas correspondían con ensanchamiento de la dermis papilar por aumento de la red capilar que se caracterizaba por la presencia de numerosos vasos capilares dilatados y congestivos acompañado de frecuente edema intersticial. Conforme aumentaba el número de exposiciones a la RUV, los vasos sanguíneos presentaban aspecto telangiectádico y tortuoso.

A partir de 15-20 sesiones (5-6 semanas) destacaban las alteraciones epiteliales, caracterizadas por hiperplasia de las células de la hilera basal en zonas irregulares de la epidermis, de modo que en esas áreas la epidermis estaba aumentada de espesor debida a la presencia de varias capas de células basales, de morfología poligonal con escasos citoplasmas y núcleos voluminosos y perpendiculares a la basal.

En este momento se presentaban los fenómenos de acantosis con papilomatosis frecuente, con o sin paraqueratosis.

A partir de 50-60 sesiones (20 semanas, eran muy frecuentes los fenómenos de disqueratosis o queratinización celular individual e

irregular, así como de distintos focos de displasia. Alternando con ellas existían áreas con predominio de atrofia epitelial.

A partir de 65-70 sesiones (25 semanas) destacaban las lesiones neoplásicas bajo la forma de carcinoma "*in situ*" microinvasor e invasores.

Las lesiones neoplásicas correspondían a carcinomas de células escamosas, generalmente de moderado a bien diferenciados, siendo excepcionales los totalmente indiferenciado o anaplásicos. No observamos neoplasias superponibles a los carcinomas basocelulares o basaliomas ni de otros tipos de células que se observan en humanos: células de Merkel, melanocitos, etc.

En la dermis, además de las alteraciones vasculares antes descritas, destacaban a partir de las 18-20 sesiones (6-7 semanas) coincidiendo con la presentación clínica de las arrugas cutáneas, la presencia de fragmentación de las fibras colágenas y los fenómenos de elastosis descrita, así como presencia de focos de infiltrados linfoplasmocitarios.

En la dermis subyacente a las lesiones neoplásicas era constante la presencia de fenómenos de elastosis en acúmulos densos, así como los infiltrados linfoplasmocitarios difusos.

Al finalizar el experimento (80 sesiones) el 100 % de los animales de este grupo (n=10), habían desarrollado lesiones neoplásicas.

Grupo II (adición a la dieta de ácido Carnósico): La evolución de la piel de los animales durante las primeras 50 sesiones fue, en gran medida, similar al resto de los grupos.

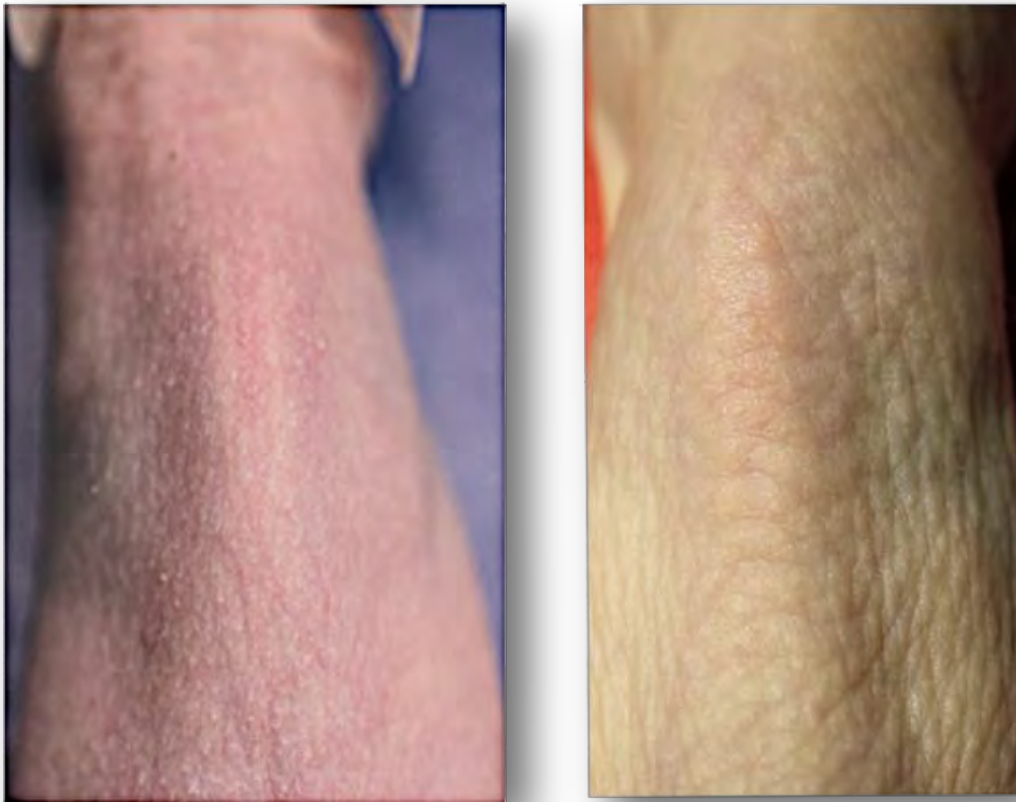


Fig V-26. Eritema en la zona dorsal de dos animales del grupo II

A partir de la sesión 50, de la misma forma que en los animales del grupo Control, comenzaron a aparecer lesiones de aspecto queratósico, si bien en menor número y dimensiones, llegando a observar dos animales, que aunque presentaban las características de la piel fotoenvejecida, no presentaban las lesiones mencionadas anteriormente.

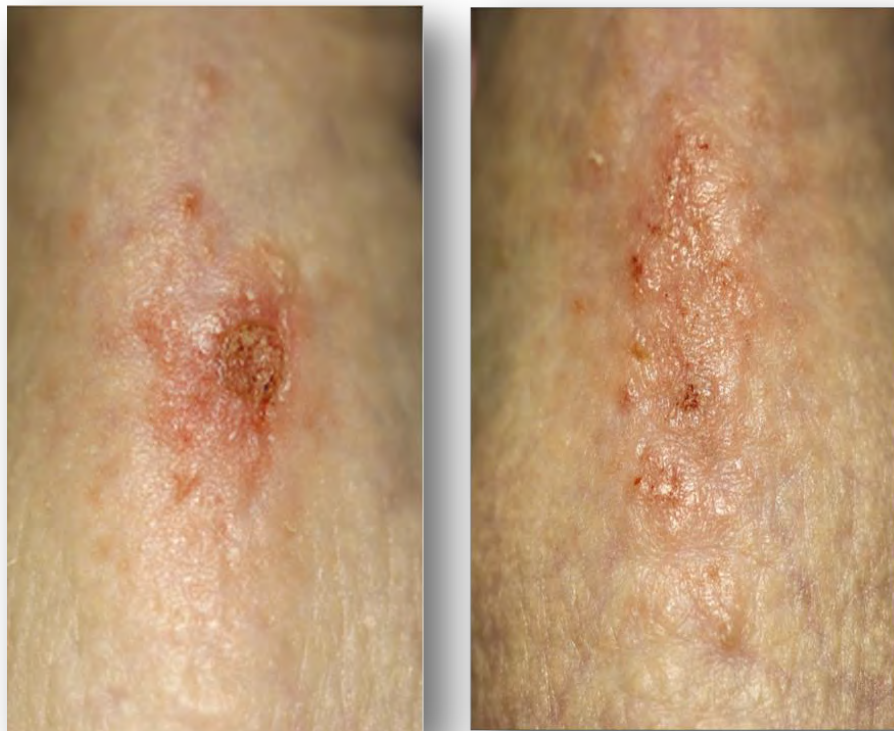


Fig V-27. Lesiones eritemato-escamosas en animales del grupo II.

Al final del tratamiento (sesión 80) todos presentaron lesiones de tipo queratósico, aunque en menor número y dimensiones que los animales del grupo control.



Fig V-28. Lesiones nodulares vegetantes (Grupo II).

En este grupo la DT50 no la establecimos hasta la semana 70. Por otra parte, el área media lesionada fue de $71,577 \text{ mm}^2$ mientras que el tamaño medio de las lesiones fue extraordinariamente bajo: $10,906 \text{ mm}^2$.

Microscópicamente, también observamos fenómenos similares a los del grupo anterior (Control):

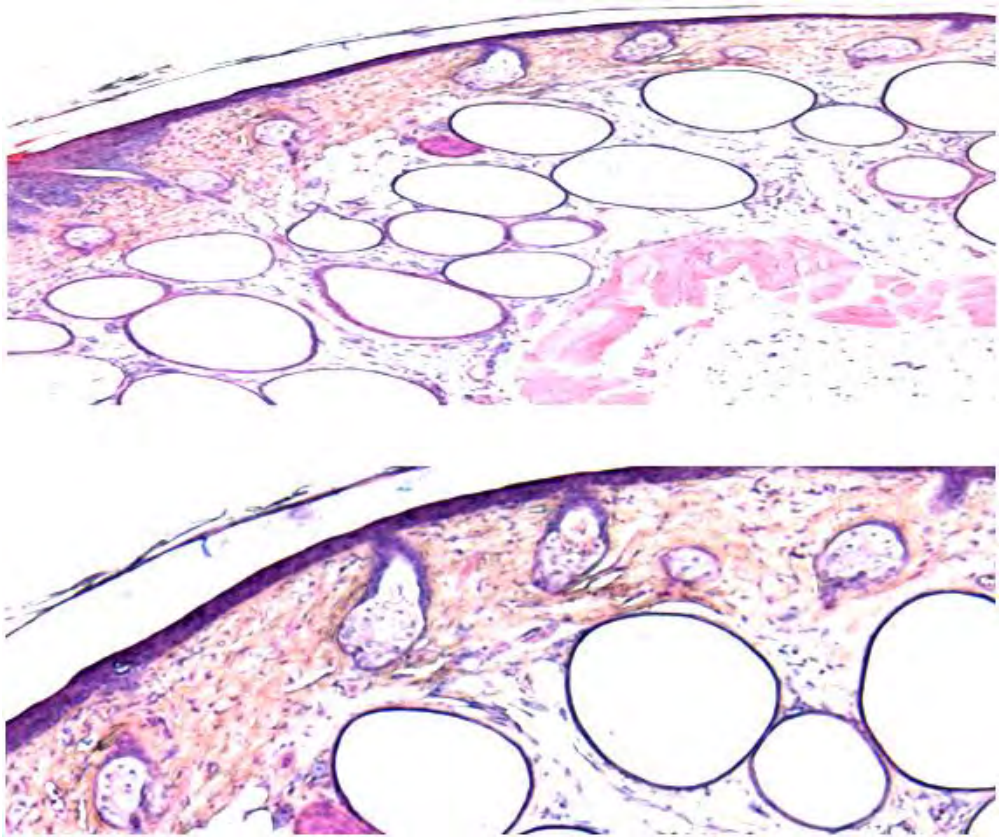


Fig V-29. Atrofia e hiperplasia de células basales en ratonas del grupo II.

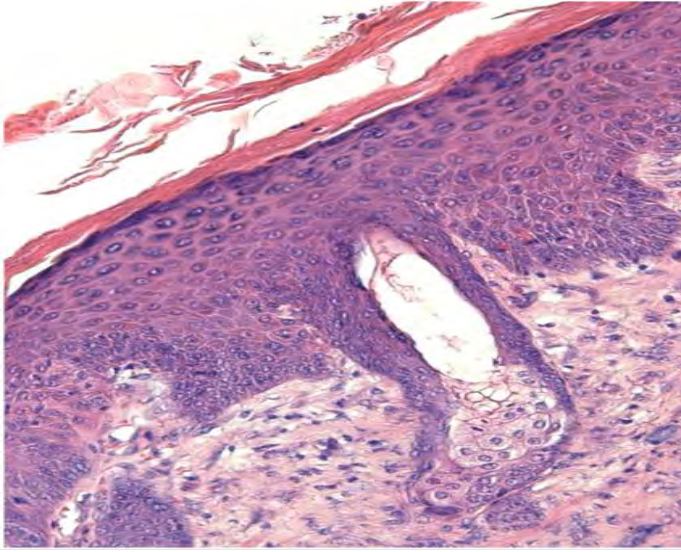


Fig V-30. Paraqueratosis y acantosis en animales del grupo II.

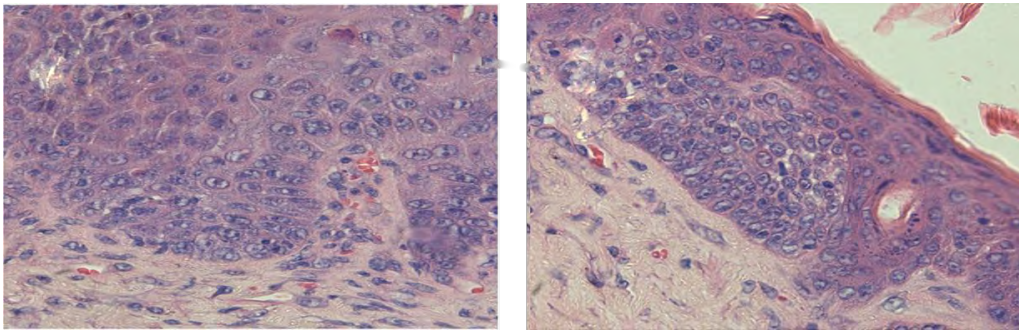


Fig V-31. Disqueratosis y displasia en ratones del grupo II.

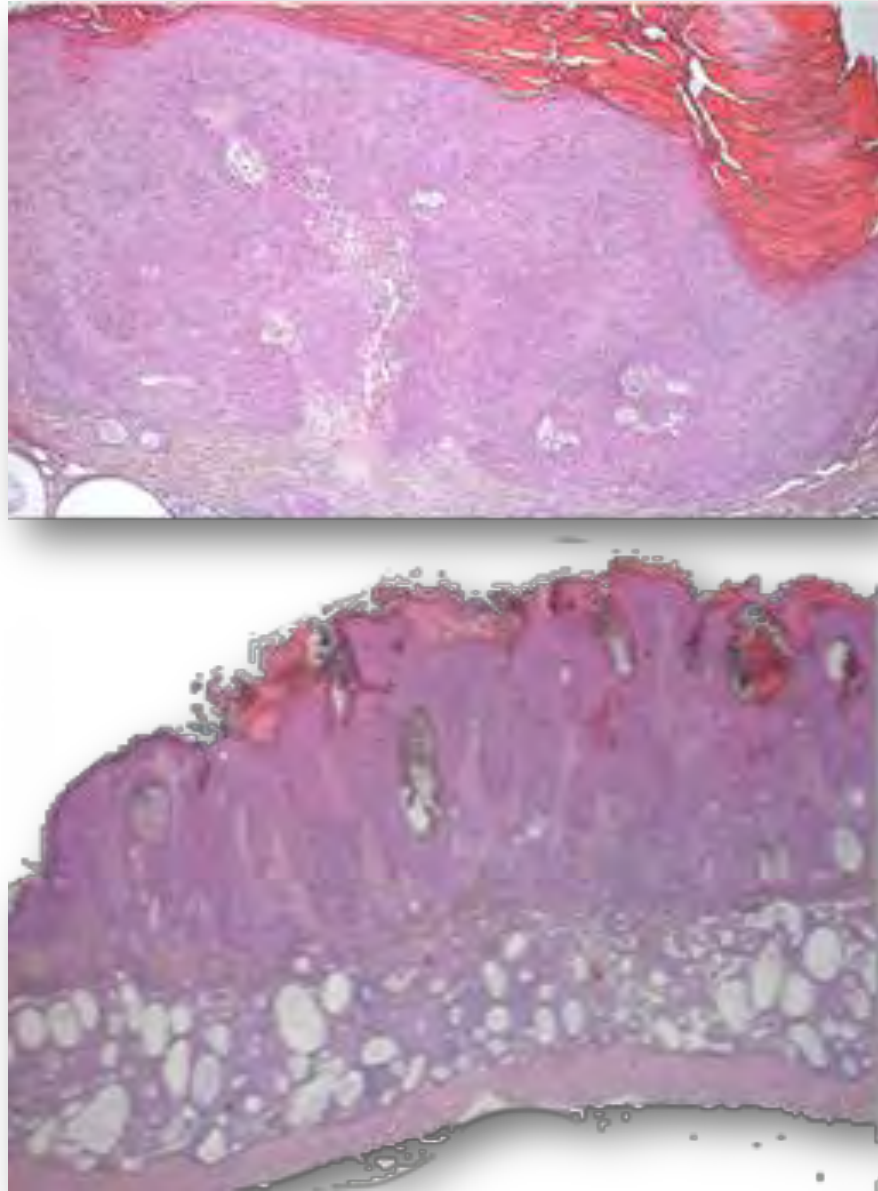


Fig V-32. Carcinoma microinvasor en grupo II.

Al finalizar el experimento, la incidencia de lesiones neoplásicas fue del 60 % del total de los animales.

Grupo III (adición a la dieta de Apigenina potásica): Los animales de este grupo siguieron la misma evolución de los del grupo II, excepto uno de ellos, sobre el que surgieron dos lesiones nodulares de aspecto quístico de 1 y 3 cm de diámetro mayor respectivamente, fluctuantes y color pardo oscuro, situadas en la región axilar e inguinal respectivamente.



Fig V-33. Patrón geométrico cutáneo y arrugas en animales del grupo III.

El resto de animales presentaban en la sección central del lomo, una superficie cutánea con amplias y extensas lesiones eritematosas acompañadas de otras de aspecto queratósico y un diámetro de entre 3 y 8 mm, recubiertas por costra escamosa.



Fig V-34. Lesiones nodulares vegetantes en animales del grupo III.

Las lesiones de mayor volumen presentaban erosiones con costra hemorrágica y alguna de ellas se encontraba infiltrada, así como extensas áreas ulceradas



Fig V-35. Lesiones ulceradas (Grupo III).

La DT50 de este grupo fue de 52 semanas. El área media lesionada fue de 104,717 mm² y el tamaño medio de la lesión quedó establecido en 36,313 mm².

Microscópicamente, observamos lesiones de características similares a los grupos I y II.

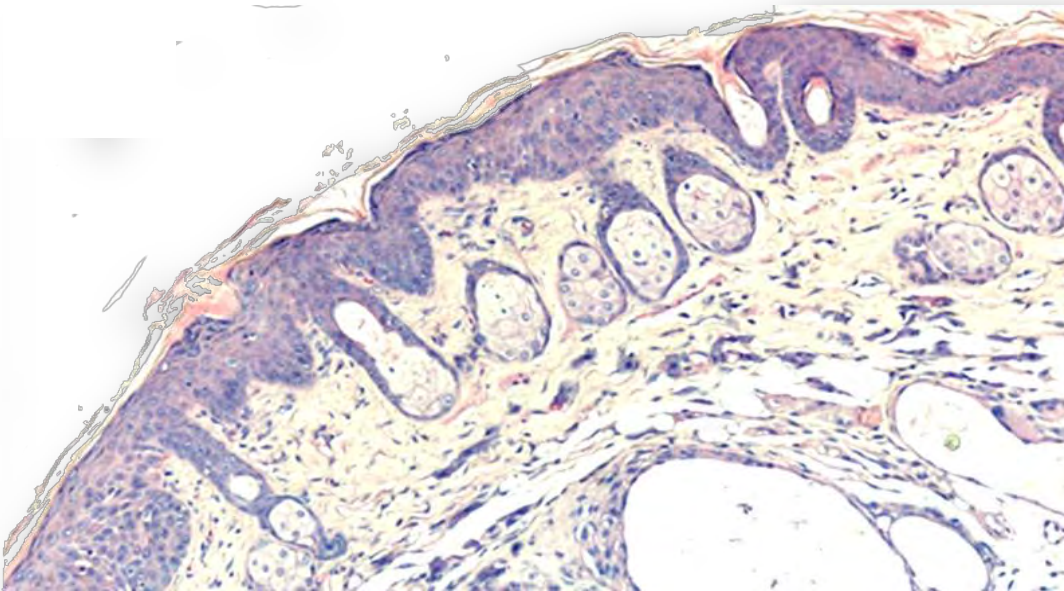


Fig V-36. Hiperplasia de células basales y acantosis en ratones del grupo III.

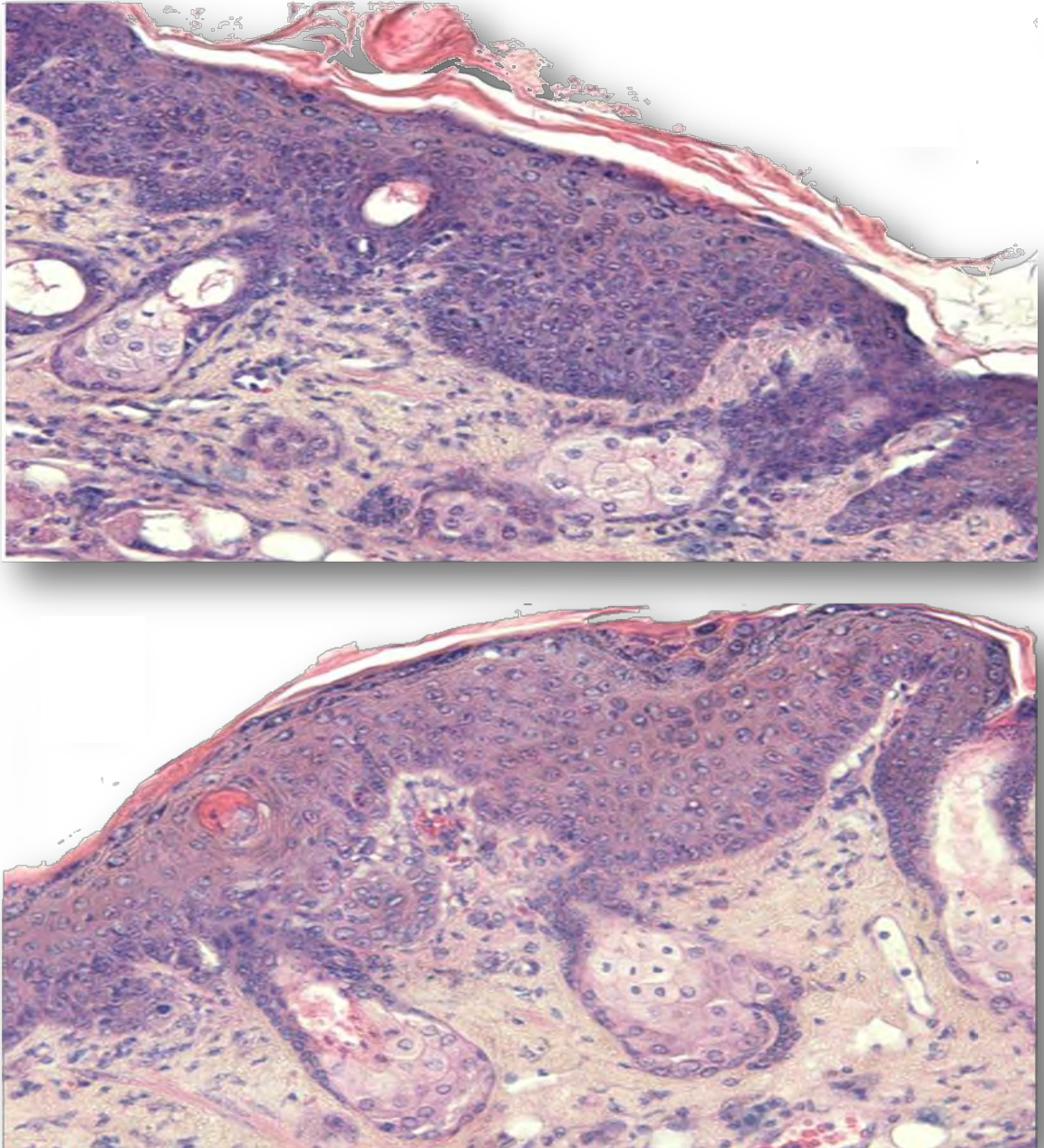


Fig V-38. Hiperqueratosis y disqueratosis en ratones grupo III.

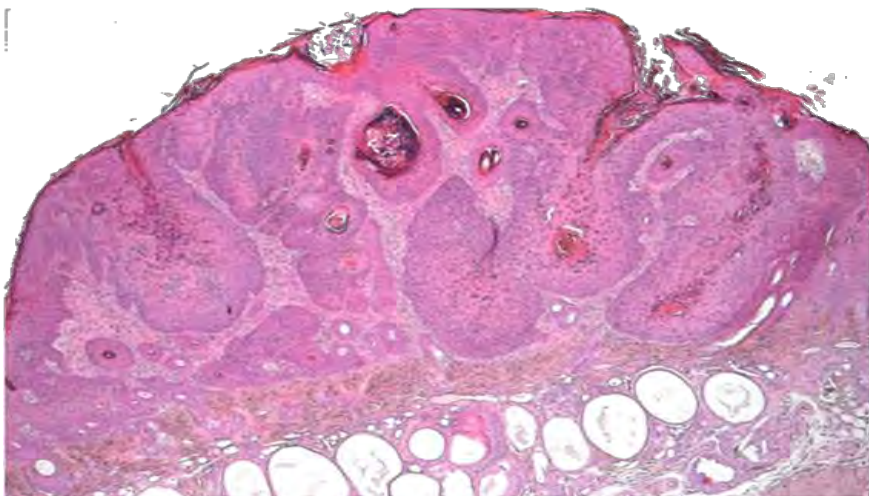
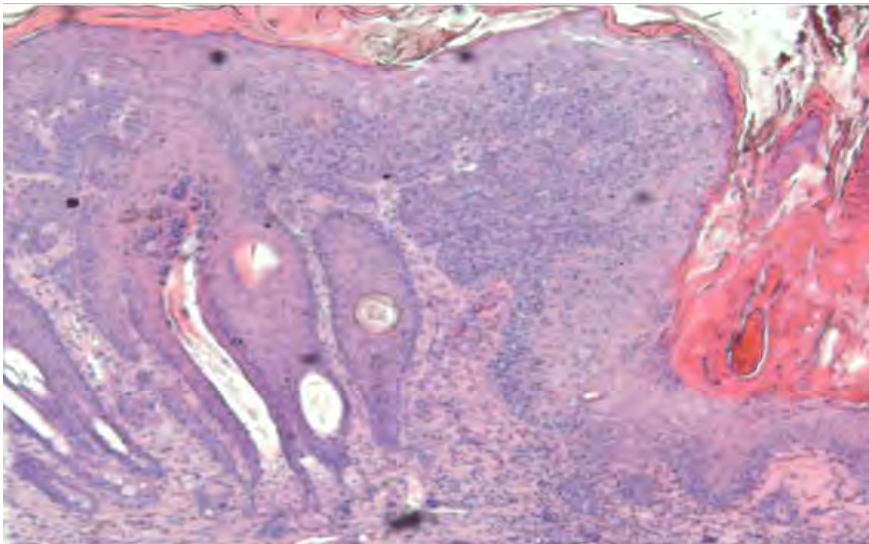
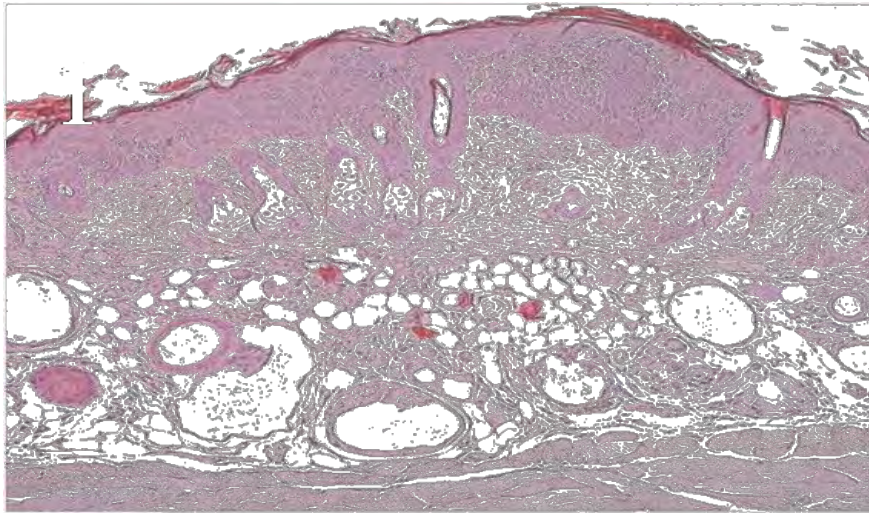


Fig V-39. Displasia, carcinomas microinvasor y de células escamosas en animales grupo III.

La incidencia de lesiones neoplásicas al finalizar el experimento (80 semanas) fue del 90 %.

Grupo IV (adición a la dieta de ácido Rosmarinico): De forma análoga a los otros dos grupos, la evolución de las lesiones fue la descrita anteriormente, aunque hasta la sesión 50 la piel del dorso presentaba un menor número de arrugas. Es de destacar que en este grupo el aspecto general de la piel era más saludable que los otros tres grupos.



Fig V-40. Eritema en animal del grupo IV.

A partir de este momento, comenzaron a aparecer lesiones de tipo verrucoso, de diámetro inferior a 0,5 mm, que, en contraste con los grupos anteriores, evolucionaron más despacio, no apareciendo lesiones erosivas hasta la sesión nº 65 en dos animales.

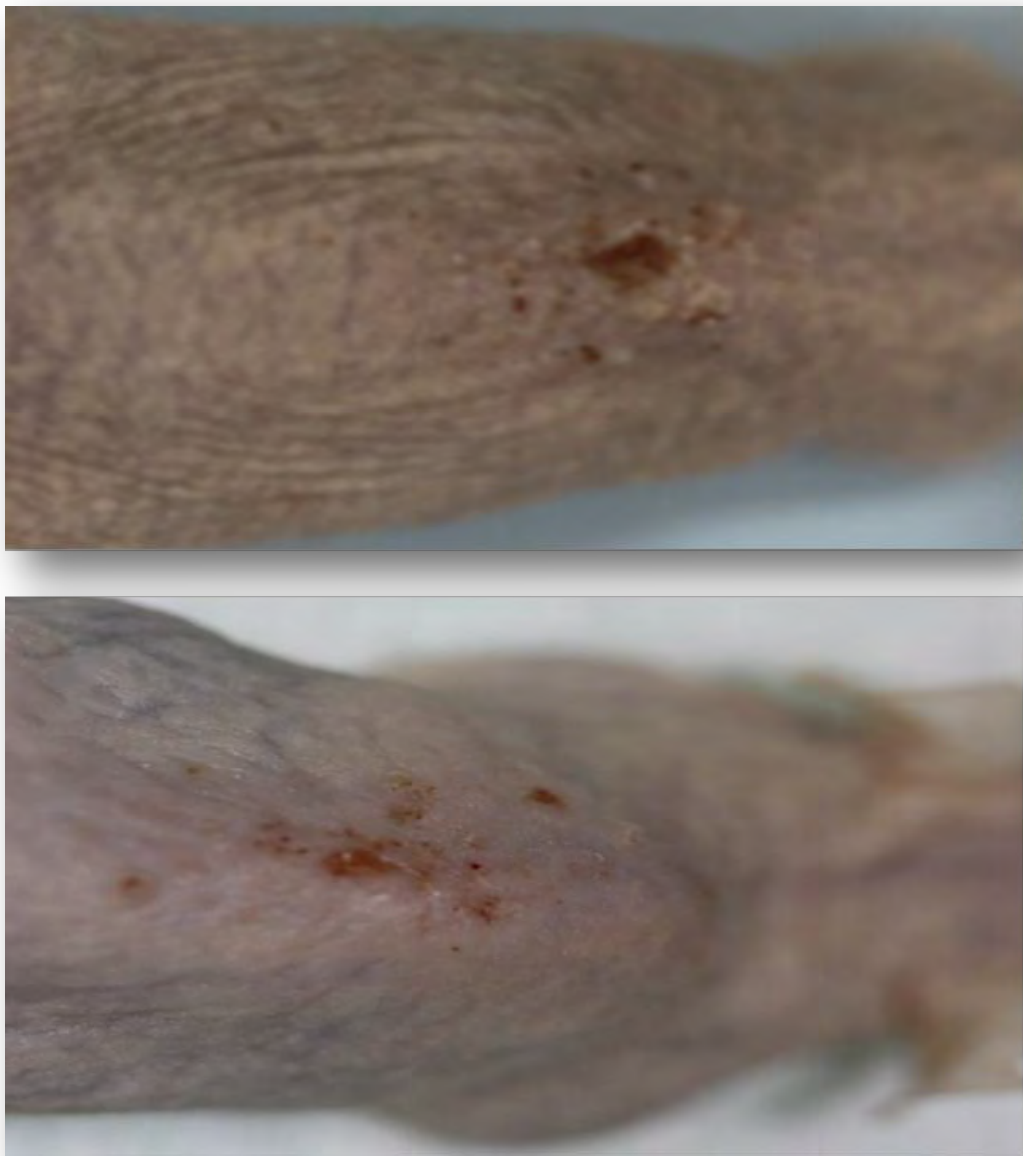


Fig V-41. Arrugas y lesiones eritemato-escamosas en ratones del grupo IV.

En la sesión 75, las lesiones erosivas eran generalizadas en todos los animales, aunque de menor tamaño que los grupos precedentes.



Fig V-42. Lesiones ulceradas y nodulares vegetantes en ratones del grupo IV



Fig V-43. Lesiones quísticas en ratón del grupo IV.

La DT50 correspondió a la semana 60. La media de la superficie lesionada en los animales de este grupo fue de 132,100 mm² y el tamaño medio de la lesión fue de 44,594 mm².

Microscópicamente observamos:

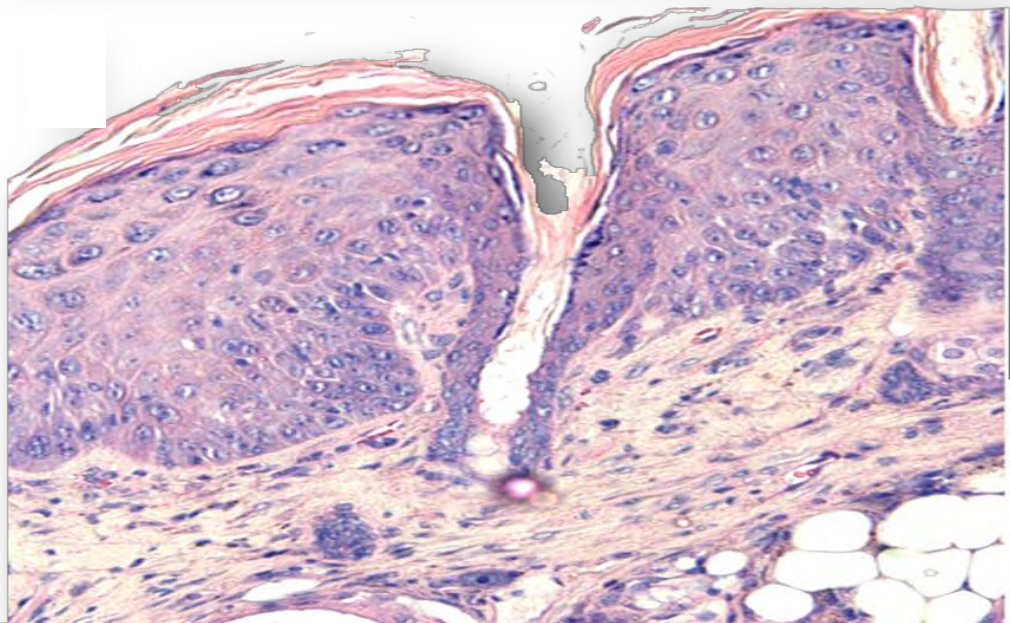
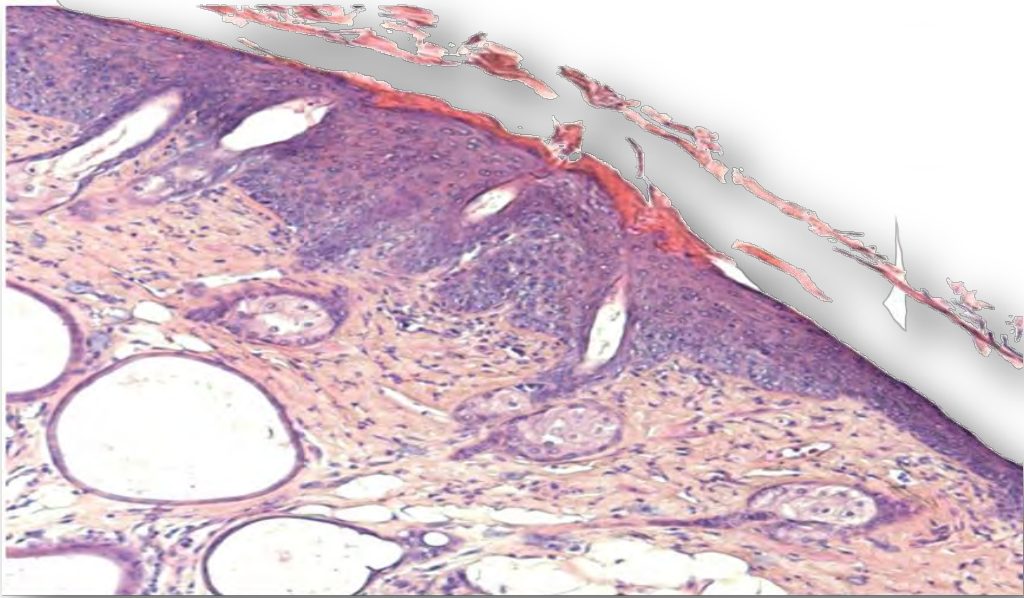


Fig V-44. . Hiperplasia y acantosis en animales grupo IV.

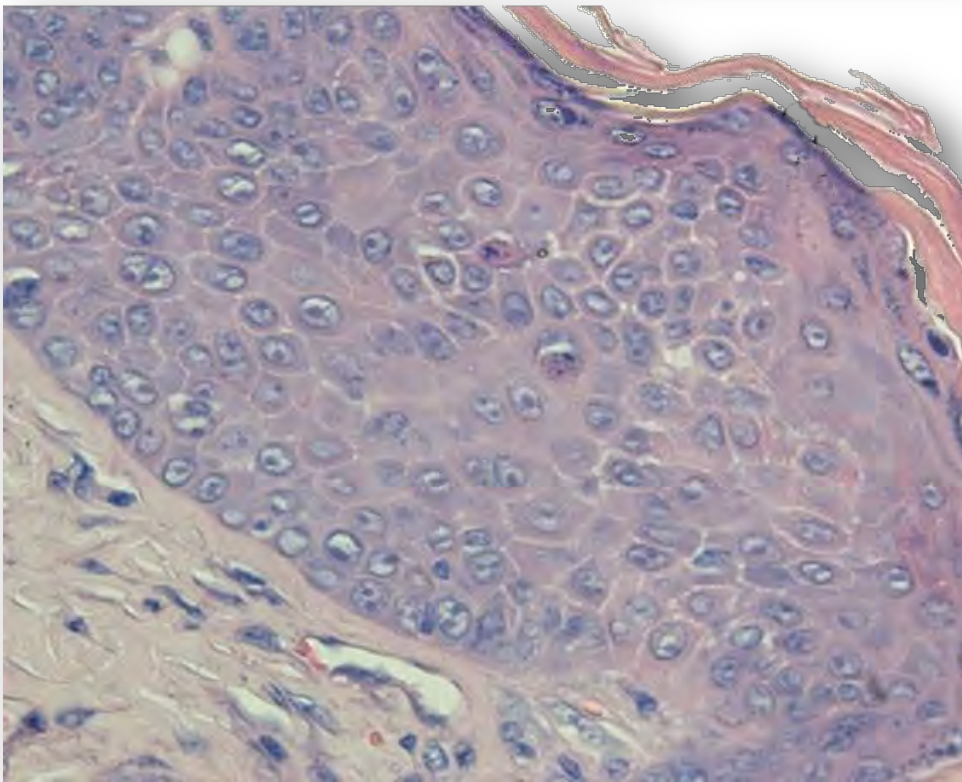
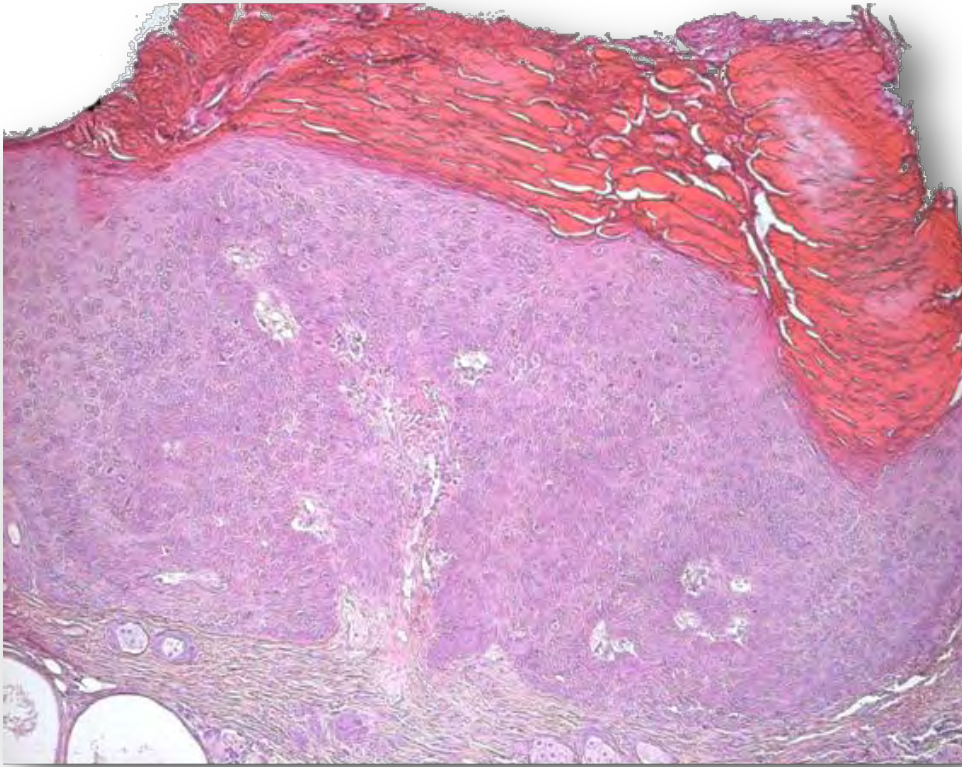


Fig V-45. Paraqueratosis y disqueratosis en grupo IV.

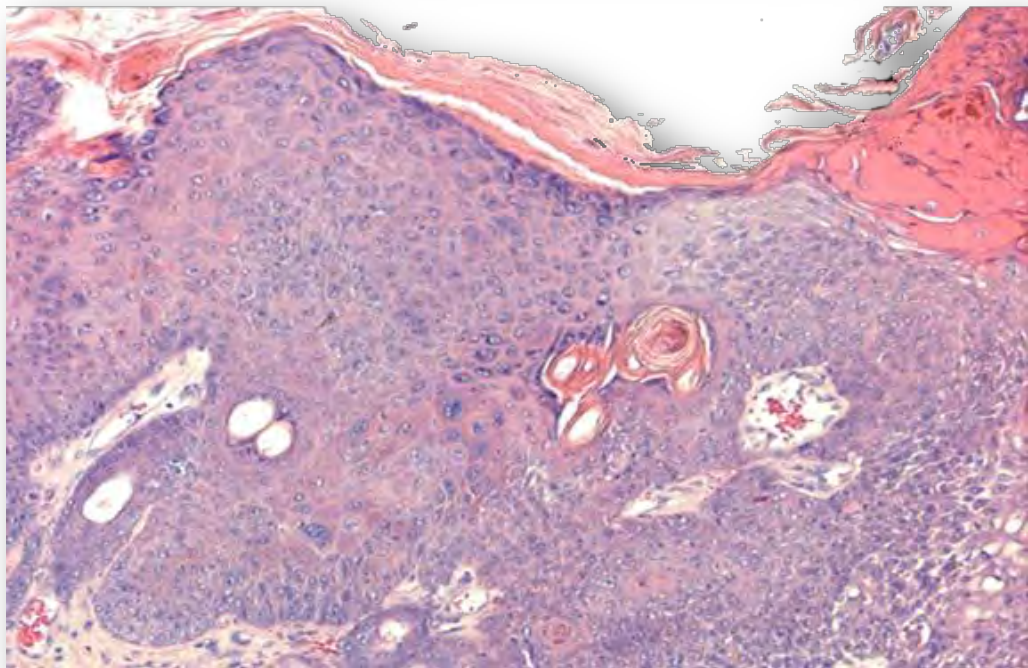
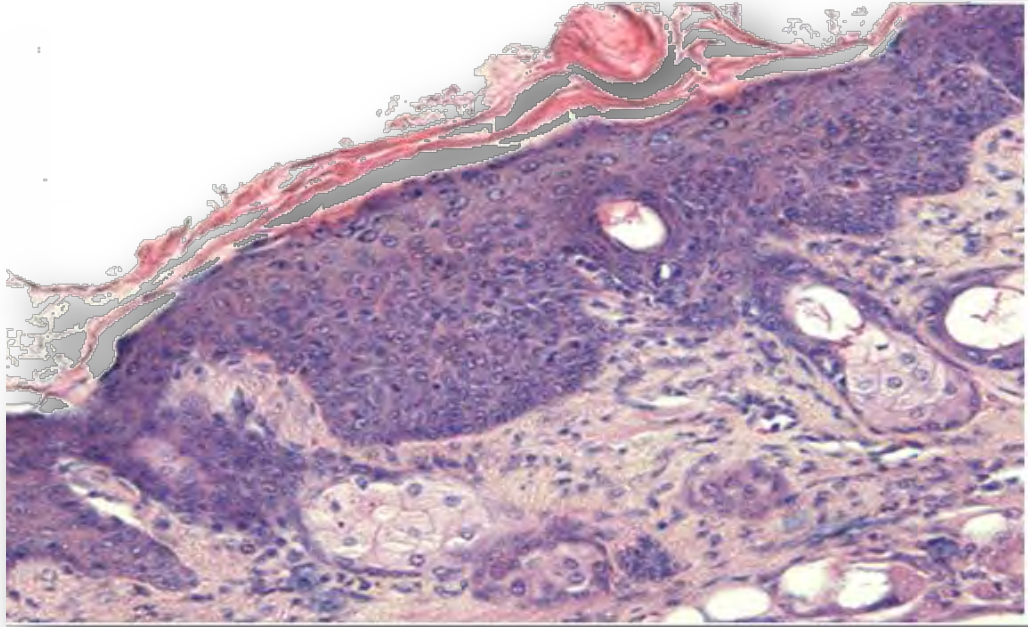


Fig V-46. Displasia y carcinoma "in situ" en animales del grupo IV.

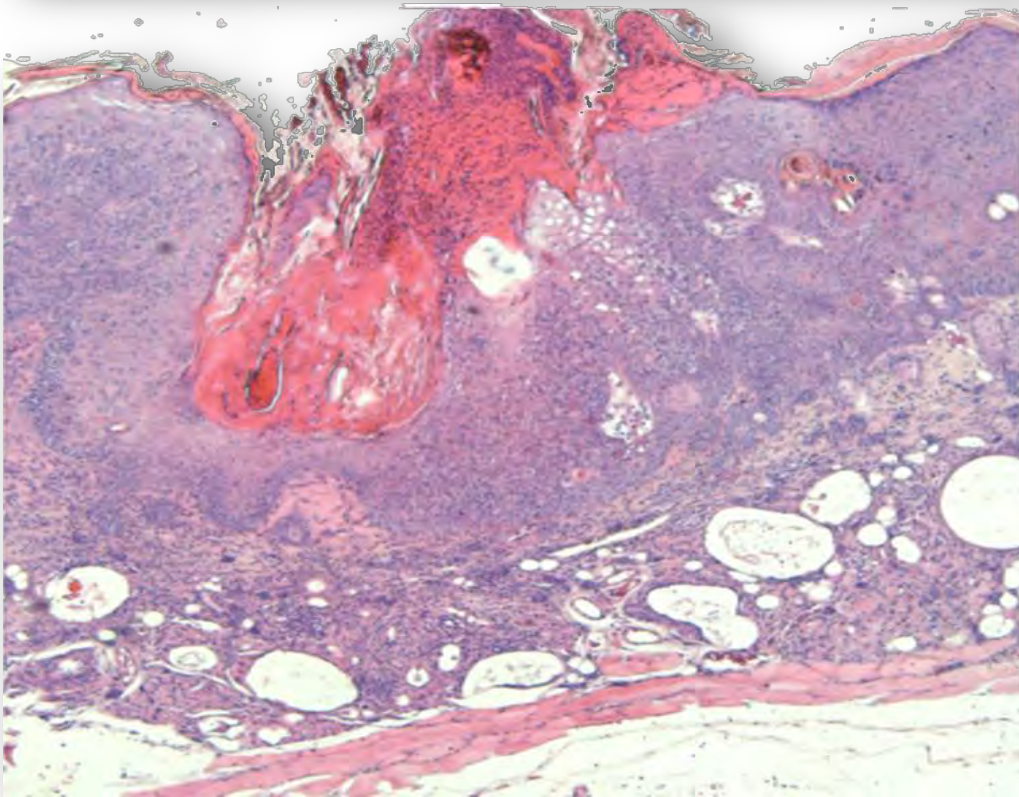
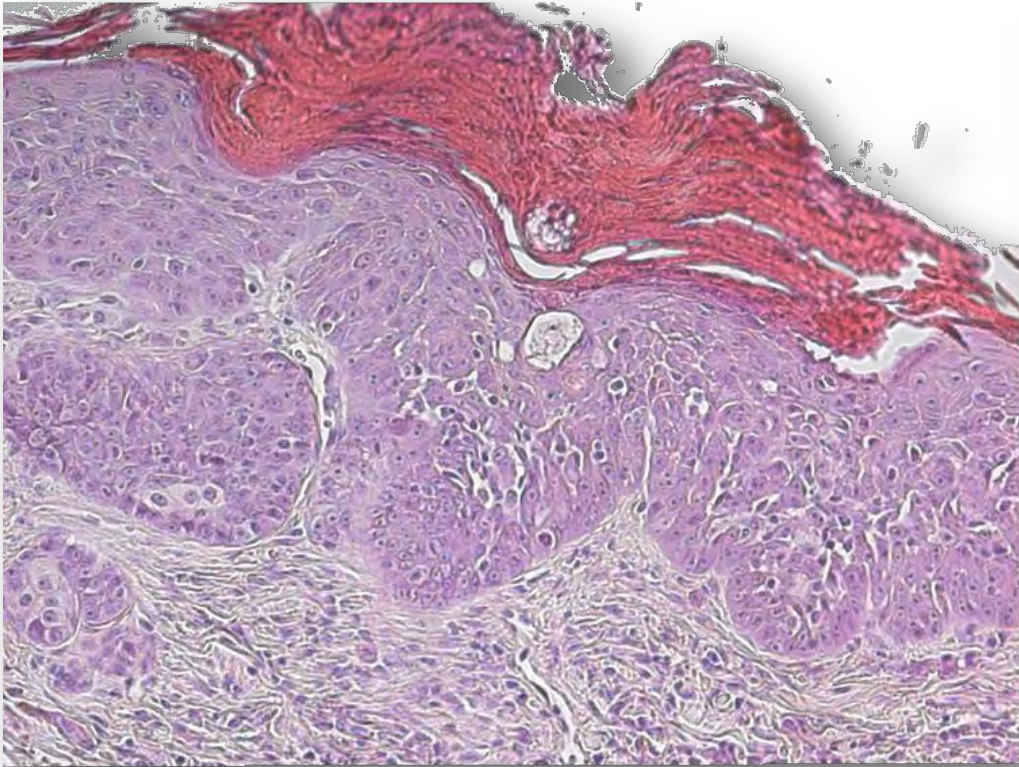


Fig V-47. Carcinomas microinvasor y de células escamosas en animales grupo IV.

En este grupo, la inhibición de lesiones neoplásicas fue del 40 %, es decir que 6 de los 10 animales presentaron lesiones neoplásicas.

Comparaciones intergrupos.

Evolución del peso de los animales por grupos:

El peso de los animales evolucionó según la gráfica adjunta, no encontrando diferencias, tanto entre los distintos grupos experimentales como en comparación con los animales de la colonia establecida en el Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia.

Evolución ponderal de ratones SKH1

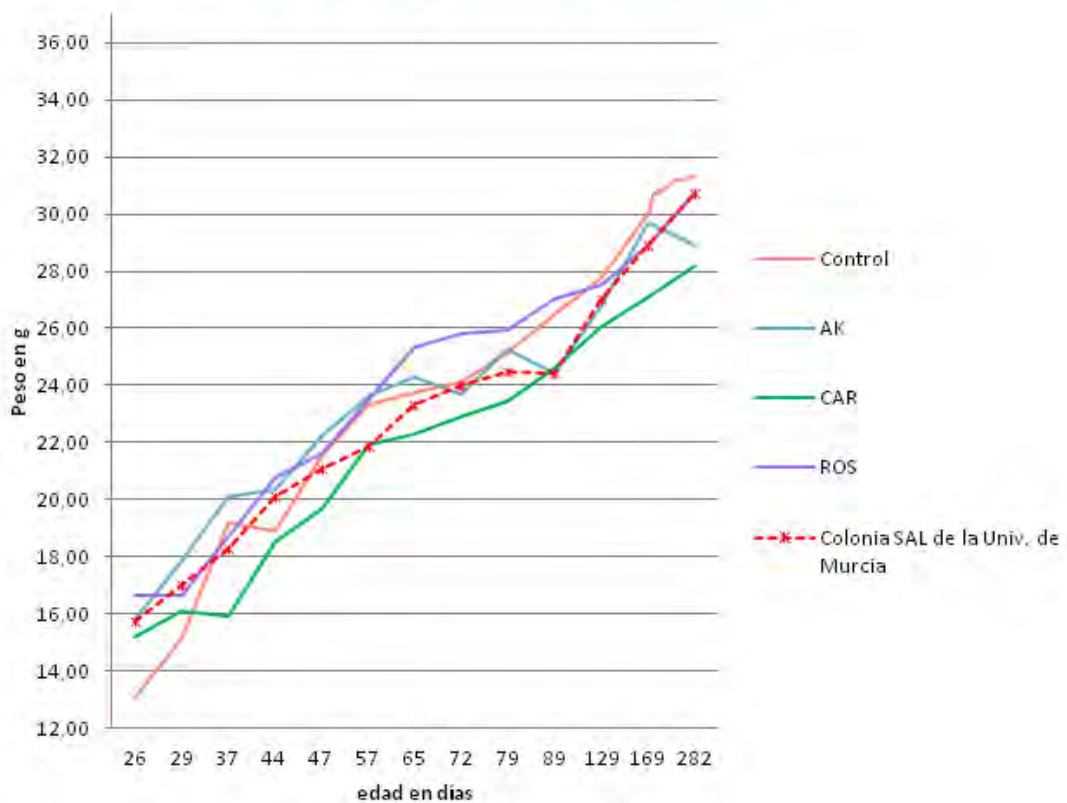


Gráfico V-1. Evolución del peso de los animales.

DT50

Este parámetro lo definimos como la mediana de la variable “*semana de presentación de la primera lesión*” y se correspondía con la semana del experimento en la que al menos la mitad de los animales del grupo manifestaban al menos 1 lesión. Observamos un retraso en la presentación de lesiones en el grupo de animales tratados con ácido Carnósico.

Grupo I (Control)		Grupo II (ácido Carnósico)		Grupo III (Apigenina)		Grupo IV (ácido Rosmarínico)	
Animal nº	Semana	Animal nº	Semana	Animal nº	Semana	Animal nº	Semana
1	60	1	50	1	50	1	65
2	50	2	70	2	50	2	53
3	50	3	70	3	53	3	60
4	65	4	70	4	50	4	60
5	53	5	70	5	50	5	60
6	53	6	50	6	50	6	59
7	60	7	70	7	65	7	70
8	68	8	70	8	65	8	70
9	70	9	50	9	65	9	57
10	68	10	70	10	63	10	62
Mediana (DT50)	60	Mediana (DT50)	70	Mediana (DT50)	51,5	Mediana (DT50)	60

Tabla V-1. Semana del experimento en la que se observó la 1ª lesión.

DT50

■ (Control) ■ (ácido carnósico) ■ (Apigenina) ■ (ácido rosmarinico)



Gráfico V-2. DT50 en para los distintos grupos

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	Las medianas de S_Apar_1ª les son las mismas entre las categorías de Gr_Experi.	Prueba de medianas de muestras independientes	,439	Retener la hipótesis nula.

Tabla V-2. Nivel de significancia para la DT50.

Área de las lesiones cutáneas que presentaba cada animal:

Grupo I (Control)			Grupo II (ácido Carnósico)			Grupo III (Apigenina)			Grupo IV (ácido Rosmarínico)		
Animal nº	Área lesionada		Animal nº	Área lesionada		Animal nº	Área lesionada		Animal nº	Área lesionada	
1	162,084		1	53,891		1	245,883		1	206,077	
2	581,634		2	56,811		2	109,275		2	109,275	
3	256,149		3	133,927		3	206,077		3	206,077	
4	162,286		4	43,952		4	112,518		4	112,518	
5	242,979		5	14,176		5	142,594		5	142,594	
6	185,458		6	184,450		6	88,847		6	88,847	
7	160,401		7	62,146		7	27,715		7	27,715	
8	45,672		8	57,512		8	15,743		8	15,743	
9	19,297		9	88,710		9	56,684		9	206,077	
10	88,334		10	20,192		10	41,834		10	206,080	
Total	N	10	Total	N	10	Total	N	10	Total	N	10
	Media	190,429		Media	71,577		Media	104,717		Media	132,100
	Desv. típ.	157,518		Desv. típ.	52,108		Desv. típ.	76,068		Desv. típ.	73,945
	Mínimo	19,297		Mínimo	14,176		Mínimo	15,743		Mínimo	15,743
	Máximo	581,634		Máximo	184,450		Máximo	245,883		Máximo	206,080

Tabla V-3. Resumen de casos para "area lesionada"

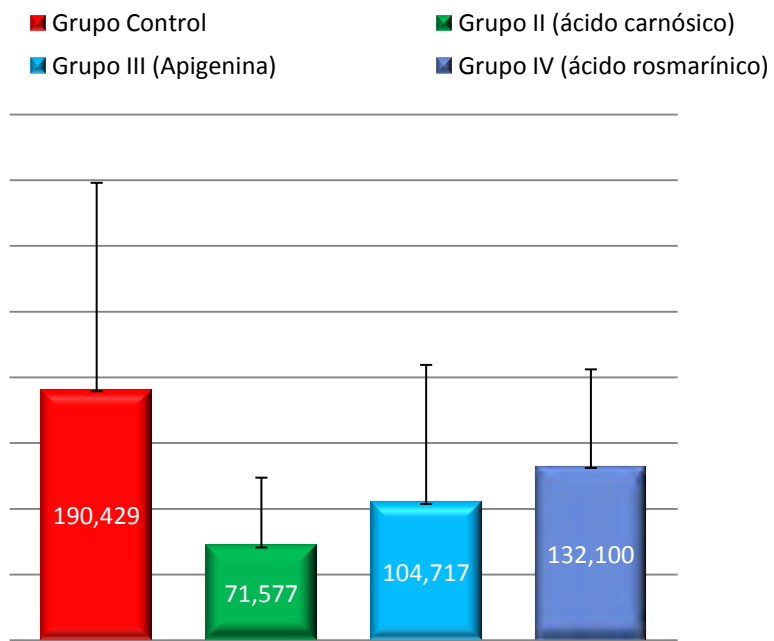


Gráfico V-3. Áreas de lesión en los diferentes grupos.

ANOVA (Área lesionada)		
	F	Sig.
Inter-grupos	2,612	0,066
Intra-grupos		
Total		

Tabla V-4. Anova para la variable área lesionada.

Grupo Experimental		Error típico	Sig.
Control	Carnósico	44,034944	,063
	Apigenina	44,034944	,357
	Rosmarínico	44,034944	1,000
Carnósico	Control	44,034944	,063
	Apigenina	44,034944	1,000
	Rosmarínico	44,034944	1,000
Apigenina	Control	44,034944	,357
	Carnósico	44,034944	1,000
	Rosmarínico	44,034944	1,000
Rosmarínico	Control	44,034944	1,000
	Carnósico	44,034944	1,000
	Apigenina	44,034944	1,000

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.07.

Tabla V-5. Comparaciones múltiples para "área lesionada" (corrección de Bonferroni)

No hemos encontrado d.e.s. al 0,05. Sin embargo, sí la había con una significación del 0,07, es decir con una seguridad del 93 %.

Justificamos el hecho de tomar $\alpha = 0,07$ porque con $n=10$, se produce falta de potencia estadística.

Tamaño de las lesiones.

Grupo I (control)		Grupo II (ácido Carnósico)		Grupo III (Apigenina)		Grupo IV (ácido Rosmarínico)					
Animal nº	Tamaño medio de las lesiones	Animal nº	Tamaño medio de las lesiones	Animal nº	Tamaño medio de las lesiones	Animal nº	Tamaño medio de las lesiones				
1	40,521	1	13,473	1	49,177	1	51,519				
2	145,409	2	5,681	2	109,275	2	109,275				
3	128,075	3	14,881	3	51,519	3	51,519				
4	40,572	4	7,325	4	56,259	4	56,259				
5	80,993	5	7,088	5	35,649	5	35,649				
6	92,729	6	26,350	6	44,424	6	44,424				
7	53,467	7	6,215	7	2,310	7	2,310				
8	11,418	8	8,216	8	2,249	8	2,249				
9	3,859	9	14,785	9	6,298	9	51,519				
10	29,445	10	5,048	10	5,976	10	41,216				
Total	N	10	Total	N	10	Total	N	10	Total	N	10
	Media	62,649		Media	10,906		Media	36,313		Media	44,594
	Desv. típ.	47,861		Desv. típ.	6,618		Desv. típ.	33,866		Desv. típ.	30,067
	Mínimo	3,859		Mínimo	5,048		Mínimo	2,249		Mínimo	2,249
	Máximo	145,409		Máximo	26,350		Máximo	109,275		Máximo	109,275

Tabla V-6. Tamaño medio en mm² de las lesiones en los animales de los cuatro grupos experimentales.

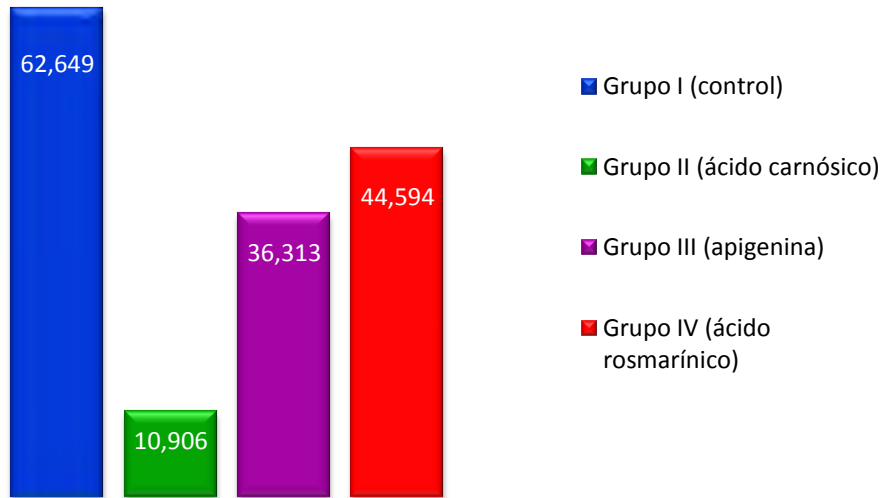


Gráfico V-4. Comparación para los distintos grupos en la media de la variable “tamaño de las lesiones”.

ANOVA (tamaño medio de las lesiones)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	13864,401	3	4621,467	4,215	0,012
Intra-grupos	39468,010	36	1096,334		
Total	53332,410	39			

Tabla V-7. Tabla de anova para la variable “tamaño medio de las lesiones”

Grupo experimental	Grupo experimental	Sig.
Control	Carnósico	0,008
	Apigenina	,503
	Rosmarínico	1,000
Carnósico	Control	0,008
	Apigenina	,569
	Rosmarínico	,174
Apigenina	Control	,503
	Carnósico	,569
	Rosmarínico	1,000
Rosmarínico	Control	1,000
	Carnósico	,174
	Apigenina	1,000

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05

Tabla V-8. Comparaciones entre grupos para la variable “tamaño de la lesión” (corrección de Bonferroni).

Incidencia de lesiones neoplásicas.

Grupo experimental	Con lesión neoplásica		Sin lesión neoplásica	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Grupo I (control) (n=10)	10	100,00		
Grupo II (ácido Carnósico) (n=10)	6	60,00	4	40,00
Grupo III (Apigenina) (n=10)	9	90,00	1	10,00
Grupo IV (ácido Rosmarínico (n=10))	6	60,00	4	40,00

Tabla V-9. Frecuencia y porcentajes de la manifestación de lesiones neoplásicas.

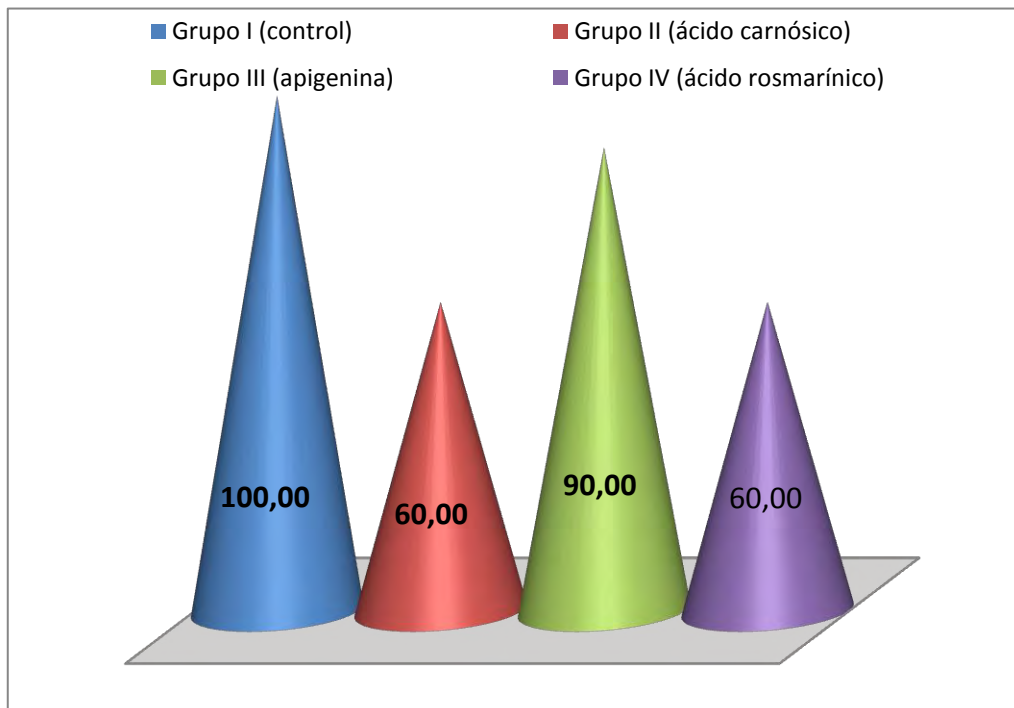


Gráfico V-5. Porcentajes de animales en los que se observó "lesiones neoplásicas malignas".

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Carcinoma es la misma entre las categorías de Gr_Experi.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,068	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es .07.

Tabla V-10. Nivel de significancia entre los distintos grupos experimentales para la variable "incidencia de lesiones neoplásicas".

Estudio inmunohistoquímico.

Tanto en los tumores de los animales del grupo control como en los de los tratados, se encontró una inmunotinción positiva para el marcador PCNA, el cual es un fiel índice de proliferación celular en cualquier tejido. La tinción fue mayor en el grupo control que en los grupos tratados, con diferencias estadísticamente significativas con el ácido Rosmarínico. En la siguiente tabla se muestran los resultados de la cuantificación de la inmunotinción con PCNA de los tumores desarrollados:

Grupo	PCNA	p-valor
Grupo I(Control)	529,33 ± 102,623	
Grupo II (ácido Carnósico)	489,25±100,108	p=0,100
Grupo III (Apigenina)	457,93±93	p=0,176
Grupo IV (ácido Rosmarínico)	324,67 ± 11,015	p < 0,001

Tabla V-11. Cuantificación de la inmunotinción con PCNA

Piel normal (sana):

La epidermis muestra un espesor homogéneo, constituido por dos o tres capas de queratinocitos, discreta hiperqueratosis ortoqueratótica y los infundíbulos foliculares dilatados con frecuente formación de pequeñas cavidades quísticas en la dermis subyacente. Muestra, en general, positividad frente a PCNA en las células de la hilera basal de la epidermis así como en los folículos pilosos y glándulas sebáceas (++++).

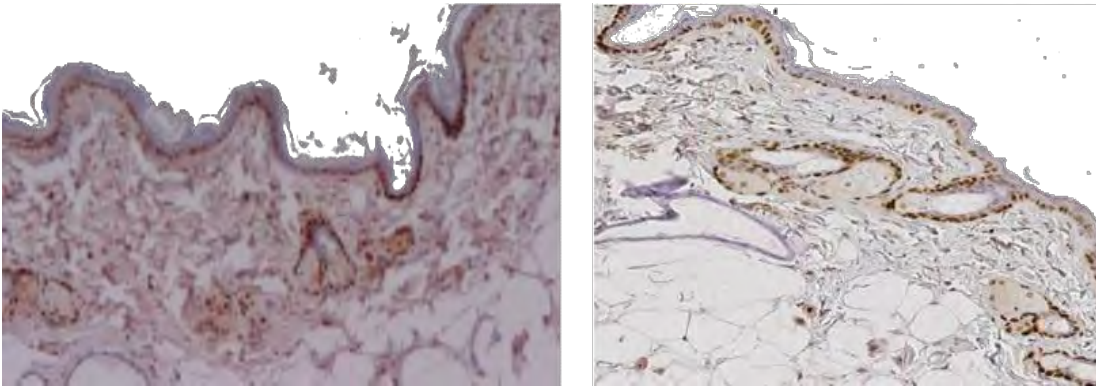


Fig V-48. Piel normal.

Hiperplasia epidérmica; (hiperplasia de células Basales, acantosis, etc.)

Las células positivas a PCNA se observan localizadas tanto a nivel del estrato basal como en las capas inferiores del estrato espinoso de Malpighio, folículos pilosos y glándulas sebáceas.

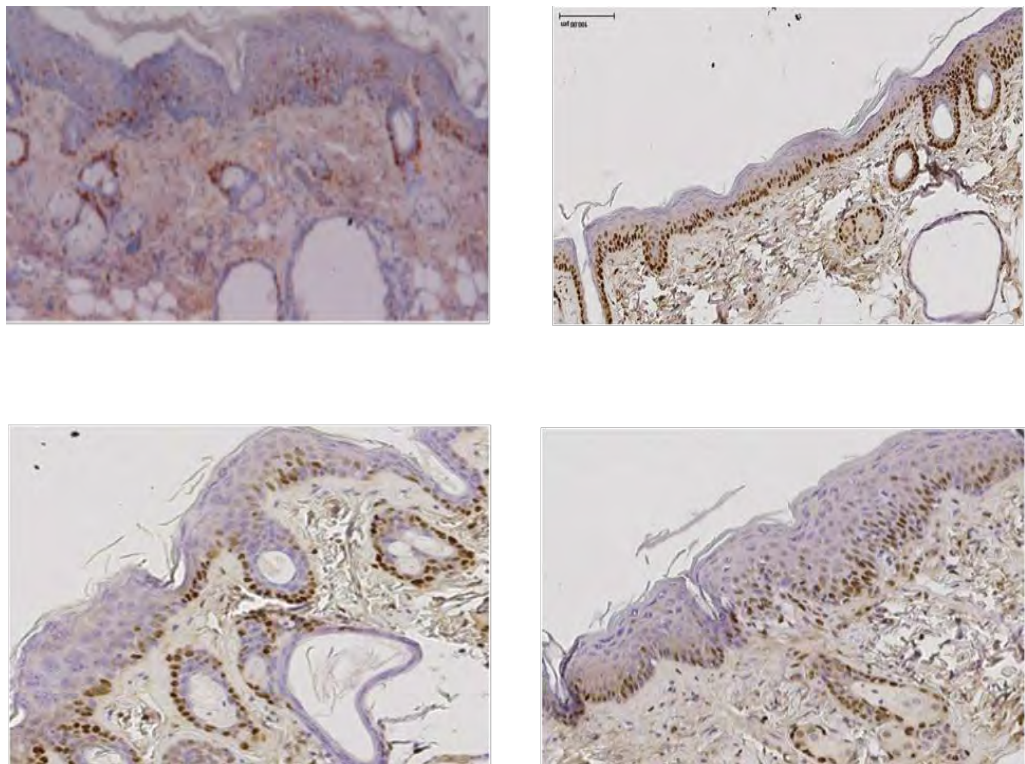


Fig V-49. Hiperplasia epidérmica.

Displasia.

Las células positivas a PCNA, como en las muestras anteriores, se localizan tanto en la capa basal como en los estratos superiores, correspondiendo la mayor positividad a las células atípicas.

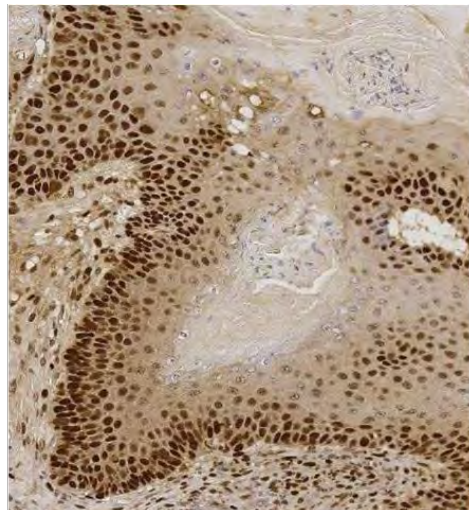
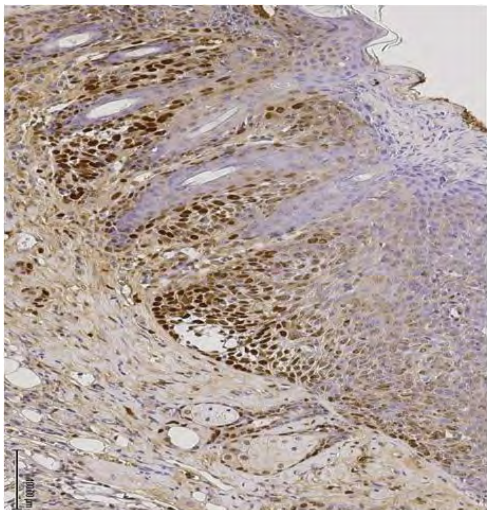
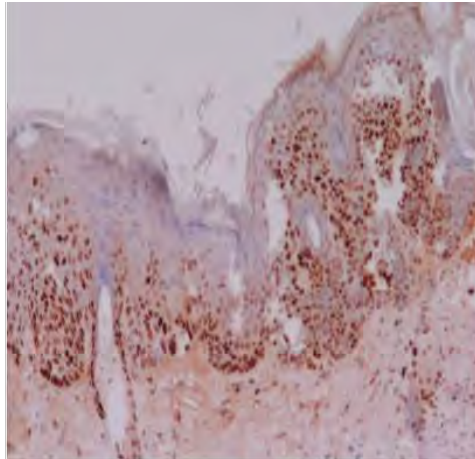
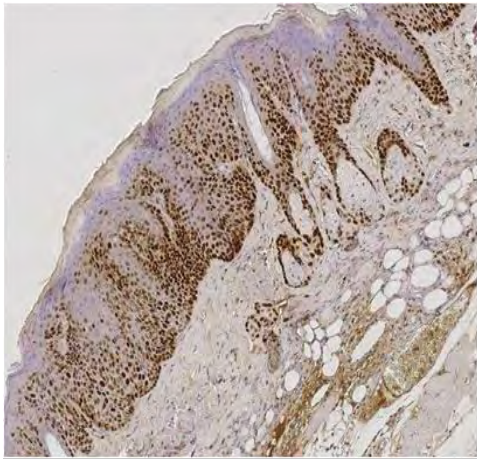


Fig V-50. Displasia

Carcinoma "in situ".

Las células positivas a PCNA muestran características superponibles a las de la lesión descrita en el apartado anterior, aunque se disponen en todo el espesor de la epidermis, incluso a nivel del estrato córneo.

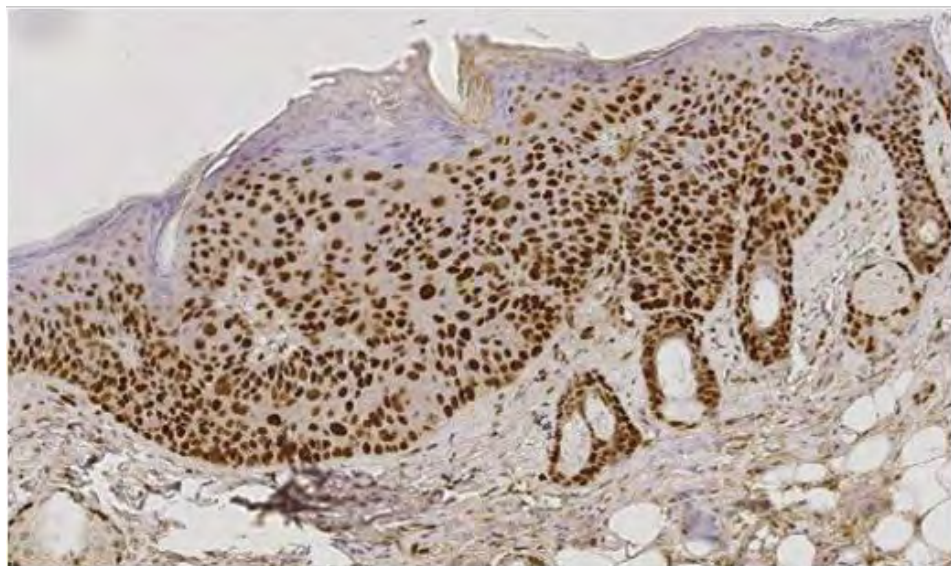
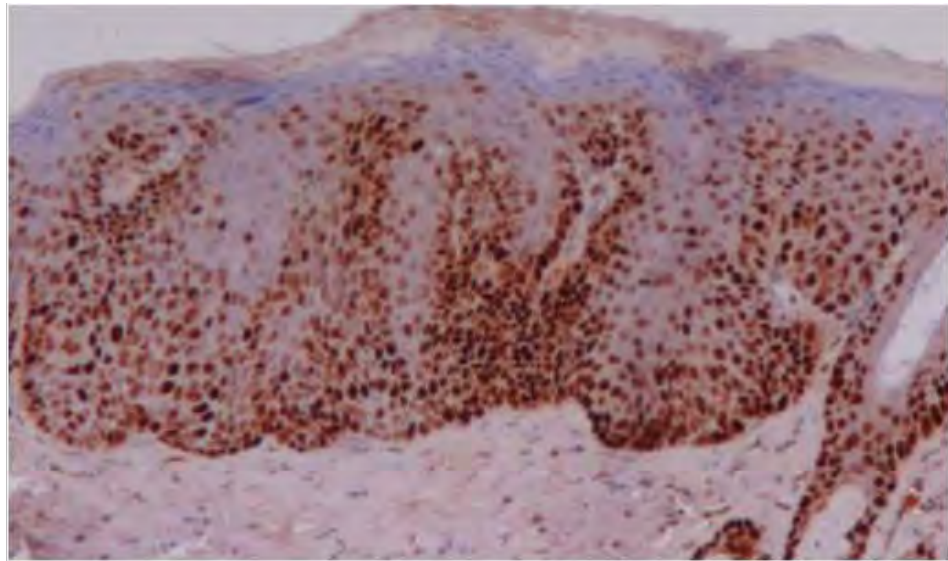


Fig V-51. Carcinoma "in situ"

Carcinoma microinvasor.

A diferencia de la lesión anterior, las células positivas para PCNA, afectan también a la dermis, generalmente dispuestas de forma individual o en pequeños grupos.

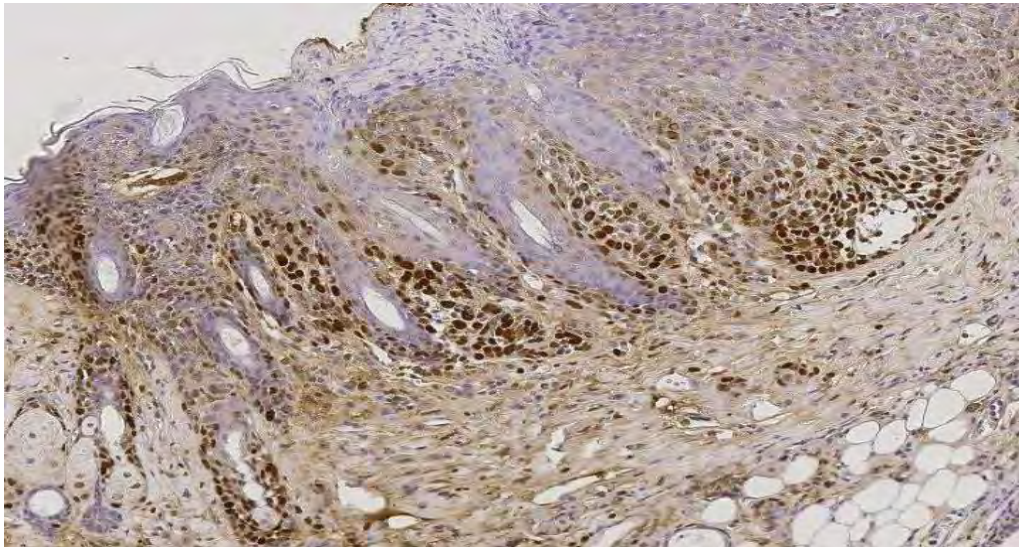


Fig V-52. Carcinoma microinvasor.

Carcinoma invasor.

Las células positivas se distribuyen en cordones y nidos irregulares de forma difusa por la dermis papilar y reticular.

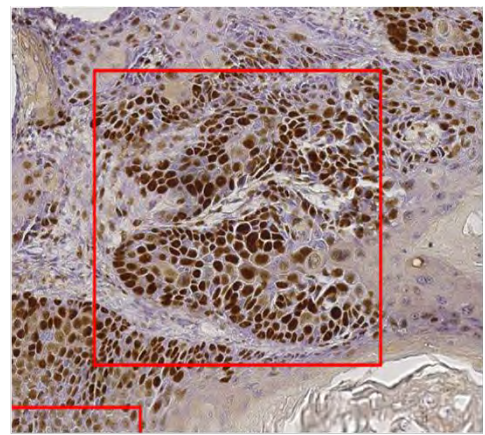
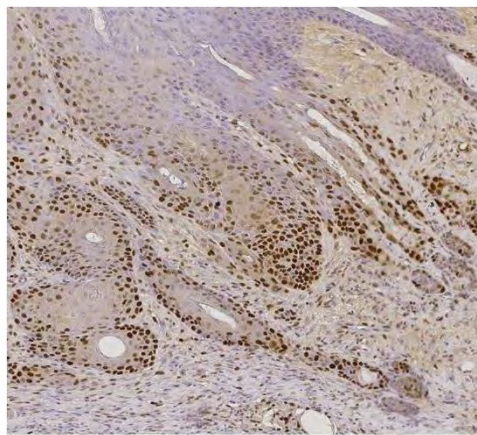
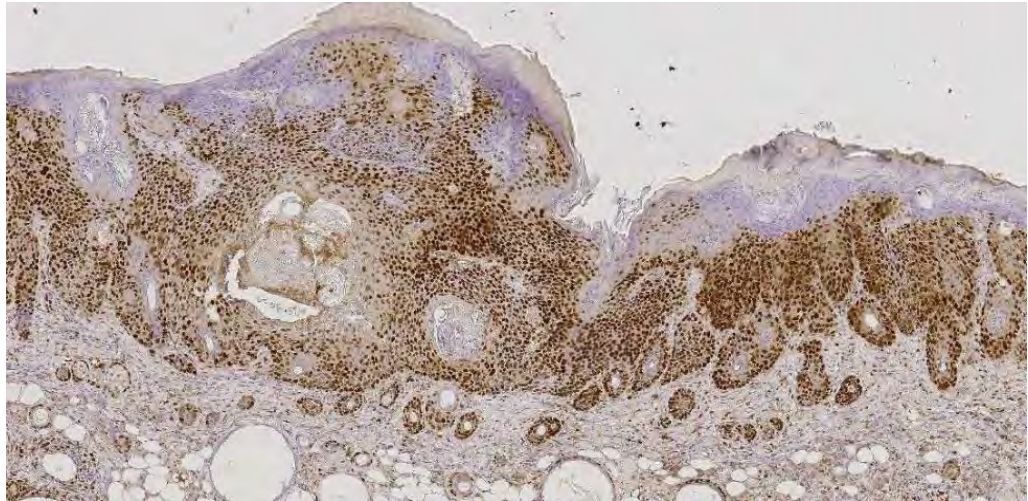


Fig V-53. Carcinoma invasor.

Tumores exofíticos.

190

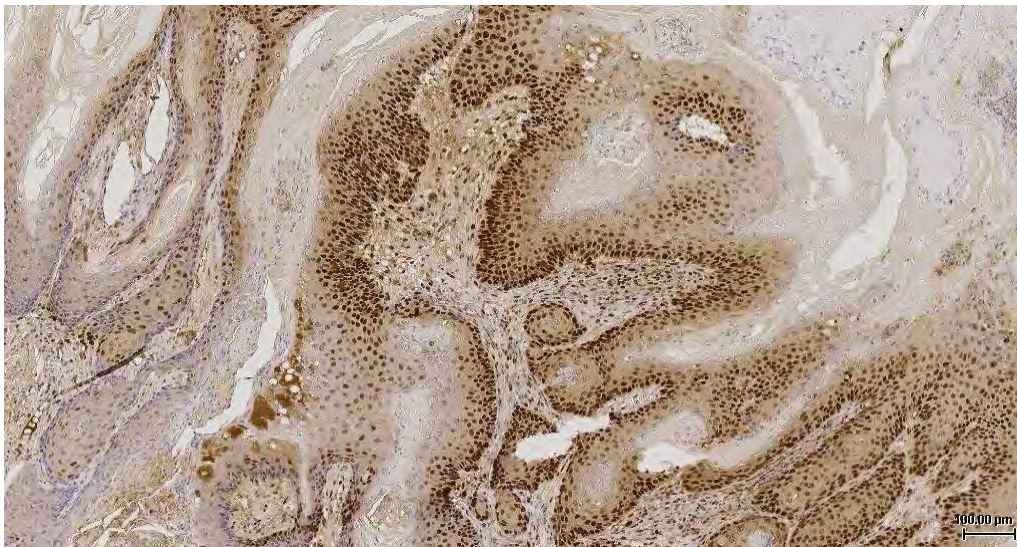
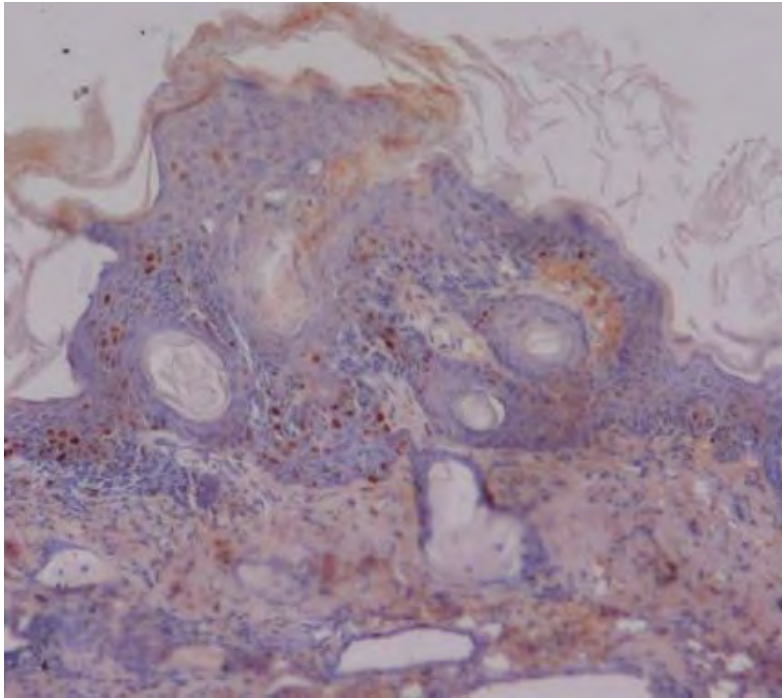


Fig V-54. Tumores exofíticos

Discusión.

VI. Discusión

La piel humana sufre, como los restantes órganos, los cambios del denominado **envejecimiento intrínseco o cronológico** caracterizado por reducción del: turnover celular, espesor, protección mecánica, respuesta inmune, termorregulación, percepción sensorial, producción del sudor, del sebo y de la vascularización (Südel, 2005). Estos cambios cursan con atrofia generalizada con escasas alteraciones estructurales hasta los 50 años, seguido por un deterioro lento. Además también puede sufrir las alteraciones del denominado **fotoenvejecimiento o dermatoheliosis**, consistentes en la superposición sobre las anteriores del daño solar, de ahí que se considere como un envejecimiento patológico, caracterizado por cambios más precoces, extensos e intensos, y de mayor gravedad, puesto que incluyen la fotocarcinogénesis (Südel, 2005).

La exposición crónica a la luz solar y su RUV inicia un aluvión de respuestas moleculares y celulares que terminan con un trastorno dinámico rápido (McCallion, 1993). Los efectos de la luz solar sobre la piel son profundos, y se estima que representa hasta un 90% del envejecimiento visible de la piel, en particular en los individuos sin la

protección natural que origina la melanina sintetizada por los melanocitos cutáneos (Südel, 2005).

Además, la radiación UV provoca en la dermis una reacción molecular en cadena, que en última instancia da como resultado trastornos del metabolismo, con aumento, tanto en la dermis como en la epidermis, de metaloproteinasas de la matriz que estimulan la producción de colagenasa, gelatinasa y estromelisina-1 de los fibroblastos y queratinocitos. El resultado es una desorganización del colágeno y de la elastina, así como de otros componentes de la matriz extracelular dérmica. La exposición repetida a la energía solar hace que la reparación de la matriz dérmica, sea cada vez más deficiente, con un efecto acumulado sobre la estructura y organización de su base de colágeno, de modo que cuando la piel está sometida a ciclos repetidos de exposición a la RUV, se hacen visibles a simple vista en forma de flacidez de la piel y la formación de arrugas (Kang, 2003).

Asimismo, 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 transformadas (Gilchrest, 1996). Se ha demostrado recientemente que la radiación UV también puede actuar evitando que

ocurra la apoptosis en las células expuestas al sol, con lo que potencialmente pueden promover el desarrollo celular indefinido y por tanto tumores cutáneos (Ismail, 2011). Por lo que la radiación UV es un carcinógeno completo, ya que por una parte es capaz de iniciar el cáncer a través de mutación del ADN y por otra, promover el crecimiento del mismo a través de los procesos carcinogénicos inherentes a la exposición a la RUV acumulativa. Por este motivo, la Agencia de Investigación del cáncer de la OMS, incluyó a las radiaciones ultravioletas en el grupo 1 de agentes carcinógenos (Landrigan, 2011).

Es indudable que el fotoenvejecimiento cutáneo supone un auténtico fenómeno sociosanitario, ya que es uno de los procesos patológicos más frecuentes en la clínica, de modo que actualmente constituye uno de los problemas dermatológicos de mayor interés, junto a las graves implicaciones económicas que comporta (Kawada, 2011).

Por otra parte, el extenso período de latencia y la larga y lenta evolución del proceso de fotoenvejecimiento, junto a los problemas éticos que conlleva someter al ser humano a los procesos que implica, hace imposible el desarrollo de estos estudios en humanos.

De ahí el enorme interés que tiene el desarrollo de modelos experimentales de fotoenvejecimiento en animales.

En este sentido, Kehinde y colaboradores (2013) realizaron una revisión sobre el uso de animales de experimentación en el estudio de las enfermedades concluyendo que, históricamente, los animales se han utilizado en una amplia gama de la investigación científica que ha demostrado ser beneficiosa para la humanidad, sobre todo en relación con el avance del conocimiento científico, el desarrollo de medicamentos, la formación en técnicas quirúrgicas, la seguridad de los productos químicos y, de forma especial además para el desarrollo seguro de las vacunas (Kehinde, 2013).

Como modelos animales de fotoenvejecimiento, han sido utilizadas numerosas especies, tanto con pelo como desnudos; las más frecuentemente usadas corresponden a minipigs (Kligman, 1982), cobayas (Kreuzmann, 1990) e incluso peces (pez cebra...) (Kurita, 2004). Sin embargo, los ratones han sido el modelo animal más utilizado según la bibliografía: C57Bl/6j, Balb/c, CBA, Swiss (Becker, 2010; Benavides, 2009) y fundamentalmente los desnudos: HR-1, SKH1, etc (Sharma, 2011).

El primer intento de estudiar los daños inducidos por la RUV en un modelo animal tuvo lugar en 1960, cuando Winkelmann desarrolló un carcinoma de células escamosas en ratones después de la exposición crónica a RUV (Winkelmann, 1960). Posteriormente, Sams y colaboradores (1964) diseñaron un experimento para producir elastosis en la zona dorsal afeitada de un ratón con pelo (Sams, 1964). A partir de este momento, el ratón pasó rápidamente a ser el modelo de elección para el estudio de la carcinogénesis inducida por RUV. Actualmente, el ratón desnudo albino SKH1 y la variedad pigmentada SKH2, son los más utilizados en los estudios de bronceado (Warren , 1986), fotoenvejecimiento (Kligman, 1982), y fotocarcinogénesis (Kligman, 1980).

El primer estudio diseñado específicamente para producir elastosis en un ratón sin pelo se desarrolló en 1980 cuando Berger, utilizó un ratón desnudo de una cepa albina (Ng /), que normalmente tiene una red de fibras elásticas bien desarrollada (Berger, 1980).

Kligman y colaboradores (1982), irradiaron grupos de ratones SKH-1 y SKH-2 fundamentalmente con RUV B, durante 30 semanas y tres sesiones semanales, en los que prácticamente se vieron afectadas todas las estructuras de la piel. En la epidermis se produjo hiperplasia. Las fibras elásticas que normalmente son escasas y engrosadas,

200

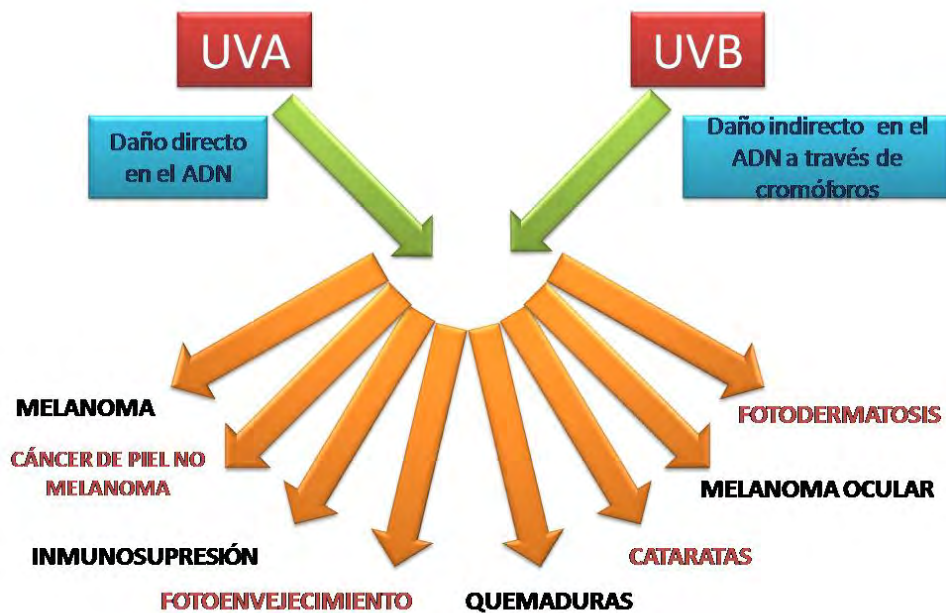
degeneraron, produciéndose una extensa elastosis. La tinción del colágeno disminuyó, debido a la destrucción del colágeno maduro. Los glicosaminoglicanos (GAG) se incrementaron en gran medida en la dermis papilar. Estos resultados establecieron al ratón hairless como modelo relevante para el estudio del fotoenvejecimiento humano. Asimismo no se encontraron diferencias notables entre las cepas albinas y pigmentadas, con la excepción de la proliferación melanocítica y aumento de la melanogénesis en el ratón SKH2 (Kligman, 1982).

Para desarrollar nuestro modelo experimental de fotoenvejecimiento, elegimos el ratón SKH1. Corresponde a un ratón sin pelo y sin pigmentación melánica, que es más sensible a la acción de la RUV, lo que facilita la producción de lesiones, acortando el periodo de latencia. Estos animales procedían de Charles River Laboratoires, New York y se aclimataron fácilmente al Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia, donde se estableció la colonia.

El **primer objetivo** que nos planteamos en nuestro trabajo, consistió en el desarrollo de un modelo de fotoenvejecimiento mediante la exposición crónica a RUV de los animales, que diseñamos basándonos en los resultados previos de algunos trabajos de nuestro grupo (Cano, 2010; Gil, 2014). Los animales fueron colocados en jaulas de PVC con separadores individuales para cada ratón y una cubierta de

celosía metálica; a continuación fueron situados bajo la lámpara de luz UV, a una distancia foco/animal de 20 cm (las sesiones de irradiación se realizaron tres veces por semana durante 60 minutos mientras duró el experimento, que hicieron un total de 80 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 recibida por cada animal fue de 1.688 J/cm^2), demostrando características similares a las producidas por los efectos de la RUV sobre la piel humana fotoenvejecida.

Los efectos de la RUV sobre la piel humana, han sido esquematizados por Lim, 2011:



A su vez, en la patogenia de estas lesiones se han implicado tres mecanismos fundamentalmente, debido a las alteraciones que provocan las RUV a su paso a través de los tejidos:

202

- a) Trastornos vasculares, que provocan un mecanismo inflamatorio.
- b) Degradación de las proteínas estructurales con alteración de la arquitectura dérmica.
- c) Producción de fotoproductos con alteración genómica.

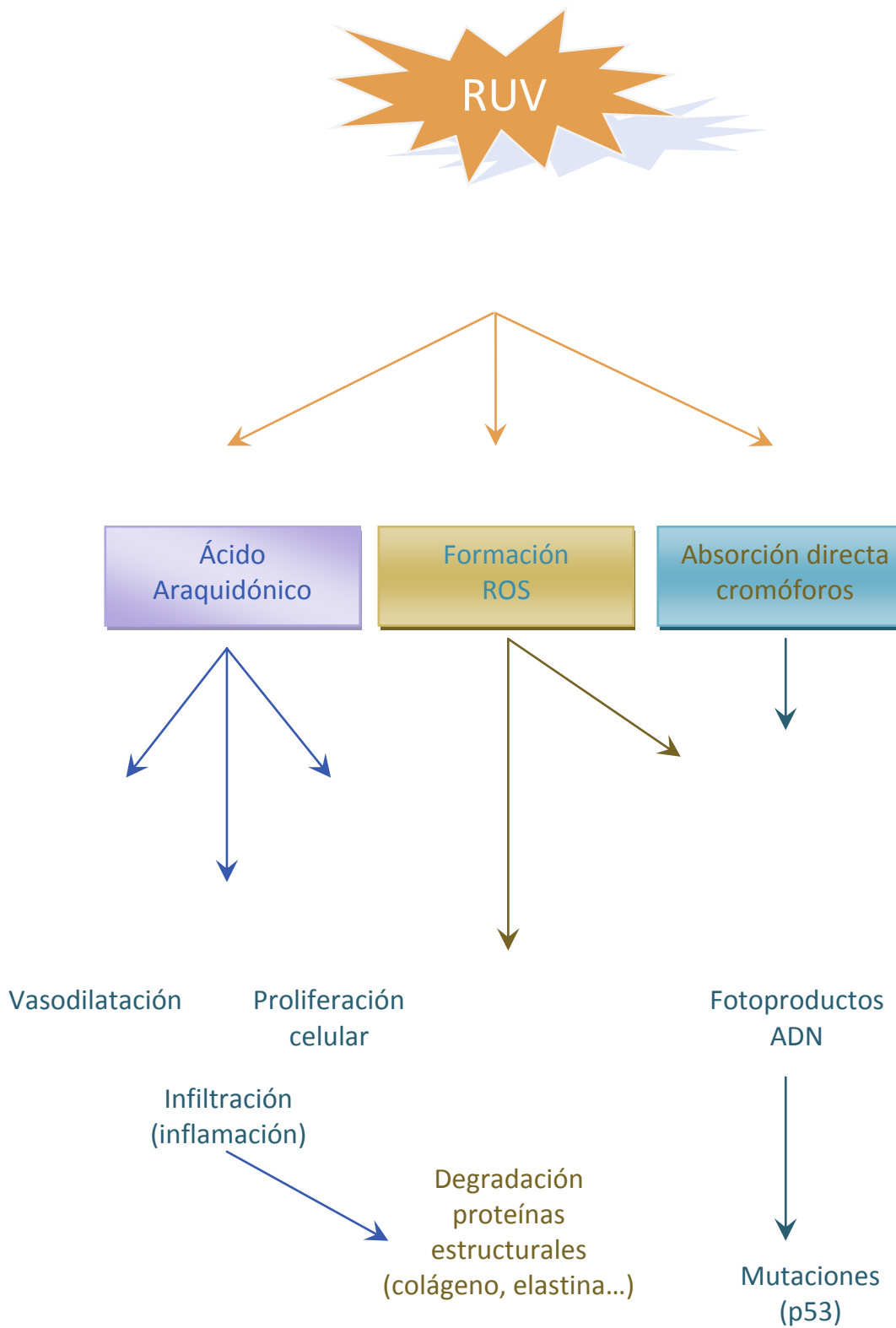


Fig VI-1. Mecanismos de la patogenia del fotoenvejecimiento y carcinogénesis (Gil, 2014)

a) Trastornos vasculares dérmicos: 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) Degradación de las proteínas estructurales con alteración de la arquitectura dérmica: Las especies reactivas de oxígeno inducidas por RUV (ROS) se han implicado en el fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis. Además de causar cambios genéticos permanentes que implican protooncogenes y genes supresores de tumores, las ROS activan las vías de transducción de señales citoplasmáticas que están relacionados con la diferenciación de crecimiento, senescencia, la

transformación y la degradación del tejido (proteínas dérmicas como el colágeno, elastina...) (Scharffetter-Kochanek, 1997).

De esta forma, la RUV provoca elastosis actínica, también llamada elastosis solar, término que hace referencia a los cambios degenerativos predominantemente histopatológicos que se producen en la piel dañada por el sol, que se manifiestan clínicamente por una coloración amarillenta, engrosamiento y arrugas prominentes de la piel (Nurnberger, 1978). El material elastótico observado en la elastosis actínica tiene su origen en las fibras elásticas que han sido degradadas por la inflamación crónica. Alternativamente, puede ser nuevo tejido elástico que se sintetiza por los fibroblastos dañados por el sol (Lavker, 1988).

En la dermis papilar y reticular superior, el tejido elástico muestra mayor cantidad de sustancia fundamental amorfa e hiperplasia de fibras elásticas, que ha sido definida como elastosis grado I y II. A continuación, las fibras elásticas se vuelven hipertróficas, ramificadas y enredadas, y tienden a agregarse en masas densas (elastosis grado III). La proporción de tejido elástico/colágeno se incrementa y es proporcional a la gravedad del daño actínico. En las lesiones más graves, los cambios elastóticos, incluyendo la degeneración basófila y masas amorfas, son fácilmente visibles. El material elastótico degenerado de

las lesiones tempranas está principalmente compuesto por fibras de elastina, proteínas microfibrilares y fibronectina (Bernstein, 1995). Además, está presente un aumento en el ARN mensajero para elastina y fibrilina en los fibroblastos de la piel fotodañada, un hallazgo que es consistente con la fase regenerativa que ocurre en las lesiones tempranas (Eric, 2002).

c) Daño genómico. El daño en el ADN inducido por RUV, en forma de dímeros de pirimidina ciclobutano, es conocido como un importante iniciador molecular para la supresión de la respuesta inmune y la iniciación de la carcinogénesis inducida por RUV.

Por otra parte, la citocina inmunorreguladora IL-12 también ha demostrado su eficacia en la reparación del fotodaño del ADN de las células de la piel inducido por RUV (Schwarz, 2002). Dependiendo de la gravedad del daño producido en el ADN, los queratinocitos pueden progresar ya sea a la apoptosis o a vías de reparación del ADN. Si el daño del ADN es irreparable, el ciclo celular es detenido y el queratinocito se transforma en una célula de quemadura solar, que es un indicador morfológico temprano de la apoptosis de las células epidérmicas (Ziegler, 1994).

En nuestro modelo, las primeras alteraciones desarrolladas tras la exposición a RUV consistió en la presentación de **eritema**,

caracterizado por zonas extensas de enrojecimiento que afectaban al lomo y a la porción posterior de la cabeza y el cuello. En principio era reversible, ya que se presentaba a partir de la primera sesión de exposición a las radiaciones UV y desaparecía a los diez minutos de acabada la sesión. Sin embargo, durante el transcurso del experimento se hacía permanente, mostrando un patrón reticulado y variando la coloración a rojo-violácea. En las últimas fases del estudio mostraba aspecto telangiectásico. Autores como Finsen (1899), Partington (1954), Logan (1963) y Diffey (1987) han descrito la formación del citado fenómeno. El significado patológico ha sido establecido en que la primera respuesta a la irradiación UV es la inflamatoria, consistente en una vasodilatación de los vasos sanguíneos cutáneos, que da como resultado el eritema.

Tras las primeras exposiciones, la producción de eritema era bifásica con un eritema inmediato inicial observado antes de la finalización de la exposición, seguido por una reacción más aguda, por lo general de mayor magnitud, que se presentaba a partir de la primera hora, y alcanzaba su pico máximo a las 24-48 h. El enrojecimiento que se produce en esta etapa es debido a un aumento en la vasodilatación (Logan, 1963). Estudios posteriores, utilizando instrumentos más sensibles, que medían la reflectancia, demostraron que la

vasodilatación perceptible visualmente, precedía al eritema (Diffey, 1987).

El grado de eritema observado después de tratamiento con luz UV aumenta proporcionalmente con la dosis hasta por lo menos 15 MED, dependiendo del tipo de piel. Con dosis más altas, se observan ampollas y otras lesiones graves. La respuesta de eritema también se ve influida por factores ambientales, como el calor, el viento, o la humedad (Owens, 1974)

Los ratones SKH1 desarrollan una reacción de quemadura solar típica, que se caracteriza por edema, eritema e inflamación. Los aumentos en el flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular así como las alteraciones en la expresión de moléculas de adhesión vascular promueven la proliferación de células inflamatorias: neutrófilos y monocitos. Los neutrófilos activados producen mieloperoxidasa, que cataliza la producción de ROS. Monocitos y macrófagos fagocitan el tejido dañado. Las células inflamatorias segregan factores quimiotácticos y de crecimiento que promueven la multiplicación de células inflamatorias y la reparación de tejidos (Rivas, 1994; Clydesdale, 2001).

Para determinar el efecto sobre el fotoenvejecimiento de varias fracciones del espectro solar, Kligman y col. (1982) expusieron ratones SKH-1 a radiaciones UVA y UVB. Los cambios inducidos por los rayos UVB eran similares a los observados en el estudio anterior, pero en menor grado, debido a la menor dosis de radiación (2 MEDs por exposición) (Kligman, 1995). La dosis eritema-mínima es la menor dosis de radiación UV que causa la inflamación cutánea perceptible. En ratones SKH1, la MED generalmente empleado para las fuentes de radiación de luz ultravioleta es de aproximadamente 0.224 J/cm^2 (Wilgus, 2000).

Por otra parte, el daño oxidativo mediado por ROS implica a un gran número de moléculas biológicas, ya que causa modificación del ADN, peroxidación de lípidos y secreción de citocinas inflamatorias. Para hacer frente a los efectos nocivos del estrés oxidativo, la piel de los mamíferos está equipada con mecanismos de defensa antioxidante. Estos evitan la lesión oxidativa de las estructuras de lípidos y proteínas, que contribuyen a la integridad de la barrera, que es esencial para la condición de una piel sana. Esto sugiere que el entorno celular redox juega un papel fundamental en la homeostasis de la piel y que las enfermedades de la piel podrían ser el resultado de un desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes.

El sistema antioxidante de la piel consiste en una red enzimática (glutación peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa) y no enzimática (α -tocoferol, ubiquinona, β -caroteno, ascorbato y glutación). Los antioxidantes endógenos, α -tocoferol y β -caroteno, que aparecen concentrados en las membranas y que funcionan como protectores contra la peroxidación lipídica, interactúan preferentemente con los radicales peroxilo lipídicos libres. Los peróxidos de lípidos y sus productos de degradación, como malonaldehído y 4-hidroxi-2-nonenal, pueden afectar directa o indirectamente a la homeostasis celular y de los órganos.

Igualmente, se observaban otros cambios adaptativos después de la exposición a la luz UV. Estos incluyen aumento de la vascularización (Soffen, 1961), engrosamiento de la piel y de la melanogénesis (bronceado) (Rosario, 1979).

El **engrosamiento** de la piel se debe tanto a la hiperplasia de la epidermis como al aumento del grosor del estrato córneo (Pearse, 1987). Los efectos de la hiperplasia de una sola exposición sobre la piel del ratón pueden durar hasta dos semanas (Ouhtit, 2000). Estos cambios resultan en una reducción global de la función de barrera de la piel (Mortensen, 2013).

En nuestro estudio, todos los animales mostraron este fenómeno a partir de 50 sesiones, en toda la superficie cutánea del dorso, caracterizado 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. Frecuentemente era observado en las áreas cutáneas próximas a las zonas con otras alteraciones (displasia, carcinoma, etc..) aunque a veces se observaban como focos aislados. Asimismo microscópicamente observamos acantosis acompañada de papilomatosis, caracterizada por engrosamiento irregular de la epidermis con mayor o menor grado de papilomatosis. 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.

No obstante, al revisar la bibliografía, existe disparidad, aunque existe acuerdo general de que el espesor de la capa córnea no cambia con la edad. En un estudio que compara los efectos del envejecimiento intrínseco y extrínseco, el examen histopatológico de 83 biopsias de piel expuesta al sol vs piel protegida en voluntarios sanos de 6 a 84 años reveló que el espesor de la epidermis es constante con el paso del tiempo, tanto en las zonas expuestas, como protegidas del sol, siendo mayor en las zonas expuestas al sol (El Dommiati, 2002). En un estudio

diferente, la capa espinosa de una arruga se demostró que era más delgada en la base que en los flancos (Contet-Audonneau, 1999), además, según este estudio, los gránulos de queratohialina presentes en la base de las arrugas eran menores que en los flancos de la misma.

Distintos investigadores han descrito que las **arrugas** se pueden formar como resultado de la inconsistencia de la unión entre la dermis y la epidermis, debido a la degradación de las fibrillas de anclaje (Craven, 1997). Otro estudio más reciente mostró pérdidas más marcadas de colágeno VII en la base de la arruga (como sucede con el colágeno IV en el mismo estudio) (Contet-Audonneau, 1999).

En la piel joven, el colágeno I comprende el 80% y el colágeno III comprende alrededor de 15% del total de colágeno de la piel; en la piel de los ancianos, la relación entre el tipo I y el tipo III disminuye, debido a una pérdida apreciable de colágeno tipo I (Oikarinen, 1990). Además, el contenido de colágeno total por unidad de área de superficie de la piel disminuye aproximadamente un 1% por año (Shuster, 1975). En la piel irradiada, los niveles de colágeno se reducen en un 59% (Fisher, 1997); esta reducción fue utilizada para clasificar el grado de daño producido por el sol (Griffiths, 1993). Aunque el colágeno I es el más importante y abundante en la piel, los efectos del envejecimiento en la dermis humana se observan en otros tipos de colágeno.

En nuestro modelo también observamos la presencia de arrugas cutáneas (lesiones que se corresponden con el apartado b: degradación de las proteínas estructurales con alteración de la arquitectura dérmica). Se hacían patentes a partir de la 10ª o 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 respecto a las neoplasias.

En relación con este tema, una de las mayores alteraciones de la piel fotoenvejecida corresponde a la deposición de grandes cantidades de material elástico anormal, que se denomina elastosis solar (Bernstein, 1995). En diversos estudios, desde el primero de Kligman realizado en 1982 en el mismo modelo animal que el utilizado en nuestro estudio, se ha demostrado 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 (Eric, 2002). En nuestro estudio, destacaba en la dermis el engrosamiento marcado, tanto de la zona papilar, por el aumento y la disposición

214

tortuosa de los capilares sanguíneos y de la red capilar subpapilar, como de la reticular, destacando los fenómenos de desorganización de la estructura general así como la disposición del entramado de las fibras colágenas y elásticas. En este sentido se podían distinguir tres grados de alteración de dicha disposición: Grado I, en el que predominaban las fibras mal organizadas, dispuestas preferentemente de forma individualizada; Grado II, en el que las fibras con estas características alternaban con zonas que se disponían en cúmulos irregulares y compactos de elastina, ligeramente basófilos; y el Grado III, en el que observábamos el predominio marcado de los cúmulos compactos de elastina.

Por otra parte, en nuestro estudio, a partir de la 36ª semana, eran muy frecuentes las lesiones eritemato-escamosas, que se disponían usualmente en placas irregulares, con el centro de aspecto erosivo y bordes sobreelevados y 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. De la misma forma, eran también muy frecuentes las lesiones ulceradas.

Microscópicamente destacaban en estas zonas las áreas de atrofia epitelial que alternaban con otras de engrosamiento en las que se observaban hiperplasia de células basales, acantosis con o sin papilomatosis, con frecuente pleomorfismo celular y nuclear, así como fenómenos de hiperqueratosis y paraqueratosis, disqueratosis y diversos grados de displasia.

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

Microscópicamente correspondían a múltiples áreas de carcinoma "in situ", con algunos focos de carcinoma microinvasor o bien 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 observamos lesiones similares al carcinoma de células basales, correspondiendo la mayoría al carcinoma epidermoide o espinocelular. En algunas ocasiones, la morfología era totalmente superponible a la

del queratoacantoma, aunque en los casos de nuestro estudio mostraban claramente signos de invasión dérmica. 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.

Estos fenómenos (que están relacionados con el apartado c, del mecanismo patogénico descrito al principio de este apartado), se han referido por diversos autores como consecuencia del daño originado por la RUV sobre el ADN que puede dar lugar a alteraciones genómicas. Estas varían desde mutaciones puntuales a dislocaciones cromosómicas. Una consecuencia importante de la exposición a RUV de la piel es el daño en las células de la epidermis. Esto se hace evidente a las 2 horas después de la exposición. El primer indicador de daño es una alteración celular que da lugar a la formación de células **disqueratósicas** (Hwang, 2011). Asimismo se han observado cambios similares en las células de Langerhans, que son más sensibles al daño inducido por RUV que los queratinocitos, tanto para las longitudes de onda UVA como UVB. Los cambios degenerativos en las células de Langerhans y en los queratinocitos incluyen ruptura mitocondrial, condensación del citoplasma y la aparición de núcleos picnóticos (Maverakis, 2010).

Los cánceres de piel no melanoma tienen una mayor incidencia que los melanomas y afortunadamente son mucho más fáciles de tratar y presentan mejor pronóstico. Las dos formas principales, carcinomas de células basales y los carcinomas de células escamosas, se originan en los queratinocitos epidérmicos. La gran mayoría de los cánceres derivados de los queratinocitos, en humanos, se desarrollan en las áreas de la piel más expuestas a los rayos UV, como la cara y los brazos. Existe evidencia epidemiológica y molecular que relaciona todas las formas de cáncer de piel con la exposición UV, y se estima que la radiación UV es causante de casi el 65% de los melanomas y el 90% de los cánceres de piel no melanoma (Pleasant, 2010).

Estas mutaciones proporcionan una herramienta para deducir de manera retrospectiva, a partir de las mutaciones halladas en tumores, el carcinógeno original. Casi todas las mutaciones por RUV B y C creadas de forma experimental se localizan en 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 fotosensible de ROS. Dado que hay muchos carcinógenos que generan esta lesión oxidativa, no puede identificarse si la fuente de las mutaciones fueron los rayos UVB, los UVA, 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→G. Estos intercambios se observan raramente con las UVB u otros carcinógenos, por lo que se ha propuesto que esta sea la consecuencia de la UVA (Halliday, 2005).

Como resultado, el aumento de la peroxidación de lípidos de membrana puede evocar la respuesta inflamatoria inmune y activar la expresión génica y proliferación celular, o iniciar la apoptosis. Por lo tanto, existe una estrecha relación entre la producción de ROS, deterioro de defensa antioxidante, daño de la membrana y procesos patológicos inflamatorios o degenerativos.

La evidencia acumulada sugiere que las ROS participan en todas las etapas del desarrollo del cáncer (Marnett, 2000). Debido a los posibles efectos perjudiciales de las ROS, las células utilizan diversos mecanismos para modular los niveles intracelulares y extracelulares de estos compuestos. La defensa antioxidante enzimática de la piel incluye dismutasa cobre-cinc superóxido (CuZnSOD), manganeso SOD (MnSOD) y catalasa. SOD convierte los aniones superóxido en peróxido de hidrógeno mientras que la catalasa degrada el peróxido hidrógeno en agua. La actividad de estas enzimas, que mantienen el equilibrio redox dentro de las células, se ha demostrado que está modulada por la

radiación UVB y UVA en células de la piel tanto in vitro (Leccia, 2001) como in vivo en modelos murinos (Okada, 1994).

Sander y colaboradores (2003), demostraron que el estrés oxidativo puede jugar diferentes papeles en la patogenia tanto del melanoma como del cáncer de piel no melanoma. Es probable que en los cánceres de piel no melanoma, exista una disminución de la defensa antioxidante, causada por la exposición a radiación UV crónica, que contribuya a la aparición de mutaciones y a la carcinogénesis.

El **segundo objetivo** que nos planteamos en nuestro trabajo, consistió en intentar conocer los efectos de los compuestos ensayados (ácido Carnósico, Apigenina potásica y ácido Rosmarínico) sobre nuestro modelo de fotoenvejecimiento cutáneo desarrollado en el primer objetivo, es decir, su posible papel como fotoprotectores.

Durante los últimos años, la humanidad ha tomado conciencia del peligro de la radiación solar, por lo que ha tratado de evitarla. La experiencia había demostrado que el estar mucho tiempo expuesto al sol dañaba y envejecía prematuramente la piel, además de broncearla excesivamente. De ahí que entre la población del hemisferio norte, la piel blanca constituyese, durante los últimos veinticinco siglos un componente esencial de la belleza, hasta que en el primer tercio del siglo XX, comienza a cambiar esta creencia y a considerar al bronceado como un factor cosmético importante, marcador de belleza e incluso saludable (Vicente, 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 el cáncer cutáneo.

Los protectores o filtros solares son sustancias que aplicadas sobre la piel o de forma sistémica, atenúan la acción perjudicial de los rayos solares. Estas sustancias aparecieron durante los años cuarenta para la protección solar de los marines norteamericanos que combatían en el pacífico, durante la segunda guerra mundial. Desde entonces su aplicación se ha ido popularizando de tal manera que su uso es casi universal y en franco aumento.

La familia *Lamiaceae* es una importante fuente de especies de plantas que contienen grandes cantidades de ácidos fenólicos, por lo que es considerada una fuente de antioxidantes naturales.

Rosmarinus officinalis L. es una planta distribuida por todo el mundo y tiene muchos compuestos con actividad antioxidante, en su mayoría polifenoles. Los antioxidantes más importantes componentes en esta especie vegetal son ácido Carnósico, ácido cafeico y sus derivados tales como el ácido Rosmarínico (AR), que tiene una potente actividad antioxidante (estos dos ácidos han sido utilizados en nuestro estudio).

De esta forma, extractos de hojas de romero fueron propuestos como importantes factores dietéticos humanos y han sido investigados como potenciales agentes terapéuticos contra varias enfermedades (Petiwala, 2013; Johnson; 2011; Ngo, 2011). Se han descrito múltiples actividades biológicas para el ácido Rosmarínico, tales como, antiinflamatorio, antimutagénico y antitumoral (Osakabe, 2004) y antiviral (Astani, 2012)

En nuestro trabajo, hemos utilizado tres compuestos polifenólicos con acción antioxidante. El **ácido Carnósico** es el diterpeno antioxidante más abundante presente en las hojas de romero. Es un antioxidante lipofílico que neutraliza el oxígeno singlete, radicales hidroxilo y radicales peroxilo lipídicos, evitando así la peroxidación de los lípidos y la alteración de las membranas biológicas (Aruoma, 1992; Haraguchi, 1995.). Su actividad para la eliminación de radicales libres, sigue un mecanismo análogo a la de otros antioxidantes tales como α -tocoferol y es causada por la presencia de dos grupos O-fenólicos hidroxilo que se encuentran en C11 y C12 de su molécula (Richheimer, 1999). El ácido Carnósico (AC), es capaz de actuar como regulador negativo de la inflamación. Existe evidencia de que el AC tiene diversas actividades farmacológicas, tales como la inhibición de la proliferación de las células de leucemia promielocítica humana HL - 60 y U937

(Danilenko, 2003). Además, AC ha demostrado que tiene propiedades antiinflamatorias, reduce la expresión de moléculas de adhesión inducida por citoquinas, bloquea la adhesión de los monocitos a las células endoteliales, y previene la migración de células de músculo liso aórticas humanas mediante la supresión la expresión de MMPs (Yu 2009).

La **Apigenina** es un flavonoide común que se encuentran en una gran cantidad de frutas y verduras, como el perejil, cebolla, brotes de trigo, manzanilla, condimentos, té y naranja (Ross, 2002). Químicamente corresponde a la fórmula 4', 5, 7,-trihidroxiflavona, ($C_{15}H_{10}O_5$). Esta ha cobrado gran interés, debido a sus beneficios para la salud y su capacidad para inhibir el desarrollo de diferentes tipos de cáncer (de piel, próstata, colon, de mama y de tiroides) (Chen, 2007). También posee propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Rezai-Zaded, 2008). Además, existen estudios que ponen de relieve su capacidad para inhibir la actividad de las MMP y de la expresión de COX-2 en fibroblastos y queratinocitos dérmicos en piel irradiada con RUV (Sim, 2007).

El **ácido Rosmarínico** (AR), es un compuesto polifenólico soluble en agua, que reduce el nivel de ROS intracelulares, la expresión del

VEGF H₂O₂-dependiente y la liberación de IL-8. Estas actividades están relacionadas con el potencial antiangiogénico del AR (Huang, 2006).

En nuestro trabajo, la evolución temporal de las lesiones cutáneas de los animales de todos los grupos, durante las primeras 50 sesiones, fue superponible y se caracterizaba por eritema y engrosamiento cutáneo irregular, con reforzamiento del patrón geométrico de la piel y múltiples arrugas longitudinales en el dorso.

No obstante, a partir de la sesión nº 50, los animales de los grupos I (Control), II (ácido Carnósico) y III (Apigenina) exhibieron lesiones similares, mientras que los del grupo IV (ácido Rosmarínico) lo hicieron más tarde (sesión 53). A partir de este momento, las lesiones evolucionaron de forma similar en todos los grupos, transformándose en eritemato-escamosas, aumentando progresivamente en número y extensión, y confluyendo en placas irregulares erosivas de bordes sobreelevados, tapizadas por costras fibrino-hemorrágicas.

En este sentido, observamos cierto retraso en la presentación de las lesiones (DT50, semana en la que al menos la mitad de los animales presentaba lesiones) en los animales tratados con ácido Carnósico (grupo II) aunque sin diferencias estadísticamente significativas (d.e.s.) respecto a los controles (Grupo I), mientras que los de los grupos

Apigenina (grupo III) y Ácido Rosmarínico (grupo IV) fueron superponibles a las del control.

Sin embargo, al comparar los valores expresados en mm^2 para el área total lesionada en cada grupo, existían d.e.s. entre todos los grupos tratados y el control: Grupo I (Control): 190.43, Grupo II: 71.58, Grupo III: 104.72, Grupo IV: 132.10.

Observamos como el grupo tratado con ácido Carnósico mostraba los mejores resultados.

En cuanto al tamaño medio de cada lesión, también observamos una reducción significativa en todos los grupos tratados. Frente a los 62.62 mm^2 observados en el grupo Control, destacan los 10.91 mm^2 presentados por el Grupo II (ácido Carnósico), siendo en los otros dos grupos: 36.31 y 44.59 (Apigenina y ácido Rosmarínico respectivamente).

Respecto a las lesiones microscópicas, la incidencia de lesiones neoplásicas fue del 60 % en los grupos II y IV, tratados con los ácidos Carnósico y rosmarinínico, mientras que en el grupo tratado con Apigenina fue del 90 %, superponible a los del grupo Control, que mostró una incidencia del 100%. Es decir que el tratamiento con AC y AR provocó inhibición de la fotocarcinogénesis, con una reducción del 40 % en la incidencia de lesiones neoplásicas respecto al control (d.e.s).

Nuestro **tercer objetivo** consistió en el estudio de la proliferación celular en los tumores desarrollados. El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una molécula de 36-KDa que funciona como molécula accesoria de la ADN polimerasa y que se requiere en el proceso de síntesis del ADN en la fase S del ciclo celular. El PCNA se asocia fuertemente con regiones donde está ocurriendo síntesis de ADN y se correlaciona con otros marcadores de proliferación celular como Ki67 y mitosis, expresándose en células que se encuentran en proliferación activa (Kelman, 1997). Se ha encontrado que la reacción inmunohistoquímica con este marcador es útil en la predicción de agresividad en algunos tumores con una tasa de proliferación alta (Ben-Ihzak, 2002).

El índice de proliferación celular utilizando PCNA se ha descrito como un factor pronóstico independiente de supervivencia (Niezabitowski, 1999), ya que su expresión se encuentra incrementada en lesiones de mayor grado de malignidad tanto en el cáncer cutáneo no-melanoma como en el melanoma (Ruksha, 2007). Nosotros observamos una mayor expresión de PCNA en los tumores desarrollados por los animales del grupo control que en los de los grupos tratados, destacando la menor tasa de proliferación de los tumores del grupo tratado con ácido Rosmarínico. Este agente, además de inhibir el proceso de

fotocarcinogénesis en los animales de nuestro modelo, ha provocado una menor tasa de proliferación de los tumores desarrollados, por lo que consideramos a éstos, de menor agresividad y mejor pronóstico que los del grupo control. No hemos encontrado en la bibliografía consultada, trabajos en los que se estudie el efecto del ácido Rosmarínico sobre la proliferación celular de tumores con PCNA, pero Makino y cols. (2002) encontraron que la administración oral de ácido Rosmarínico (100 mg/kg/día) en ratas en un modelo de glomerulonefritis mesangial, reducía el número de células PCNA positivas en el mesangio (Makino, 2002).

Por tales motivos, concluimos que los tres compuestos polifenólicos han demostrado efectos fotoprotectores en nuestro estudio.

En la bibliografía consultada hemos encontrado diferentes trabajos que evalúan los efectos fotoprotectores de distintos polifenoles sobre ratones SKH1 sometidos a radiación ultravioleta. Así con respecto al ácido Carnósico y sus metabolitos (principalmente carnosol), existe evidencia sobre el efecto anticancerígeno (Barni, 2012), antiinflamatorio (Johnson, 2011) y como potente captador de ROS (Danilenko, 2003). De la misma forma, la Apigenina, ha demostrado efectos antioxidantes (Choi, 2009) y anticancerígenos (Zheng, 2005). El

ácido Rosmarínico se ha utilizado como inhibidor de la inflamación (Osakabe, 2004) y como quimiprotector frente al cáncer (Patel, 2007).

Resumen

VII. Resumen

La exposición a la radiación solar provoca daños sobre la piel, que incluyen: eritema, quemaduras, inmunosupresión, etc; y a largo plazo fotoenvejecimiento (término acuñado por Kligman en 1982) y cáncer de piel. De ahí que estas patologías sean en gran parte prevenibles al evitar la exposición excesiva al sol y con la utilización de fotoprotectores.

Los objetivos de nuestro estudio, correspondieron al desarrollo de un modelo de fotoenvejecimiento en ratones SKH1, que fuera reproducible y fiable, para posteriormente estudiar los posibles efectos fotoprotectores de algunos compuestos polifenólicos.

Para su realización utilizamos 40 ratonas SKH1/CRL, que fueron expuestas a radiación ultravioleta (98.6 % RUV-A y 1.4 RUV-B), 60 minutos por sesión, tres veces a la semana, durante 80 sesiones, con un total de 1.688 J/cm^2 de energía recibida por animal. Las ratonas se dividieron en cuatro grupos (n = 10). El primero (Control) sólo recibió RUV y a los tres restantes, además de RUV, se añadió a la dieta, ácido Carnósico (Grupo II), Apigenina (Grupo III) y ácido Rosmarínico (Grupo IV), a la dosis de 1 mg /animal/día.

En nuestro estudio todos los animales expuestos a las RUV presentaron las alteraciones características del fotoenvejecimiento y

fotocarcinogénesis cutánea (entre 65 y 80 sesiones), por lo que lo consideramos que el modelo experimental desarrollado es idóneo para el estudio de esta patología. No obstante hemos encontrado diferencias entre los animales de los distintos grupos experimentales en cuanto al tiempo de presentación de las lesiones, su extensión, e intensidad, fundamentalmente en las 4 variables estudiadas, (DT 50: semana en la que al menos la mitad de los animales del grupo mostraban lesión), área total lesionada, tamaño medio de las lesiones, e incidencia microscópica de lesiones neoplásicas malignas).

Clínicamente en los animales pertenecientes al Grupo IV (ácido Rosmarínico), destacaba que la piel del dorso presentaba menor número de arrugas y un aspecto general más saludable que los de los otros grupos hasta la sesión 50.

En cuanto a la semana en la que al menos la mitad de los animales del Grupo presentaban lesión (**DT 50**), solo observamos retraso en los animales del Grupo II (Ácido Carnósico) que presentaban una DT50 = 70, mientras que en los de los Grupos I (Control) y Grupo IV (ácido Rosmarínico) era idéntica : 60 (DT50=60), y en el Grupo III tratado con Apigenina era de 52.

En la media del **área total lesionada** observamos una reducción que era mayor en los Grupos II (Ácido Carnósico) con 71.58 seguido del Grupo III (Apigenina) con 104.72 y del Grupo IV (Ácido Rosmarínico) con 132.10, respecto al Grupo I(Control): 190.43. De modo similar, también observamos esa reducción respecto al **tamaño medio de las lesiones**, que era: Grupo II: 10.91, Grupo III :36.31, Grupo IV : 44.59 y Grupo I: 62.65.

En cuanto a la incidencia microscópica de las lesiones neoplásicas malignas, en los Grupos II (Ácido Carnósico) y IV (Ácido Rosmarínico) se presentaron en 6 animales, mientras que en el III (Apigenina) ocurrían casi en todos los animales (9) y en todos los del Grupo I (Control).

De estos resultados parece deducirse que tanto el ácido Carnósico como el Rosmarínico poseen propiedades fotoprotectoras y anticarcinogénicas, probablemente debidas a su actividad antioxidante.

Conclusiones

VIII. Conclusiones

1. La exposición crónica a la RUV (80 sesiones) desarrolló en todos los animales del grupo control, todo el espectro lesional característico del fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis cutáneos.
2. Solo los animales del Grupo II (ácido Carnósico), mostraron retraso en la presentación de lesiones (DT50 respecto al grupo I (Control): 70 vs 60.
3. Los Grupos II (ácido Carnósico), III (Apigenina) y IV (ácido Rosmarínico) presentaron una media menor de las áreas lesionadas y del tamaño medio de las lesiones que los del Grupo Control (I).
4. La expresión del marcador de proliferación celular PCNA, fue menor en los tumores de los animales tratados que en los del grupo I (Control), existiendo diferencias significativas con el ácido Rosmarínico.

Bibliografía

IX. Bibliografía

Adlercreutz CH, Goldin BR, Gorbach SL, Höckersted KA, Watanabe S, Hämäläinen EK, et al. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J Nutr.* 1995; 125(3 (suppl)): p. 757S-770S.

243

Afaq F, Katiyar SK. Polyphenols: Skin Photoprotection and Inhibition of Photocarcinogenesis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* 2011; 11(14): p. 1200-1215.

Aherne SA, O'Brian NM. Dietary flavonols: chemistry, food content. *Nutrition.* 2002; 18(1): p. 75-81.

Alcaraz M, Acevedo C, Castillo J, Benavente García O, Armero D, Vicente V, et al. Liposoluble antioxidants provide an effective radioprotective barrier. *Br J Radiol.* 2009; 82(979): p. 605-609.

Alleman BI, Baumann L. Antioxidants used in skin care formulations. *Skin Therapy. Skin Therapy Lett.* 2008; 13(7): p. 5-9.

American Cancer Society. [Online].; 2012. Available from:
HYPERLINK "http://www.cancer.org/Cancer/SkinCancer-BasalandSquamousCell/DetailedGuide/skin-cancer-basal-and-squamous-cell-key-statistics"

<http://www.cancer.org/Cancer/SkinCancer->

[BasalandSquamousCell/DetailedGuide/skin-cancer-basal-and-squamous-cell-key-statistics](#) .

Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinae N. Dietary Intakes of Flavonols, Flavones and Isoflavones by Japanese Women and the Inverse Correlation between Quercetin Intake and Plasma LDL Cholesterol Concentration. *The Journal of Nutrition*. 2000; 130(9): p. 2243-2250.

Arango D, Morohashic K, Yilmaz A, Kuramochid K, Pariharb A, Brahimaj B, et al. Molecular basis for the action of a dietary flavonoid revealed by the comprehensive identification of apigenin human targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(24): p. E2153-E2162.

Armstrong B, Brenner DJ, Baverstock K, Cardis E. A review of human carcinogens. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2012; 100 D.

Arts ICW, Hollman PCH, Bas Bueno de Mesquita H, Feskens EJM, Kromhout D. Dietary catechins and epithelial cancer incidence: the Zutphen elderly study. *International Journal of Cancer*. 2001; 92(2): p. 298-302.

Astani A, Reichling J, Schnitzler P. Melissa officinalis extract inhibits attachment of herpes simplex virus in vitro. *Chemotherapy*. 2012; 58(1): p. 70-77.

Auroma OI, Halliwell B, Aeschbach R, Löliger J. Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica*. 1992; 22(2): p. 257-267.

Avci P, Sadasivam M, Gupta A, MelowANESSA D, Huang YY, Yin R, et al. Animal models of skin disease for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2013; 8(3): p. 331-355.

Barni MV, Carlini MJ, Cafferata EG, Puricelli L, Moreno S. Carnosic acid inhibits the proliferation and migration capacity of human colorectal cancer cells. *Oncol Rep*. 2012; 27(4): p. 1041-1048.

Bech-Thomsen N, Wulf HC. Sunbathers' application of sunscreen is probably inadequate to obtain the sun protection factor assigned to the preparation. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*. 1992; 9(6): p. 242-244.

Becker JC, Houben R, Schrama D, Voigt H, Ugurel S, Reisfeld RA. Mouse Models for melanoma: a personal perspective. *Exp Dermatol*. 2010; 19(2): p. 157-164.

Beckman CH. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2000; 57(3): p. 101-110.

Benavente García O, Castillo J. Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity. *Journal of Agricultural and Foods Chemistry*. 2008; 56(15): p. 6185-6205.

Benavente-García O, Castillo J, Marín FR, Ortuño A, Del Rio JA. Uses and Properties of Citrus Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997; 45(12): p. 4505-4515.

Benavides F, Oberyszyn TM, VanBuskirk AM, Reeve VE, Kusewitt DF. The Hairless Mouse in Skin Research. *J Dermatol Sci*. 2009; 53(1): p. 10-18.

Ben-Ihzak O, Bar-Chana M, Sussman L, Dobiner V, Sandbank J, Cagnano M, et al. Ki67 antigen and PCNA proliferation markers predict survival in anorectal malignant melanoma. *Histopathology*. 2002; 41(6): p. 519-525.

Berger H, Tsambaos D, Mahrle G. Experimental elastosis induced by chronic ultraviolet exposure. Light- and electron-microscopic study. *Archives of Dermatological Research*. 1980; 269(1): p. 39-49.

Berking C. The role of ultraviolet irradiation in malignant melanoma. *Der Hautarzt*. 2005; 56(7): p. 387-397.

Bernstein BF, Underhill CB, Hahn PJ, Brown DB, Uitto J. Chronic sun exposure alters both the content and distribution of dermal glycosaminoglycans. *British Journal of Dermatology*. 1996; 135(2): p. 255-262.

Bernstein EF, Brown DB, Bernstein FU, Forbes D, Del Monaco M, Wu M, et al. 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): p. 269-273.

Birt DF, Mitchell D, Gold B, Pour P, Pinch HC. Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid. *Anticancer Res*. 1997; 17: p. 85-91.

Bissett DL, Chatterjee R, Hannon DP. Photoprotective effect of topical anti-inflammatory agents against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*. 1990; 7(4): p. 153-158.

Black A, Greaves M, Hensby C, Plummer N, Warin A. The effects of indomethacin on arachidonic acid and prostaglandins e2 and f2alpha levels in human skin 24 h after u.v.B and u.v.C irradiation. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 1978; 6(3): p. 261-266.

Blanpain C, Fuchs E. Epidermal Stem Cells of the Skin. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2006; 22: p. 339-373.

Bouissou H, Pieraggi MT, Julian M, Savit T. The elastic tissue of the skin. A comparison of spontaneous and actinic (solar) aging. *International Journal of dermatology*. 1988; 27(5): p. 327-335.

Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, et al. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991; 88(22): p. 10124-10128.

Brash DE. Sunlight and the onset of skin cancer. *Trends in Genetics*. 1997; 13(10): p. 410-414.

Brenner M, Hearing VJ. The protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. *Photochem Photobiol*. 2008; 84(3): p. 539-549.

Brown D, Peritz A, Mitchell D, Chiarello S, Uitto J, Gasparro F. Common fluorescent sunlamps are an inappropriate substitute for sunlight. *Photochemistry and Photobiology*. 2000; 72(3): p. 340-344.

Buck-Gu H, Sang-Uk C, Yun-Jum P, Jong-Hyang B, Su-Min P, Yong-Seo P, et al. Antiproliferative Activity of Korean Wild Vegetables on Different Human Tumor Cell Lines. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2009; 64(4): p. 257-263.

Budhreja A, Gao N, Zhang Z, Son YO, Cheng S, Wang X, et al. Apigenin induces apoptosis in human leukemia cells and exhibits anti-leukemic activity in vivo. *Mol. Cancer Ther*. 2012; 11: p. 132-142.

Burgeson RE, Nimni ME. Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1992;(282): p. 250-272.

Burren R, Scaletta C, Frenk E, Renato GP, Applegate LA. Sunlight and carcinogenesis: Expression of p53 and pyrimidine dimers in human skin following UVA I, UVA I + II and solar simulating radiations. *International journal of cancer*. 1998; 76(2): p. 201-206.

Cano A, Gómez FJ, Álvarez N, Sánchez-Pedreño P, Vicente V. Cutaneous photocarcinogenesis model SKH-1 mice by ultraviolet radiation. *Revista Española de Patología*. 2010; 43(4): p. 191-195.

250

Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, et al. Olive Oil and Red Wine Antioxidant Polyphenols Inhibit Endothelial Activation. Antiatherogenic Properties of Mediterranean Diet Phytochemicals. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2003; 23(4): p. 622-629.

Cartron E, Carbonneau MA, Fouret G, Descomps B, Léger CL. Specific antioxidant activity of caffeoyl derivatives and other natural phenolic compounds: LDL protection against oxidation and decrease in the proinflammatory lysophosphatidylcholine production. *J Nat Prod*. 2001; 64(4): p. 480-486.

Cavaillon JM. Cytokines and macrophages. *Biomed. Pharmacother*. 1994; 48: p. 445-453.

Chen D, Chen MS, Cui QC, Yang H, Dou QP. Structure–proteasome-inhibitory activity relationships of dietary flavonoids in human cancer cells. *Front Biosci*. 2007; 12: p. 1935-1945.

Choi EJ, Him GH. Apigenin causes G(2)/M arrest associated with the modulation of p21(Cip1) and Cdc2 and activates p53-dependent apoptosis pathway in human breast cancer SK-BR-3 cells. *J Nutr Biochem*. 2009; 20(4): p. 285-290.

Choi EJ, Kim GH. Apigenin induces apoptosis through a mitochondria/caspase-pathway in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2009; 44: p. 260-265.

Christiano AM, Uitto J. Molecular pathology of the elastic fibers. *The Journal of Investigative Dermatology.* 1994; 103(5): p. 53-57.

Chun OK, Chung SJ, Song WO. Estimated Dietary Flavonoid Intake and Major Food Sources of U.S. Adults. *The Journal of Nutrition.* 2007; 137(5): p. 1244-1252.

Clydesdale G, Dandie G, Muller K. Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects. *Immunology and Cell Biology.* 2001; 79: p. 547-568.

Cokkinides V, Weinstock M, Glanz K, Albano J, Ward E, Thun M. Trends in Sunburns, Sun Protection Practices, and Attitudes Toward Sun Exposure Protection and Tanning Among US Adolescents, 1998 –2004. *Pediatrics.* 2006; 118: p. 853-864.

Contet-Audonneau J, Jeanmarie C, Pauly G. A histological study of human wrinkle structures: comparison between sun-exposed areas of the face, with or without wrinkles, and sun-protected areas. *British Journal of Dermatology.* 1999; 140(6): p. 1038-1047.

Craven NM, Watson RE, Jones CJ, Shuttleworth CA, Kielty CM, Griffiths CE. Clinical features of photodamaged human skin are associated with a reduction in collagen VII. *The British Journal of Dermatology*. 1997; 137(3): p. 344-350.

Critchley HD. Electrodermal responses: what happens in the brain. *The Neuroscientist*. 2002; 8(2): p. 132-142.

Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary Phenolics: Chemistry, bioavailability and Effects on healthnAT pROD. *Nat Prod Rep*. 2009; 26(8): p. 1001-1043.

Danilenko M, Wang Q, Wang X, Levy J, Sharoni Y, Studzinski GP. Carnosic acid potentiates the antioxidant and prodifferentiation effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in leukemia cells but does not promote elevation of basal levels of intracellular calcium. *Cancer Res*. 2003; 63(6): p. 1325-1332.

de Gruijl F, Sterenborg H, Forbes P, Davies R, Cole C, Kelfkens G, et al. Wavelength dependence of skin cancer induction by ultraviolet irradiation of albino hairless mice. *Cancer Research*. 1993; 53(1): p. 53-56.

De Gruijl FR. Photocarcinogenesis: UVA vs UVB. *Methods Enzymol*. 2000; 319(3): p. 359-366.

De La Torre MC, Bruno M, Piozzi F, Savona G, Rodriguez B, Arnold NA. Terpenoids from *Salvia Willeana* and *S. Virgata*. *Phytochemistry*. 1990; 29(2): p. 668-670.

Del Baño MJ, Lorente J, Castillo J, Benavente García O, Del Río JA, Ortuño A, et al. Phenolic Diterpenes, Flavones, and Rosmarinic Acid Distribution during the Development of Leaves, Flowers, Stems, and Roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant Activity. *J Agric Food Chem*. 2003; 51(15): p. 4247-4253.

Del Rio D, Borges G, Crocier A. Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *British Journal of Nutrition*. 2010; 104(Suppl 3): p. S67-S90.

Del Rio JA, Gómez P, Baidez AG, Arcas MC, Botía JM, Ortuño A. Changes in the Levels of Polymethoxyflavones and Flavanones as Part of the Defense Mechanism of *Citrus sinensis* (Cv. Valencia Late) Fruits against *Phytophthora citrophthora*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52(7): p. 1913-1917.

Dennis LK, Beane Freeman LE, VanBeek MJ. Use and the risk formelanoma: a quantitative review Sunscreen. *Annals of Internal Medicine*. 2003; 139: p. 966-978.

Diffey BL, Oakley AM. The onset of ultraviolet erythema. *Br. J. Dermatol.* 1987; 116: p. 183-187.

D'Orazio J, Jarret S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV Radiation and the Skin. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14(6): p. 12222-12248.

Douki T, Reynaud-Angelin A, Cadet j, Sage E. Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. *Biochemistry.* 2003; 42(30): p. 9221-9226.

Draelos ZD. The cosmeceutical realm. *Clinics in dermatology.* 2008; 26: p. 627-632.

El Dommiati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F, et al. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Experimental Dermatology.* 2002; 11(5): p. 398-405.

Engelhardt M, Martens UM. The implication of telomerase activity and telomere stability for replicative aging and cellular immortality (Review). *Oncology Reports.* 1998; 5(5): p. 1043-1052.

Eric F, Bernstein MD. Reactive Oxygen Species Activate de Human Elastin Promoter in a Transgenic model of Cutaneous Photoaging. *Dermatol Surg.* 2002; 28(2): p. 132-135.

Escoffier C, De Rigal J, Rochefort A, Vasselet R, Lévêque JL, Agache PG. Age-related mechanical properties of human skin: an in vivo study. *The Journal of investigative Dermatology.* 1989; 93(3): p. 353-357.

Falk B. Effects of thermal stress during rest and exercise in the paediatric population. *Sports Medicine.* 1998; 25(4): p. 221-240.

Farage M, Miller K, Elsner P, Maibach H. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *International Journal of Cosmetic Science.* 2008; 30(2): p. 87-95.

Farr PM, Diffey BL. Quantitative studies on cutaneous erythema induced by ultraviolet radiation. *Br J Dermatol.* 1984; 111: p. 673-682.

Fernández-Abascal EG, Jiménez MP, Martín Díaz MD. Emoción y Motivación. La adaptación Humana Madrid: Centro de Estudios Ramón Areces; 2007.

Finsen NR. Ueber die Bedeutung der chemischen Strahlen des Lichtes für Medizin und Biologie. Leipzig: Vogel; 1899.

Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, et al. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature*. 1996; 379(6563): p. 335-339.

Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *The New England Journal of Medicine*. 1997; 337(20): p. 1419-1428.

Fitzpatrick TB. Soleil et peau. *J de Medecine Esthetique*. 1975; 2: p. 33-34.

Flip A, Clichici S, Daiacoviciu D, Adriana M, Postescu ID, Perdeschrepler M, et al. Photochemoprevention of cutaneous neoplasia through natural products. *Experimental Oncology*. 2009; 31(1): p. 9-15.

Frankel EN, Huang SW, Aeschbach R, Prior E. Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and Its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion. *J. Agric. Food Chem*. 1996; 44(1): p. 131-135.

Frenske N, Lower C. Structural and functional changes of normal aging skin. *Journal of the American Academy of dermatology*. 1986; 15(4 Pt 1): p. 571-585.

Gallagher RP, Spinelli JJ, Lee TK. Tanning Beds, Sunlamps, and Risk of Cutaneous. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2005; 14(3): p. 562-566.

García Lafuente A, Guillamón E, Villares A, Rostagno M, Matínez J. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm Res*. 2009; 58(9): p. 537-552.

Gates MA, Tworoger SS, Hecht JL, De Vivo I, Rosner B, Hankinson SE. A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2007; 121(10): p. 2225-2232.

Gates MA, Vitonis AF, Tworoger SS, Rosner B, Titus-Ernstoff L, Hankinson SE, et al. Flavonoid intake and ovarian cancer risk in a population-based case-control study. *Int J Cancer*. 2009; 124(8): p. 1918-1925.

Ghersetich I, Lotti T, Campanile G, Grappone C, Dini G. Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging. *International Journal of Dermatology*. 1994; 33(2): p. 119-122.

Ghiringhelli F, Rébé C, Hichami A, Delmas D. Immunomodulation And Anti-Inflammatory Roles Of Polyphenols As Anticancer Agents. *Ant-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2012; 12(1).

Ghohestani RF, Li K, Rousselle P, Uitto J. Molecular Organization of the Cutaneous Basement Membrane Zone. *Clinics in Dermatology.* 2001; 19(5): p. 551-562.

Gil AM. 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 Murcia; 2014.

Gilchrest BA, Mark MD, Eller S, Alan CG, Mina Yaar MD. The Pathogenesis of Melanoma Induced by Ultraviolet Radiation. *The New England Journal of Medicine.* 1999; 340(17): p. 1341-1348.

Gilchrest BA, Stoff JS, Soter NA. Chronologic Aging Alters the Response to Ultraviolet-induced Inflammation in Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology.* 1982; 79(1): p. 11-15.

Gilchrest BA. A review of skin ageing and its medical therapy. *Br J Dermatol.* 1996; 135(6): p. 867-875.

Gilchrest BA. Actinic injury. *Annual Review of Medicine.* 1990; 41: p. 199-210.

Glogau RG. Physiologic and Structural changes associated with aging Skin. *Dermatol Clin.* 1997; 15(4).

Gniadecka M, Nielsen OF, Wessel S, Heidenheim M, Christensen DH, Wulf HC. Water and protein structure in photoaged and chronically aged skin. *The Journal of Investigativa Dermatology*. 1998; 111(6): p. 1129-1133.

Godar DE, Urbach F, Gasparro FP, van der Leun JC. UV Doses of Young Adults. *Photochemistry and Photobiology*. 2003; 77(4): p. 453-457.

Grady H, Blum H, Kirby-Smith J. Pathology of tumors of the external ear in mice induced by ultraviolet radiation. *Jorunal National Cancer Institut*. 1941;(2): p. 269-276.

Graft BA, Milbury PE, Blunberg JB. Flavonols, Flavones, Flavanones, and Human Health: Epidemiological Evidence. *Journal of Medicinal Food*. 2005; 8(3): p. 281-290.

Grassi D, Desideri G, Groce G, Tiberti S, Aggio A, Ferri C. Flavonoids, Vascular Function and Cardiovascular Protection. *Pharmaceutical Design*. 2009; 15(10): p. 1072-1084.

Greaves M, Hensby C, Black A, Plunner N, Fincham N, Warin A, et al. Inflammatory reactions induced by ultraviolet irradiation. *Bulletin du cancer*. 1978; 65(3): p. 299-303.

Grebneva HA. A model for targeted substitution mutagenesis during SOS replication of double-stranded DNA containing cis-syn cyclobutane thymine dimers. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2006; 47(9): p. 733-745.

Green A, MacLennan R, Youl P, Martin N. Site distribution of cutaneous melanoma in Queensland. *International Journal of Cancer*. 1993; 53(2): p. 232-236.

Green A, Williams G, Nèale R, Hart V, Leslie D, Parsons P, et al. Daily sunscreen application and betacarotene supplementation in prevention of basal-cell and squamous-cell carcinomas of the skin: a randomised controlled trial. *The Lancet*. 1999; 354(9180): p. 723-729.

Grether-Beck S, Wlaschek M, Krutmann J, Scharffetter-Kochanek K. Photodamage and photoaging-prevention and treatment. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2005; 3(S2): p. S19-S25.

Griffiths CE, Russman AN, Majmudar G, Singer RS, Hamilton TA, Voorhees JJ. Restoration of collagen formation in photodamaged human skin by tretinoin (retinoic acid). *The New England Journal of Medicine*. 1993; 329(8): p. 530-535.

Grimes P, Nordlund JJ, Pandya AG, Taylor S, Rendon M, Ortone JP. Increasing our understanding of pigmentary disorders. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2006; 54(5): p. S255-S261.

Gu M, Singh RP, Dhanalakshmi S, Agarwal C, Agarwal R. Silibinin inhibits inflammatory and angiogenic attributes in photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice. *Cancer Research*. 2007; 67(1): p. 3483-3491.

Haass NK, Herlyn M. Normal Human Melanocyte Homeostasis as a Paradigm for Understanding Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 2005; 10(2): p. 153-163.

Halata Z, Grim M, Bauman KI. Friedrich Sigmund Merkel and his "Merkel cell", morphology, development, and physiology: Review and new results. *The Anatomical Record. Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. 2003; 271(1): p. 225-239.

Halder RM, Bang KM. Skin cancer in blacks in the United States. *Dermatologic Clinics*. 1988; 6(3): p. 397-405.

Halliday GM, Agar NS, Barnetson RSC, Ananthaswamy HN, Jones AM. UV-A Fingerprint Mutations in Human Skin Cancer. *Photochemistry and Photobiology*. 2005; 81(1): p. 3-8.

Halliday GM. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. *Mutation Research*. 2005; 571(1-2): p. 107-120.

Haragouchi H, Saito T, Okamura N, Yagi A. Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Medica*. 1995; 61(4): p. 333-336.

Harrison JA, Walker SL, Plastow SR, Batt MD, Hawk JL, Young AR. Sunscreens with low sun protection factor inhibit ultraviolet B and A photoaging in the skin of the hairless albino mouse. 1991; 8(1): p. 12-20.

Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*. 2002; 96(2-3): p. 67-202.

Hawk J, Black A, Jaenicke K, Barr R, Soter N, Mallett A, et al. Increased Concentrations of Arachidonic Acid, Prostaglandins E2, D2, and 6-oxo-F1alpha, and Histamine in Human Skin Following UVA Irradiation. *Journal of Investigative Dermatology*. 1983; 80: p. 496-499.

He YY, Pi J, Huang JL, Diwan BA, Waalkes MP, Chignell CF. Chronic UVA irradiation of human HaCaT keratinocytes induces malignant transformation associated with acquired apoptotic resistance. *Oncogene*. 2006; 25(26): p. 3680-3688.

Helbig G, Christopherson II KW, Bhat-Nakshat P, Kumar S, Kishimoto H, D K, et al. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: p. 21331-21638.

Heras JA, Jiménez F, Soguero ML, Arjona C, Plaza JA, Martínez P, et al. Bullous solar elastosis. *Clinical and Experimental Dermatology.* 2007; 32(3): p. 272-274.

Herman GE. X-Linked dominant disorders of cholesterol biosynthesis in man and mouse. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 2000; 1529(1-3): p. 357-373.

Hirvonen T, Pietinen P, Virtanen M, Ovaskainen ML, Häkkinen S, Albanes D, et al. Intake of Flavonols and Flavones and Risk of Coronary Heart Disease in Male Smokers. *Epidemiology.* 2001; 12(1): p. 62-67.

Holman CD, Mulrone CD, Armstrong BK. Epidemiology of pre-invasive and invasive malignant melanoma in Western Australia. *International Journal of Cancer.* 2006; 25(3): p. 317-323.

Holst D, Grimaldi PA. New factors in the regulation of adipose differentiation and metabolism. *Current Opinion in Lipidology.* 2002; 13(3): p. 241-245.

Hönigsmann H. Erythema and pigmentation. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*. 2002; 18(2): p. 75-81.

Hu S, Ma F, Collado-mesa F, Kirsner RS. UV radiation, latitude, and melanoma in US Hispanics and blacks. *Archives of dermatology*. 2004; 140(7): p. 819-824.

Huang SS, Zheng RL. Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. *Cancer Letters*. 2006; 239: p. 271–280.

Huber M, Rettler I, Bernasconi K, Frenk E, Lavrijsen SP, Ponc M, et al. Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. *Science*. 1995; 267(5197): p. 525-528.

Hwang KA, Yi BR, Choi KC. Molecular Mechanisms and In Vivo Mouse Models of Skin Aging Associated with Demal Matrix Alterations. *Lab anim Res*. 2011; 27(1): p. 1-8.

Ibbotson S, Diffey B, Farr P. The effect of topical indomethacin on ultraviolet-radiation-induced erythema. *British Journal of dermatolgy*. 1996; 135(4): p. 523-527.

Ismail F, Ikram M, Purdie K, Harwood C, Leigh I, Storey A. *Plos One*. [Online].; 2011 [cited 2013. Available from: HYPERLINK "www.plosone.org" www.plosone.org .

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics, 2010. *A Cancer Journal for Clinicians*. 2010; 60(5): p. 277-300.

Johannot L, Somers SM. Age-related variations in flavonoid intake and sources in the Australian population. *Public Health Nutrition*. 2006; 9(8): p. 1045-1054.

Johnson JJ. Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. *Cancer Lett*. 2011; 305(1): p. 1-7.

Kaminsqui A. Resúmenes de las XVII jornadas de Actualizaciones terapéuticas dermatológicas y estéticas. 2010; 33(3-4).

Kang S, Chung JH, Lee JH, Fisher GJ, Wa YS, Duell EA, et al. Topical N-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet-light induced signaling that leads to photoaging in human. *J. Invest. Dermatol*. 2003; 120: p. 835-841.

Katiyar SK, Ahmad N, Mukhtar H. Green Tea and Skin. *Arch Dermatol*. 2000; 136(8): p. 989-994.

Katzberg AA. The area of the dermo-epidermal junction in human skin. *The Anatomical Record*. 1958; 131(4): p. 717-725.

Kawada A. Photoallergy. *Japanese Journal of Clinical Immunology*. 2011; 34(1): p. 8-12.

Kehinde EO. They See a Rat, We Seek a Cure for Diseases: The Current Status of Animal Experimentation in Medical Practice. *Med Princ Pract.* 2013; 22(1): p. 52-61.

Kelman Z. PCNA structure, functions and interactions. *Oncogene.* 1997; 14: p. 629-640.

Khan TH, Jahangir T, Prasad L, Sultana S. Inhibitory effect of apigenin on benzo (a) pyrene-mediated genotoxicity in Swiss albino. *J Pharm Pharmacol.* 2006; 58(12): p. 1655-1660.

Kielty CM, Shuttleworth CA. Microfibrillar elements of the dermal matrix. *Microscopy Research and Technique.* 1997; 38(4): p. 413-427.

Kim SY, Kim SJ, Lee JY, Kim WG, Park WS, Sim YC, et al. Protective effects of dietary soy isoflavones against UV-induced skin-aging in hairless mouse model. *J Am Coll Nutr.* 2004; 23(2): p. 157-162.

Kligman LH, Akin FJ, Kligman AM. Prevention of Ultraviolet Damage to the Dermis of Hairless Mice by Sunscreens. *Journal of Investigative Dermatolgy.* 1982; 78(2): p. 181-189.

Kligman LH, Akin FS, Kligman AM. Sunscreens prevent ultraviolet photocarcinogenesis. *J Am Acad Dermatol.* 1980; 3: p. 30-35.

Kligman LH, Zheng P, Kligman AM. Photoirritation: a new photobiologic phenomenon induced by long wavelength UVA radiation in hairless mice treated with broad-spectrum sunscreens. *Acta Dermato-venereologica*. 1995; 75(3): p. 205-211.

Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American Journal of Nutrition*. 2002; 76(3): p. 560-568.

Kolias N, Malallah Y, al-Ajmi H, Baqer A, Johnson B, Gonzales S. Erythema and melanogenesis action spectra in heavily pigmented individuals as compared to fair-skinned Caucasians. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*. 1996; 12(5): p. 183-188.

Kollias N, Sayre RM, Zeise L, Chedekel MR. New trends in photobiology: Photoprotection by melanin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1991; 9(2): p. 135-160.

Kottke MD, Delva E, Kowalczyk AP. The desmosome: cell science lessons from human diseases. *Journal of Cell Science*. 2006; 119(5): p. 797-806.

Kraemer KH. Sunlight and skin cancer: Another link revealed. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 1997;(94): p. 11-14.

Kreuzmann JJ, Buehler EV. A range-finding method for approximating sunscreen efficacy and substantivity using guinea pigs. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1990; 41: p. 275-281.

Kricker A, Armstrong BK, English DR, Heenan PJ. Pigmentary and cutaneous risk factors for non-melanocytic skin cancer--a case-control study. *International Journal of Cancer.* 1991; 48(5): p. 650-662.

Kubo M, Nagao T, Matsuda H, Namba K. Immune pharmacological studies on platycodi radix (I). Effect on the phagocytosis in mouse. *Shoyakugaku Zasshi J. Pharm. Soc. Jpn.* 1986; 40: p. 367-374.

Kurita K, Burgess SM, Sakai N. Transgenic zebrafish produced by retroviral infection of in vitro-cultured sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(5): p. 1263-1267.

Landi MT, Bauer J, Pfeiffer RM, Elder DE, Hulley B, Minghetti P, et al. MC1R Germline Variants Confer Risk for BRAF-Mutant Melanoma. *Science.* 2006; 313(5786): p. 521-522.

Landrigan PJ, Espina C, Neira M. Global Prevention of Environmental and Occupational Cancer. *Environ Health Perspect.* 2011; 119(7): p. 280-281.

Lavker R. Structural alterations in exposed and unexposed aged skin. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1979; 73(1): p. 59-66.

Lavker RM, Kligman AM. Chronic heliodermatitis: a morphologic evaluation of chronic actinic dermal damage with emphasis on the role of mast cells. *J Invest Dermatol*. 1988; 90: p. 325-330.

Leccia MT, Yaar M, Allen N, Beani JC. Solar simulated irradiation modulates gene expression and activity of antioxidant enzymes in cultured human dermal fibroblast. *Exp Dermatol*. 2001; 10(5): p. 272-279.

Lechler T, Fuchs E. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature*. 2005; 437(7056): p. 275-280.

Lèvêque JL. Quantitative assessment of skin aging. *Clinics in Geriatric Medicine*. 2001; 14(4): p. 673-689.

Li ZD, Liu LZ, Shi X, Fang J, Jiang BH. Benzo[a]pyrene-3,6-dione inhibited VEGF expression through inducing HIF-1alpha degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2007; 357: p. 517-523.

Lim HW, James WD, Rigel DS, Maloney ME, Spencer JM, Bhushan R. Adverse effects of ultraviolet radiation from the use of indoor tanning

equipment: Time to ban the tan. *J Am Acad Dermatol*. 2011; 64(5): p. 893-902.

270
Lim JL, Stern RS. High Levels of Ultraviolet B Exposure Increase the Risk of Non-Melanoma Skin Cancer in Psoralen and Ultraviolet A-Treated Patients. *Journal of Investigative Dermatology*. 2005; 124(3): p. 505-513.

Limasset B, Le Doucen C, Dore J, Ojasoo T, Damon M, Crastes de Paulet A. Effects of Flavonoids on the Release. Effects of flavonoids on the release of reactive oxygen species by stimulated human neutrophils. Multivariate analysis of structure-activity relationships (SAR). 1993; 46(7): p. 1257-1271.

Linde H. Ein neues Diterpen aus *Salvia officinalis* L. und eine Notiz zur Konstitution von Pikrosalvin. *Helvetica Chimica Acta*. 1964; 47(5): p. 1234-1239.

Ling H, Boudsocq F, Plosky BS, Woodgate R, Yang W. Replication of a cis-syn thymine dimer at atomic resolution. *Nature*. 2003; 424: p. 1083-1087.

Logan G, Wilhelm DL. Ultraviolet injury as an experimental model of the inflammatory reaction. *Nature*. 1963; 198: p. 968-969.

Lovell C, Smolenski K, Duance V, Light N, Young S, Dyson M. Type I and III collagen content and fibre distribution in normal human skin during ageing. *British Journal of Dermatology*. 1987; 117(4): p. 419-428.

Madison KC. Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2003; 121(2): p. 231-241.

Makino T, Ono T, Liu N, Nakamura T, Muso E, Honda G. Suppressive effect of rosmarinic acid on mesangioproliferative glomerulonephritis in rats. *Nephron*. 2002; 92(4): p. 898-904.

Makino T, Ono T, Muso E, Yoshida H, Honda G, Sasayama S. Inhibitory effects of rosmarinic acid on the proliferation of cultured murine mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15(8): p. 1140-1145.

Malina L. Effect of ultraviolet radiation on the immune system and the effect of exogenous photochemoprotective agents on the ultraviolet radiation induced immunosuppression. *Casopis lékařů České republiky*. 2002; 141(11): p. 338-342.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 79(5): p. 727-747.

Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. 2000; 21: p. 361-370.

Matsuoka L, Uitto J. Alteration in the elastic fiber in cutaneous aging and solar elastosis. In Balina LM, Kligman AM, editors. *Aging and the Skin*. New York: Raven; 1989. p. 141-151.

Maverakis E, Miyamura Y, Bowen MP, Correa G, Ono Y, Goodarzi H. Light, Including Ultraviolet. *J. Autoimmun.* 2010; 34(2): p. 247-257.

McCallion R, Li Wan Po A. Dry and photo-aged skin: manifestations and management. *J Clin Pharm Ther.* 1993; 18(1): p. 15-32.

Meanwell E, Diffey B. Reciprocity of ultraviolet erythema in human skin. *Photo-dermatology.* 1989; 6(3): p. 146-148.

Miller JH. Mutagenic Specificity of Ultraviolet Light. *Journal of Molecular Biology.* 1985; 182(1): p. 45-68.

Miyamura Y, Coelho SG, Wolber R, Miller SA, Wakamatsu K, Zmudzka BZ, et al. Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. *Pigment Cell Research.* 2007 February; 20(1): p. 2-13.

Montero J. Radiación solar y fotoprotección. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos ; 2009.

Mortensen LJ, Ravichandran S, DeLouise LA. The impact o UVB exposure and differentiationstate of primary Keratinocytes on their interaction with quantum dots. *Nanotoxicology*. 2013; 7: p. 1244-1254.

Nagai S, Ohara K, Mukai K. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by flavonoids in ethanol solution. *J Phys Chem B*. 2005; 109(9): p. 4234-4240.

Nagao T, Matsuda H, Namba K, Kubo M. Immune pharmacological studies on platicodi radix (II). Antitumor activity of inulin from platicodi radix. *Shoyakugaku Zasshi J. Pharm. Soc. Jpn.* 1986; 40: p. 375-380.

Ngo SNT, Williams DB, Head RJ. Rosemary and Cancer Prevention: Preclinical perspectives. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2011; 51(10): p. 946-945.

Nicholas C, Batra S, Vargo MA, Voss OH, Gavrilin MA, Wewers MD, et al. Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF-kappaB through the suppression of p65 phosphorylation. *J Immunol.* 2007; 179(10): p. 7121-7127.

Nicholls EM. Development and elimination of pigmented moles, and the anatomical distribution of primary malignant melanoma. *Cancer*. 1973; 32(1): p. 191-195.

Nichols JA, Katiyar SK. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res*. 2010; 202(2): p. 71.

Nielsen LT, Hannevik M, Aalerud TN, Johnsen B, Friberg EG, Veierød MB. Trends in UV Irradiance of Tanning Devices in Norway: 1983-2005. *Photochem Photobiol*. 2008; 84(5): p. 1100-1108.

Niezabitowski A, Czajewski K, Rys J, Kruczak A, Gruchala A, Wasilewska A, et al. Prognostic evaluation of cutaneous malignant melanoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *J Surg Oncol*. 1999; 70(3): p. 150-160.

Norris P, Poston R, Thomas D, Thornhill M, Hawk J, Haskard D. 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 hyp. *Journal of investigative dermatology*. 1991; 96(5): p. 763-770.

Nurnberger F, Schober E, Marsch WC, Dogliotti M. Actinic elastosis in black skin. A light- and electronmicroscopic study. Arch Dermatol Res. 1978; 262: p. 7-14.

Nuytinck JK, Goris RJ, Kalter ES, Schillings PH. Inhibition of experimentally induced microvascular injury by rosmarinic acid. Agents Actions. 1986; 17(3-4): p. 373-374.

Oberyszyn TM. Non-melanoma skin cancer: Importance of gender, immunosuppressive status and vitamin D. Cancer Lett. 2008; 261(2): p. 127-136.

Oikarinen A. The aging of skin: chronoaging versus photoaging. Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine. 1990; 7(1): p. 3-4.

Okada K, Takahashi Y, Ohnishi K, Ishikawa O, Miyachi Y. Time-dependent effect of chronic UV irradiation on superoxide dismutase and catalase activity in hairless mice skin. J Dermatol Sci. 1994; 8(3): p. 183-186.

Orentreich N, Selmanowitz VJ. level of biological functions with aging. In Transactions of the New York Academy of Sciences; 1969. p. 992.

Ortuño A, Arcas MC, Botía JM, Fuster MD, Del Rio JA. Increasing resistance against *Phytophthora citrophthora* in tangelo Nova fruits by modulating polymethoxyflavones levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 8(50): p. 2836-2839.

Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Yoshikawa T. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis*. 2004; 25(4): p. 549-557.

Ouhtit A, Muller HK, Davis DW, Ullrich SE, McConkey D, Ananthaswamy HN. Temporal events in skin injury and the early adaptive responses in ultraviolet-irradiated mouse skin. *Am. J. Pathol.* 2000; 156: p. 201-207.

Owens DW, Knox JM, Hudson HT, Troll D. Influence of wind on ultraviolet injury. *Arch. Dermatol.* 1974; 109: p. 200-201.

Partington MW. The vascular response of the skin to ultraviolet light. *Clin. Sci.* 1954; 13: 425. 1954; 13: p. 425.

Passeron T, Mantoux F, Ortonne JP. Genetic disorders of pigmentation. *Clinics in Dermatology*. 2005; 23(1): p. 56-67.

Patel D, Shukla S, Gupta S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). *Int J Oncol.* 2007; 30(1): p. 233-245.

Peake PW, Pussell BA, Martyn P, Timmermans V, JA. C. The inhibitory effect of rosmarinic acid on complement involves the C5 convertase. *Int J Immunopharmacol.* 1991; 13(7): p. 853-857.

Pearce RH, Grimmer BJ. Age and the chemical constitution of normal human dermis. *The Journal of Investigative Dermatolgy.* 1972; 58(6): p. 347-361.

Pearse AD, Gaskell SA, Marks R. Epidermal changes in human skin following irradiation with either UVB or UVA. *J. Invest. Dermatol.* 1987; 88: p. 83-87.

Petiwala SM, Puthenveetil AG, Johnson JJ. Polyphenols from the Mediterranean herb rosemary (*Rosmarinus officinalis*) for prostate cancer. *Front Pharmacol.* 2013;; p. 4-29.

Pinnell SR, Fairhurst D, Gillies R, Mitchnick MA, Kollias N. Microfine Zinc Oxide is a Superior Sunscreen Ingredient to Microfine Titanium Dioxide. *Dermatologic Surgery.* 2000; 26(4): p. 309-314.

Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, McBride DJ, Humphray SJ, Greenman CD, et al. A Comprehensive Catalogue of Somatic Mutations from a Human Cancer Genome. *Nature.* ; 463: p. 191-196.

Podda M, Grundmann-Kollmann M. Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. *Clin Exp Dermatol.* 2001; 26(7): p. 578-582.

Poljsak B, Dajmane R, Godic A. Skin and antioxidant. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy.* 2013; 15(2): p. 107-113.

Potten CS. Cell replacement in epidermis (keratopoiesis) via discrete units of proliferation. *International Review of Cytology.* 1981; 69: p. 271-318.

Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology.* 2008; 17(12): p. 1063-1072.

Psotová J, Marková H, Fialová C, Anyanwu E, Ulrichová J, Walterpová D. Antioxidative properties of phenolic acids against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat and human hepatocytes. *Chem. Listy.* 1998; 52: p. 8-10.

Qiu H, Flament F, Long S, Wu J, Xu M, Leger DS, et al. Seasonal skin darkening in Chinese women: the Shanghaiese experience of daily sun protection. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2013; 6: p. 151-158.

Reeve VE. Ultraviolet radiation and the contact hypersensitivity reaction in mice. *Methods*. 2002; 28(1): p. 20-24.

Rezai-Zaded K, Ehrhart J, Bai Y, Sanberg PR, Bickford P, Tan J, et al. Apigenin and luteolin modulate microglial activation via inhibition of STAT1-induced CD40 expression. *J Neuroinflamm*. 2008; 5(41).

Rhodes L, Belgi G, Parslew R, McLoughlin L, Clough G, Friedmann P. Ultraviolet-B-Induced Erythema is Mediated by Nitric Oxide and Prostaglandin E2 in Combination. *Journal of Investigative Dermatology*. 2001;(117): p. 880-885.

Richheimer SL, Bailey MW, Bernat MK, Vininski JV, Anderson LD. Antioxidant activity and oxidative degradation of phenolic compounds isolated from rosemary. *Recent Research Development Oil Chemistry*. 1999; 3: p. 45-58.

Richheimer SL, Bernart MW, King GA, Kent MC, Beiley DT. Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. *J Am Oil Chem Soc*. 1996; 73(4): p. 507-514.

Rittie L, Fisher GJ. UV-light induced signal cascades and skin aging. *Ageing Research Reviews*. 2002; 1(4): p. 705-720.

Rivas J, Ullrich S. The role of IL-4, IL-10, and TNF-alpha in the immune suppression induced by ultraviolet radiation. *Journal of leukocyte biology*. 1994; 56(6): p. 769-775.

Robinson MK. Population differences in skin structure and physiology and the susceptibility to irritant and allergic contact dermatitis: implications for skin safety testing and risk assessment. *Contact Dermatitis*. 1999; 41(2): p. 65-79.

Rosario R, Mark GJ, Parrish JA, Mihm Jr MC. Histological changes produced in skin by equally erythemogenic doses of UV-A, UV-B, UV-C and UV-A with psoralens. *BR. J. Dermatol*. 1979; 101: p. 299-308.

Ross JA, Kasum CM. Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annual Reviews of Nutrition*. 2002; 22: p. 19-34.

Ross JA, Kasum CM. Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:19-34. 2002; 22: p. 19-34.

Rosso S, Zanetti R, Martinez X, Tormo MJ, Schraub S, Sancho H, et al. The multicentre south European study 'Helios'. II: Different sun exposure patterns in the aetiology of basal cell and squamous cell

carcinomas of the skin. *British Journal of Cancer*. 1996; 73(11): p. 1447-1454.

Roupe G. Skin of the aging human being. *Lakartidningen*. 2001; 98(10): p. 1091-1095.

Ruksha TG, Salmina AB, Sokolov VD, Maksimova TV, Anisimov YA. Expression of peripheral benzodiazepine receptor, PCNA, and caspase-3 in cell of skin melanoma and squamous cell carcinoma. *Bull Exp Biol Med*. 2007; 144(1): p. 77-79.

Sakai S, Yasuda R, Sayo T, Ishikawa O, Inoue S. Hyaluronan exists in the normal stratum corneum. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2000; 114(6): p. 1184-1187.

Sams WM, Smith JG, Burk GP. The Experimental Production of Elastosis with Ultraviolet Light. *Journal of investigative dermatology*. 1964; 43(6): p. 467-471.

Sams WM, Smith JG, Burk PG. The experimental production of elastosis with ultraviolet light. *J Invest Dermatol*. 1964; 71: p. 467-471.

Sander CS, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ. Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. *British Journal of Dermatology* 2003; 148: 913–922. 2003; 148(5): p. 913-922.

Savona G, Bruno M. Terpenoids of Cultivated *Salvia canariensis*.

Journal of Natural Products. 1983; 46(4): p. 593-594.

Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémési C, Jiménez L. Dietary

Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2005; 45: p. 287-306.

Scharffetter-Kochanek K, Brenneisen P, Wenk J, Herrmann G, Ma

W, Kuhr L, et al. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms.

Experimental Gerontology. 2000; 35(3): p. 307-316.

Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Brenneisen P, Schauen M,

Blaudschun R, Wenk J. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *BiolChem*. 1997; 378(11): p. 1247-1257.

Schuch AP, Menck CF. The genotoxic effects of DNA lesions

induced by artificial UV-radiation and sunlight. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2010; 99(3): p. 111-116.

Schwarz A, Ständer S, Berneburg M, Böhm M, Kulms D, Steeg H,

et al. Interleukin-12 suppresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair. *Nat Cell Biol*. 2002; 4(1): p. 26-31.

Segre JA. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *The Journal of Clinical Investigation*. 2006; 116(5): p. 1150-1158.

Shama G. Ultraviolet light. In *Encyclopedia of Food Microbiology*. San Diego: Academic Press; 2000. p. 2208-2214.

Sharma MR, Werth B, Werth VP. Animal Models of Acute Photodamage: Comparisons of Anatomic, Cellular and Molecular Responses in C57BL / 6J, SKH1 and Balb / c Mice. *Photochemistry and Photobiology*. 2011; 87: p. 690-698.

Shukla S, Mishra A, Fu P, MacLennan GT, Resnick MI, Gupta S. Up-regulation of insulin-like growth factor binding protein-3 by apigenin leads to growth inhibition and apoptosis of 22Rv1 xenograft in athymic nude mice. *FASEB J*. 2005; 19: p. 2042-2044.

Shuster S, Black MM, McVitie E. The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density. *British Journal of Dermatology*. 1975; 93(6): p. 639-643.

Sidwell RU, Sandison A, Wing J, Fawcett HD, Seet J, Fisher C, et al. A novel mutation in the XPA gene associated with unusually mild clinical features in a patient who developed a spindle cell melanoma. *The British Journal of Dermatology*. 2006; 155(1): p. 81-88.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer Statistics, 2012. A Cancer Journal for Clinicians. 2012; 62(1): p. 10-29.

Sim GS, Lee BC, Ho SC, Jae WL, Kim JH, Lee DH, et al. Structure activity relationship of antioxidative property of flavonoids and inhibitory effect on matrix metalloproteinase activity in UVA-irradiated human dermal fibroblast. Arch Pharm Res. 2007; 30: p. 290-298.

Skin Cancer Foundation.

<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.htm>. [Online].; 2012

[cited 2013. Available from: HYPERLINK

"<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.htm>"

<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.htm> .

Snyder D, Eaglstein W. Topical indomethacin and sunburn. British Journal of Dermatology. 1974; 90(1): p. 91-93.

Snyder DS, May M. Ability of PABA to protect mammalian skin from ultraviolet light-induced skin tumors and actinic damage. Journal of Investigative Dermatology. 1975; 65(6): p. 543-546.

Soffen GA, Blum HF. Quantitative measurements of changes in mouse skin following a single exposure of ultraviolet light. J. Cell. Compar.Physiol. 1961; 58: p. 81-96.

Somerset SM, Johannot L. Dietary Flavonoid Sources in Australian Adults. *Nutr Cancer*. 2008; 60(4): p. 442-479.

Soter N. Acute effects of ultraviolet radiation on the skin. *Seminars In Dermatology*. 1990; 9(1): p. 11-15.

Stern RS, Liebman EJ, Vàkevà L. Oral Psoralen and Ultraviolet-A Light (PUVA) Treatment of Psoriasis and Persistent Risk of Nonmelanoma Skin Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998; 90(17): p. 1278-1284.

Stevenson DE, Hurst RD. Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more? *Cellular and Molecular Life Science*. 2007; 64(22): p. 2900-2916.

Südel KM, Venzke K, Mielke H, Breitenbach U, Mundt C, Jaspers S, et al. Novel Aspects of Intrinsic and Extrinsic Aging of Human Skin: Beneficial Effects of Soy Extract. *Photochem Photobiol*. 2005; 81(3): p. 581-587.

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

Svobodova A, Walterova D, Vostalova J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomedical papers*. 2006; 150(1): p. 25-38.

286
Takeuchi S, Zhang W, Wakamatsu K, Ito S, Hearing VJ, Kraemer KH, et al. Melanin acts as a potent UVB photosensitizer to cause an atypical mode of cell death in murine skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101(42): p. 15076-15081.

Takuo T, Hamada T. Age-related changes in human dermal elastic fibres. *British Journal of Dermatology*. 1981; 105(1): p. 57-63.

Tammi R SAMHTM, Tammi R, Säämänen AM, Maibach HI, Tammi M. Degradation of newly synthesized high molecular mass hyaluronan in the epidermal and dermal compartments of human skin in organ culture. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1991; 97(1): p. 126-130.

Taylor LP, Grotewold E. Flavonoids as developmental regulators. *Current Opinion in Plant Biology*. 2005; 8: p. 317-323.

Tsao R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*. 2010; 2: p. 1231-1246.

Tuchinda C, Lim HW, Ostelwalder U, Rougier A. Novel emerging sunscreen technologies. *Dermatol Clin.* 2006; 24(1): p. 105-117.

Uijiki MB, Ding XZ, Salabat MR, Bentrem DJ, Golkar L, Milam B, et al. Apigenin inhibits pancreatic cancer cell proliferation through G2/M cell cycle arrest. *Mol. Cancer.* 2006; 5: p. 76.

Uitto J, Richard G. Progress in epidermolysis bullosa: from eponyms to molecular genetic classification. *Clinics in Dermatology.* 2005; 23(1): p. 33-40.

Uitto J. Understanding premature skin aging. *The new England journal of medicine.* 1997; 337(20): p. 1463-1465.

Usda U. Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. Release: US Department of Agriculture; 2007.

Valladeau J, Saeland S. Cutaneous dendritic cells. *Seminars in Immunology.* 2005; 17(4): p. 273-283.

Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees J, Thody A. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nature Genetics.* 1995; 11(3): p. 328-330.

Van der Pools JC, Williams GM, Pandeya N, Logan V, Green AC. Prolonged Prevention of Squamous Cell Carcinoma of the Skin by

Regular Sunscreen Use. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2006; 15: p. 2546-2548.

288 Vargo MA, Voss OH, Poustka F, Cardounel AJ, Grotewold E, Doseff AI. Apigenin-induced-apoptosis is mediated by the activation of PKCdelta and caspases in leukemia cells. *Biochem Pharmacol*. 2006; 72(6): p. 681-692.

Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha MJ, Spencer JP. Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action. *Nutrients*. 2010; 2(11): p. 1106-1131.

Veaudry VG, Jiang D, Dusek RL, Park EJ, Knezevich S, Ridd K, et al. Loss of the p53/p63 regulated desmosomal protein Perp promotes tumorigenesis. *PLoS Genetics*. 2010; 6(10): p. e1001168.

Vicente V. El peligroso encanto de la belleza (Una aproximación a la patología de la pigmentación cutánea). 1999 noviembre 4..

Vostálová J, Zdarilová A, Sbodová A. Prunella vulgaris extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes. *A. Arch. Dermatol. Res*. 2010; 302(3): p. 171-181.

Wang L, Lee IM, Zhang SM, Blumberg JB, Buring JE, Sesso HD. Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89(3): p. 905-912.

Warren JB,LRK,CML, Warren J, Loi R, Coughlan M. Involvement of nitric oxide synthase in the delayed vasodilator response to ultraviolet light irradiation of rat skin in vivo. *British Journal of Pharmacology.* 1993; 109(3): p. 802-803.

Warren R. Sensitivity of mouse Skh:HR-2 to ultraviolet light: Mouse pigmentation model. *Photochem Photobiol.* 1986; 43: p. 41-47.

Watanabe N, Hirayama R, Kubota N. The chemopreventive flavonoid apigenin confers radiosensitizing effect in human tumor cells grown as monolayers and spheroids. *J Radiat Res.* 2007; 48(1): p. 45-50.

Way TD, Kao MC, Lin JK. Apigenin induces apoptosis through proteasomal degradation of HER2/neu in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: p. 4479-4489.

Wei H, Tye L, Bresnick E, Birt DF. Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice. *Cancer Res.* 1990; 50: p. 499-502.

Welch CR, Wu Q, Simon JE. Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization. *Curr Anal Chem.* 2008; 4(2): p. 75-101.

Wenkert E, Fuchs A, McChesney JD. Chemical Artifacts from the Family Labiatae. *The Journal of Organic Chemistry.* 1965; 30(9): p. 2931-2934.

Whitton JT, Everall JD. The thickness of the epidermis. *British Journal of Dermatology.* 1973; 89(5): p. 467-476.

Wilgus TA, Koki AT, Zweifel BS, Kusewitt DF, Rubal PA, Oberyszyn TM. Inhibition of cutaneous ultraviolet light B-mediated inflammation and tumor formation with topical celecoxib treatment. *Molecular Carcinogenesis.* 2003; 38(2): p. 49-58.

Wilgus TA, Ross MS, Parrett ML, Oberyszyn TM. Topical application of a selective cyclooxygenase inhibitor suppresses UVB mediated cutaneous inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2000; 62(4): p. 367-384.

Williams KA, Kolappaswamy K, Detolla LJ, Vucenik I. Protective Effect of Inositol Hexaphosphate Against UVB Damage in HaCaT Cells and Skin Carcinogenesis in SKH1 Hairless Mice. *Comparative Medicine.* 2011; 61(1): p. 39-44.

Winkelman RK, Baldes EJ, Zollman PE. Squamous cell tumors induced in hairless mice with ultraviolet light. *Journal of Investigative Dermatology*. 1960; 34(2): p. 131-138.

Winter S, Ard UV, Roza L, Pavel S. Solar-Simulated Skin Adaptation and its Effect on Subsequent UV-Induced Epidermal DNA Damage. *Journal of investigative dermatology*. 2001;(117): p. 678-682.

Woollons A, Kipp C, Young AR, Petit-Frère C, Arlett CF, Green MH, et al. The 0.8% ultraviolet B content of an ultraviolet A sunlamp induces 75% of cyclobutane pyrimidine dimers in human keratinocytes in vitro. *The British Journal of Dermatology*. 1999; 140(6): p. 1023-1030.

Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer*. 2010; 102: p. 155-1577.

Yaar M, Gilchrest BA. Aging of Skin. In *Fitzpatrick s Dermatology In General Medicine*. 6th ed.: McGraw-Hill Professional; 2003. p. 1700.

Yaar M, Gilchrest BA. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br J Dermatol*. 2007; 157(5): p. 874-887.

Yin T, Green KJ. Regulation of desmosome assembly and adhesion. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2004; 15(6): p. 665-677.

Youn J, Lee KH, Huh SJ, Yun HS, Cho WS, Paik DJ. Beneficial effects of rosmarinic acid on suppression of collagen induced arthritis. *J Rheumatol*. 2003; 30(6): p. 1203-1207.

Young A, Chadwick C, Harrison G, Nikaido O, Ramsden J, Potten C. The similarity of action spectra for thymine dimers in human epidermis and erythema suggests that DNA is the chromophore for erythema. *Journal of Investigative Dermatology*. 1998; 111(6): p. 982-988.

Young A, Potten C, Nikaido O, Parsons P, Boenders J, Ramsden J, et al. Human melanocytes and keratinocytes exposed to UVB or UVA in vivo show comparable levels of thymine dimers. *Journal of Investigative Dermatology*. 1998; 111(6): p. 936-940.

Young. Chromophores in human skin. *Physics in Medicine and Biology*. 1997;(42): p. 789-802.

Yu SL, Johson RE, Prakash S, Prakash L. Requirement of DNA Polymerase η for Error-Free Bypass of. *Molecular and Cellular Biology*. 2001; 21(1): p. 185-188.

Yu YM, Lin CH, Chan HC, Tsai HD. Carnosic acid reduces cytokine-induced adhesion molecules expression and monocyte adhesion to endothelial cells. *Eur J Nutr.* 2009; 48(2): p. 101-106.

Yu YM, Lin HC, Chang WC. Carnosic acid prevents the migration of human aortic smooth muscle cells by inhibiting the activation and expression of matrix metalloproteinase-9. *Br J Nutr.* 2008; 100(4): p. 731-738.

Zheng PW, Chiang LC, Lin CC. Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells. *Life Sci.* 2005; 76: p. 1367-1379.

Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Shama HW, Kimmelman J, et al. Sunburn and p53. in the onset of skin cancer. 1994; 372: p. 773-776.