



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGÍA, OPTOMETRÍA, OTORRINOLARINGOLOGÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

Efectos de la Astaxantina en el Fotoenvejecimiento
Cutáneo inducido en Ratones SKH1/CRL
por Radiación UV

D^a. Virtudes Ruiz Sánchez

2014



UNIVERSIDAD DE
MURCIA



Efectos de la Astaxantina en el fotoenvejecimiento
cutáneo inducido en ratones SKH1/CRL por
radiación UV

Virtudes Ruiz Sánchez

2014

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

A mi marido y mi hija por su ayuda y apoyo incondicional.

A mi profesor y director de Tesis, Vicente Vicente Ortega, sin el cual no habría sido posible realizar este trabajo.

A los codirectores, Profesores F. J. Gómez García y F. J. Martínez Díaz, por su inestimable ayuda.

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

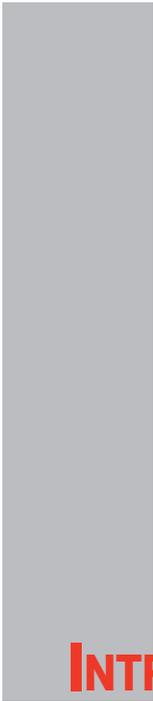
Al personal de la Cátedra de Anatomía Patológica que me han ayudado, especialmente a J. V. Bolarín.



ÍNDICE

I. INTRODUCCION	19
II. ANTECEDENTES	25
A. Piel	27
B. El sol y sus efectos sobre la piel: Radiación Ultravioleta	66
C. Envejecimiento cutáneo. Fotoenvejecimiento	77
D. Fotoprotección	80
E. Sustancias antienvjecimiento	91
F. Modelos experimentales de Fotoenvejecimiento	98
III. OBJETIVOS	103
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	107
A. MATERIAL	109
a. Animales	109
b. Lámpara	110
c. Astaxantina	111
B. MÉTODOS	113
a. Procedimiento experimental	113

b. Método anatomopatológico	115
c. Método Estadístico	121
V. RESULTADOS	123
VI. DISCUSIÓN	183
VII. RESUMEN	225
VIII. CONCLUSIONES	231
IX. BIBLIOGRAFIA	235



INTRODUCCIÓN

La piel, como los restantes órganos de la economía, va a sufrir con el transcurso del tiempo, una serie de cambios, tanto morfológicos o estructurales como de la función, que han sido englobados bajo el término de **envejecimiento cronológico**, también llamado **intrínseco** o **fisiológico**. Además, la piel es el único órgano que puede sufrir otros cambios, causados directamente por la exposición crónica a la radiación ultravioleta solar, que se suman a los anteriores, por lo que el resultado final va a estar caracterizado por alteraciones cutáneas de mayor gravedad que las del envejecimiento intrínseco. Dichas alteraciones se conocen con el término de **fotoenvejecimiento, dermatoheliosis** o **envejecimiento cutáneo patológico**. El concepto fue establecido por Kligman en 1982 para describir los daños que ocurrían en la piel tras la exposición solar crónica. Está caracterizado por un enve-

jecimiento cutáneo de presentación precoz, más extenso y sobre todo, de mayor gravedad, puesto que casi siempre se acompaña de **fotocarcinogénesis** o presentación de cánceres cutáneos.

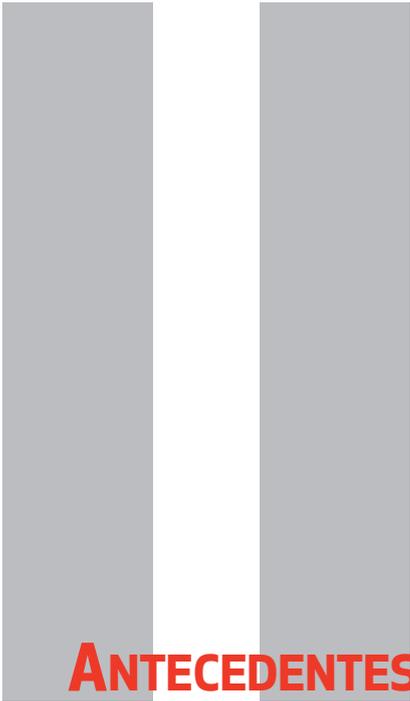
El envejecimiento humano ha sido definido por la OMS como un proceso biológico, es decir natural, que además es inevitable, universal, irreversible y heterogéneo en cuanto a la velocidad de presentación de los cambios en las distintas estructuras orgánicas. Actualmente se acepta que aunque el origen de dichos cambios es multifactorial (factores endógenos, exógenos y epigenéticos), los mecanismos íntimos de producción de las alteraciones están íntimamente relacionados con el daño oxidativo a nivel celular y tisular en los distintos órganos y aparatos.

Estos hechos han supuesto un doble reto para la ciencia y en concreto para la investigación científica; por una parte, en relación con el desarrollo de diversos modelos experimentales de fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis. En este sentido, las dificultades metodológicas que suponen la lenta evolución de los tumores inducidos por la RUV, junto a las limitaciones éticas que lleva implícito el desarrollo de modelos experimentales en humanos, explican el gran desarrollo de modelos experimentales en animales. Estos han sido inducidos fundamentalmente en ratones mediante la exposición crónica a la radiación ultravioleta, con el fin de conocer de forma progresiva y detallada los mecanismos

así como los cambios implicados en dicho fenómeno; y por otra parte, algo similar ha ocurrido respecto al desarrollo de productos o sistemas de fotoprotección.

Durante los últimos años se ha producido un enorme desarrollo de nuevos agentes protectores solares de naturaleza química y de nuevas formulaciones de los de naturaleza física, pero tal vez en donde haya existido un mayor esfuerzo investigador corresponda al estudio de los agentes de naturaleza biológica así como al ensayo de distintas sustancias de origen natural.

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



PIEL

α. DESARROLLO EMBRIOLÓGICO

La piel, como cubierta protectora del organismo, representa un complejo sistema orgánico derivado de dos capas germinales distintas: **ectodermo y mesodermo**.

Está constituida por:

- **La epidermis**, que es un tejido epitelial derivado del ectodermo de superficie y

- **La dermis**, una capa más profunda compuesta por tejido conjuntivo denso, de disposición irregular, que procede del mesodermo o mesénquima embrionario.

Las estructuras de la piel varían según su localización en el

organismo, de modo que la piel de los párpados es delgada, blanda y posee vello fino, mientras que la de las cejas es gruesa y tiene vello grueso a las cuatro o cinco semanas de la fecundación.

La piel embrionaria está formada por una única capa de ectodermo de superficie que recubre el mesénquima (la **Epidermis**) durante el segundo y tercer trimestre del embarazo y que sufre un crecimiento en etapas que comporta un aumento del grosor del mismo. *El primordio* de la epidermis corresponde a la capa de células del ectodermo de superficie. Estas células proliferan y forman una capa de epitelio escamoso, *el peridermo*, y una capa basal. Las células del peridermo sufren un proceso de queratinización y descamación continua y son sustituidas por células procedentes de la capa basal.

Las células peridérmicas exfoliadas forman parte de la sustancia grasa blanca, denominada *vérmix caseoso* que recubre la piel fetal. Esta sustancia protege a la piel en desarrollo de la exposición constante al líquido amniótico y de la orina durante el periodo fetal. La capa basal de la epidermis se convierte en el *estrato germinativo*, que produce células nuevas que son desplazadas hacia las capas superficiales. Alrededor de la semana 11, las células de este estrato han formado la capa intermedia. La sustitución de las células peridérmicas continúa hasta alrededor de la semana 21; posteriormente el peridermo desaparece y se forma *el estrato córneo*.

La proliferación de células en *el estrato germinativo* también origina las crestas epidérmicas, que se extienden hacia la dermis en desarrollo. Las crestas aparecen en el embrión en la semana 10 y se establecen de modo permanente hacia la semana 17. Estas crestas epidérmicas producen surcos en la superficie de las palmas de las manos y las plantas de los pies, incluyendo los dedos. El tipo de patrón se determina a nivel genético y constituye la base del estudio de las huellas dactilares.

La transformación del ectodermo de superficie en una epidermis de varias capas es consecuencia de interacciones de inducción con la dermis.

A finales del periodo embrionario, las células de la cresta neural migran hacia el mesénquima de la dermis en desarrollo y se diferencian en melanoblastos. Después, estas células se mueven hacia la unión dermoepidérmica y se diferencian en **melanocitos**, que aparecen en la piel en desarrollo entre los días 40 y 50 inmediatamente después de la migración de las células de la cresta neural. Los melanocitos comienzan a producir melanina antes del nacimiento y la distribuyen a las células epidérmicas. El contenido relativo de melanina en los melanocitos explica los distintos colores de la piel.

La Dermis se desarrolla a partir del mesénquima, que procede del mesodermo situado por debajo del ectodermo de super-

ficie. Hacia la semana 11, las células mesenquimales han comenzado a producir fibras de colágeno y elásticas. A medida que se forman las crestas epidérmicas, la dermis se proyecta hacia la epidermis y forma papilas dérmicas que se introducen entre las crestas epidérmicas. En ellas aparecen asas capilares que aportan nutrientes a la epidermis y terminaciones nerviosas sensitivas.

Las fibras nerviosas aferentes en desarrollo parecen jugar un papel importante en la secuencia temporal y espacial de la formación de las papilas dérmicas. En un principio, los vasos sanguíneos de la dermis son estructuras sencillas, revestidas de endotelio, que se diferencian a partir del mesénquima.

Conforme crece la piel, se desarrollan nuevos capilares a partir de los vasos primitivos. A finales del primer trimestre se ha establecido la organización vascular principal de la dermis fetal (Moore, 2004; Saldler, 2004).

b. ESTRUCTURA DE LA PIEL EN EL ADULTO

La **piel** es el órgano más 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. Está destinado a mantener la forma del cuerpo, establecer relaciones sensoriales con el medio ambiente y protegerlo de las agresiones externas (microorganismos, luz ultravioleta, traumas mecánicos, etc.). Además, es responsable de la homeostasis y la termorregulación y también puede ser el reflejo de enfermedades sistémicas (Avci, 2013).

Juega un papel vital como barrera de regulación del medio interno, controlando la temperatura corporal y el equilibrio hidroelectrolítico; representa además, la barrera más importante frente a la atmosfera exterior y de modo especial frente a la radiaciones solares, que aunque imprescindibles para el mantenimiento y desarrollo de la vida, pueden al mismo tiempo ser fuente importante de alteraciones, sobre todo con la exposición persistente, lo que favorece la presentación de cambios degenerativos como el fotoenvejecimiento, cuya máxima expresión es el cáncer de piel. Estos hechos se han sido agravados en los últimos tiempos por el alargamiento de la vida media y sobre todo por la mayor exposición al sol -tanto ocupacional como social-, lo que unido a una alarmante depleción del ozono, lleva a una mayor irradiación (Vicente, 1999).

MORFOLOGIA MACROSCÓPICA

Macroscópicamente la piel parece lisa, pero en realidad presenta pliegues, surcos, hendiduras y pequeños salientes.

a) Pliegues y surcos. Más o menos acentuados, están siempre presentes en todos los individuos sobre la cara dorsal de ciertas articulaciones, incluso cuando éstas están en extensión completa: codos, rodillas, dedos, muñecas, etc.

b) Arrugas. Que pueden ser provocadas por contracción muscular debido a un movimiento (las llamadas arrugas de expresión) o por disposiciones estructurales de la piel, como pliegues de las articulaciones.

c) Poros cutáneos. Corresponden al orificio externo del canal de salida de la glándula sudorípara y sebácea.

TIPOS DE PIEL

Existen dos tipos bien diferenciados:

✓ **Piel Fina o blanda** que es aquella que se encuentra principalmente en los párpados y las zonas genitales.

✓ **Piel gruesa** es la que se localiza en la piel labial, plantar y palmar, además se caracteriza por tener un estrato córneo muy desarrollado en comparación con el resto de la piel.

En la piel del varón se produce más secreción sebácea que en la de la mujer, como consecuencia, la piel masculina es más gruesa y grasa que la femenina.

MORFOLOGIA MICROSCOPICA

La piel está constituida por 3 capas situadas horizontalmente:

✓ **Epidermis**

✓ **Dermis**

✓ **Hipodermis** y otras estructuras (**anexos**) como pelo, uñas y glándulas: sebáceas, sudoríparas, apocrinas y ecrinas.

Como se observa en el esquema adjunto, se distinguen tres tipos de estructuras fundamentales:

- En la superficie, la epitelial, 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.

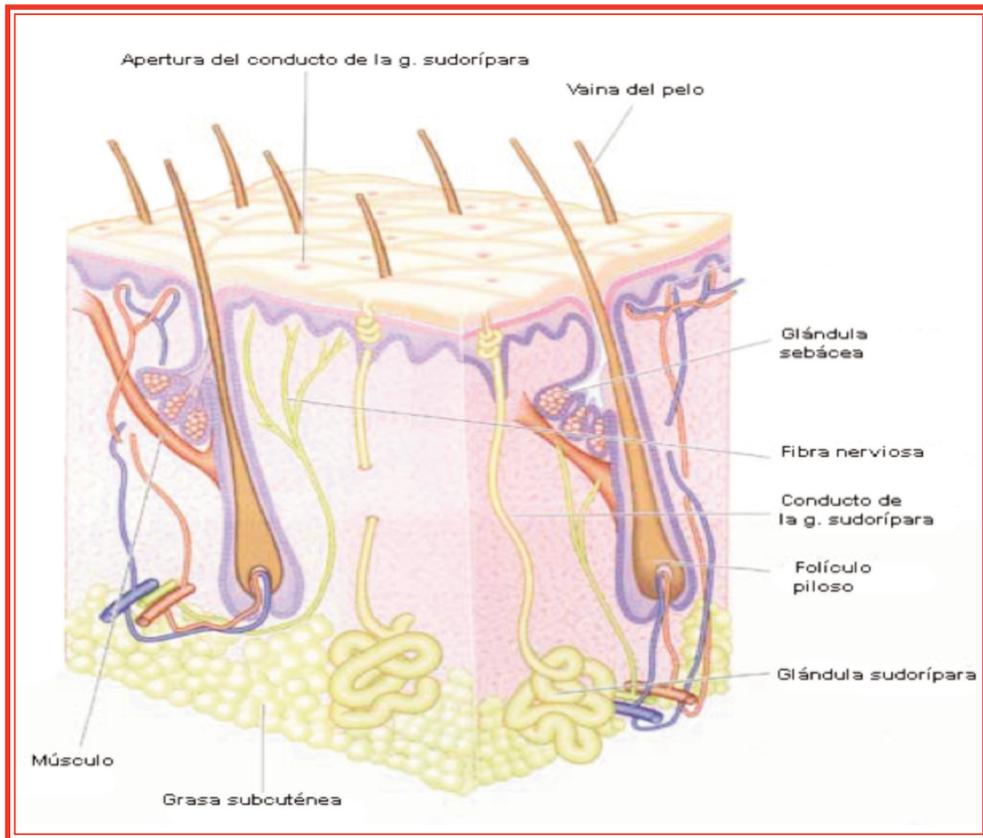


Figura 1.- Esquema microscópico de la piel

✓ EPIDERMIS

Constituye el estrato superficial o externo de la piel. Es un epitelio estratificado pavimentado con cuatro tipos de células:

- Los **queratinocitos** que son las células más numerosas (80 %), recubren la membrana basal y se fijan a la lámina lúcida por unas estructuras glicoprotéicas llamadas hemidesmosomas, van madurando desde el estrato basal y ascendiendo, formando los estratos espinoso, granuloso, lúcido (solamente en palmas y plantas) y córneo. Conforme ascienden va aumentando su contenido en queratina hasta que la célula se aplanan, muere y finalmente se desprende. Este ciclo o tiempo de tránsito epidérmico dura unos 30 días.

- Los **melanocitos**, responsables de la pigmentación de la piel, se disponen sobre el estrato germinativo en la zona basal del epitelio, entre los queratinocitos, con una relación de 1:8 o 10 respecto a éstos. Con microscopía óptica se caracterizan por un citoplasma pálido, núcleo ovoide y los melanosomas, que contienen las melaninas. Responden a estímulos inductores a través de unos receptores específicos de membrana, iniciando entonces la síntesis de los pigmentos. En este proceso interviene la enzima tirosinasa, que se activa cuando se une a una cuproproteína y recibe el estímulo necesario.

La interacción queratinocito-melanocito constituye la denominada *unidad melano-epidérmica*, que forma un complejo funcional de gran variabilidad, constituyendo una barrera continua frente a la radiaciones solares. Ésta es crítica para la diferenciación del melanocito e influye en la proliferación, formación de dendritas y melanización. El número de melanocitos es el mismo en todas las etnias humanas, aunque muestra distinta capacidad de sintetizar melanina y transferirla a las células adyacentes (Vicente, 1999).

- Las **células de Langerhans** son células dendríticas que constituyen entre el 2 y el 8 % de la población total de la epidermis. Se encuentran en su mayor parte en posición suprabasal, aunque están distribuidas en todo el estrato espinoso. Al microscopio, presentan una tinción pálida y tienen núcleos invaginados. El citoplasma contiene estructuras pequeñas, con forma de bastones o raquetas, denominados gránulos de Birbeck. Estas células tienen un papel decisivo en el sistema inmunológico cutáneo, pues actúan como presentadoras y procesadoras de antígenos a los linfocitos T de la epidermis, e intervienen en reacciones inmunológicas de tipo alérgico. Dicha función se ve alterada por la exposición a la RUV, sobre todo UVB (Valladeau, 2005).

- Las **células de Merkel** presentan características neuroendocrinas. Son consideradas como mecanorreceptores tipo I y se localizan en sitios de alta sensibilidad táctil. Sus marcadores in-

munohistoquímicos incluyen los péptidos de las queratinas K8, K18, K19 y la K20 (que es el marcador más fiable). Ultraestructuralmente se identifican por los gránulos de núcleo denso, similares a los 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 (Halata, 2003).

La epidermis está constituida por las siguientes capas o estratos que se renuevan totalmente de modo fisiológico cada dos meses:

- **Estrato Basal o Germinativo**, constituido por una capa de queratinocitos, cuyos citoplasmas contienen tonofibrillas y están unidos por estructuras desmosómicas, además de anclarse a la membrana basal por uniones de tipo hemidesmosómico. Su actividad mitótica origina nuevas células que sustituyen a las perdidas por la descamación. Su diferenciación consta de una serie de modificaciones morfológicas y metabólicas, cuidadosamente programadas, cuyo punto final es un queratinocito muerto o corneocito, que contiene filamentos de queratina, proteínas de la matriz y una membrana plasmática reforzada.

• **Estrato mucoso de Malpighio** o **Estrato Espinoso** llamado así por el aspecto “espinoso” de las células cuando se observan microscópicamente. Las espinas corresponden a abundantes desmosomas, que facilitan la adhesión de las células epidérmicas y la resistencia al estrés mecánico. Las células espinosas también contienen filamentos de queratina, organizados alrededor del núcleo, que se insertan periféricamente en los desmosomas. Presentan forma poligonal, con núcleos redondos y citoplasmas basófilos. Conforme se diferencian y se desplazan hacia arriba a través de la epidermis, se vuelven más aplanadas y desarrollan unos orgánulos denominados gránulos laminares, que contienen glucoproteínas, glucolípidos, fosfolípidos, esteroides libres y numerosas hidrolasas ácidas, incluyendo lipasas, proteasas, fosfatasa ácida y glucosidasas, así como las glucosil-ceramidas, precursoras de las ceramidas y componentes predominantes de los lípidos del estrato córneo (Herman, 2000 ; Yin, 2004).

• **Estrato granuloso**, consta de 3 a 5 capas de células aplanadas que contienen gránulos basófilos de queratohialina, precursora de la queratina. Están compuestos principalmente por profilagrina, filamentos de queratina y loricrina. Eventualmente, la filagrina se degrada en moléculas, incluyendo ácidos urocánico y pirrolidincarboxílico, que contri-

buyen a la hidratación del estrato córneo y a filtrar la radiación UV. La etapa final de la diferenciación de las células granulosas incluye su destrucción programada, se transforma en un corneocito.

- **Estrato lúcido**, se caracteriza por una zona muy delgada de características eosinófilas.
- **Estrato córneo**, constituido por células aplanadas (córneas o corneocitos), queratinizadas y anucleadas, en las que predomina la proteína fibrosa queratina. Constituye una barrera importante para impedir la pérdida de agua transcutánea. Su baja proporción de agua, así como los lípidos, proteínas y su adecuada ordenación, hacen de él una barrera semipermeable muy selectiva, capaz de sufrir traumas físicos y agresiones químicas y energéticas. Todos los días se eliminan varias capas de corneocitos (Segre, 2006).

Además de estas estructuras, la piel está compuesta por:

- **Corpúsculos de Meissner**: Preferentemente en la piel sin pelos: palmas, plantas, yema de los dedos, labios, punta de la lengua, pezones, glande y clítoris. Son los responsables del tacto fino.

-
- **Corpúsculos de Krause:** Proporcionan la sensación de frío.
 - **Corpúsculos de Pacini:** Dan la sensación de presión.
 - **Corpúsculos de Ruffini:** Registran el calor.
 - **Corpúsculos de Merckel:** Registran el tacto superficial.

Entre la Epidermis y la Dermis, se encuentra la **Membrana Basal**, una matriz extracelular compleja que separa la epidermis de la dermis y aísla los anejos cutáneos, los vasos sanguíneos y los nervios del tejido conjuntivo. Está constituida por dos capas contiguas: la lámina lúcida y la lámina densa.

La **unión dermoepidérmica (UDE)** es la zona que forma la interfase entre la epidermis y la dermis, cuya principal función es unir la epidermis con la dermis, 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 el constituyente mayor de la piel, ya que es entre 20-30 veces más gruesa que la epidermis; confiere flexibilidad, elasticidad y fuerza tensil. Además protege al organismo del daño mecánico, fija el agua, contribuye a la regulación térmica e incluye receptores de los estímulos sensoriales. 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 tras heridas.

Está constituida por tejido conjuntivo y los anexos cutáneos, que son de dos tipos: **córneos** (pelos y uñas) y **glandulares** (glándulas sebáceas y sudoríparas).

El tejido conjuntivo está compuesto a su vez por:

- **Componente celular fijo:** fibroblastos, mastocitos o células cebadas y células fagocíticas (macrófagos, histiocitos).
- **Componente celular migratorio:** leucocitos polimorfonucleares, eosinófilos, linfocitos y plasmocitos.

- **Sustancia fundamental, intercelular o amorfa:** que está compuesta por glucosa-minoglicanos, ácido hialurónico, condroitin-sulfato y dermatansulfato, que embeben gran cantidad de agua.

- **Proteínas fibrosas:** colágeno y elastina (Kielty, 1997).

El colágeno representa el 75% del peso seco de la piel y le proporciona fuerza tensil y elasticidad. Se distinguen varios tipos:

Colágeno tipo I: 80-90%

Colágeno tipo III: 8-12%

Colágeno tipo V: < 5%

Estos tipos 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. El otro componente fibrilar de la dermis corresponde a las fibras elásticas que dan elasticidad a la piel y le devuelven la forma normal después de contraerse o deformarse (Christiano, 1994).

ESTRUCTURA HISTOLÓGICA DE LA DERMIS

Consta de tres capas:

- **Dermis Papilar.** Limita con la epidermis y se amolda a su contorno por la presencia de prolongaciones dístales o papilas de forma mamelonada que ascienden contactando con la epidermis. Muestra un espesor que no supera el doble de la epidermis. Está compuesta por tejido conectivo laxo, fibras de colágeno tipo III, vasos sanguíneos de calibre capilar, linfáticos y fibras nerviosas. Esta zona tiene mayor celularidad y es asiento de los principales procesos metabólicos de la piel. El plexo subpapilar, un plano horizontal de vasos, marca los límites entre la dermis papilar y la reticular.
- **Dermis Reticular.** Es la porción más profunda, se encuentra localizada por debajo de las papilas dérmicas y es de mayor espesor, constituyendo la masa principal de la dermis. Está constituida principalmente por fibrillas de colágeno de gran diámetro, organizadas en fascículos grandes de fibras entretrejidas, con fibras elásticas ramificadas que rodean a los fascículos. Las fibras elásticas y los haces de colágeno aumentan de tamaño de forma progresiva hacia la hipodermis. En la porción inferior se localiza una capa de músculo liso, el *músculo erector del pelo*. El límite inferior de la dermis

reticular corresponde a la transición del tejido conjuntivo fibroso al tejido conjuntivo adiposo de la hipodermis.

- **Tejido Subcutáneo (Hipodermis).** Está compuesto de tejido conjuntivo laxo y adiposo, cuyas funciones fundamentales corresponden a la *regulación térmica y al movimiento*. Puede alcanzar un grosor variable, sobre todo en algunas zonas concretas, como el abdomen y las caderas, ya que interviene en el almacenamiento y movilización de lípidos para cubrir las necesidades energéticas. 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.

Los adipocitos son el componente celular principal. Se disponen en lóbulos separados por tabiques de tejido conjuntivo fibroso. Los nervios, vasos sanguíneos 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 (Holst, 2002).

✓ **HIPODERMIS.**

Glándulas Sebáceas: Relacionan a la epidermis y la dermis a través de su función; cuando el folículo piloso es movido por el músculo erector del pelo comprime a la vez a la glándula sebácea y ésta secreta al exterior a través de la epidermis.

Tabla 1: Funciones Cutáneas

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

Glándulas sudoríparas: También relacionan a los tres estratos, pues se localizan a lo largo de los tres, tienen capacidad de evaporar el agua y de controlar con ello la temperatura corporal.

La piel es uno de los órganos corporales con mayor número de funciones, entre las que destacan la protección, secreción de productos sintetizados por algunos de sus anejos, excreción de distintos tipos de sustancias, termorregulación, sensación y, fundamentalmente comunicación. Esto explica la gran complejidad de su estructura.

✓ **Protección** frente a traumatismos mecánicos, físicos o químicos. La función más importante de la piel es formar una barrera efectiva entre el “interior” y el “exterior” del organismo; su superficie relativamente impermeable evita la deshidratación y actúa como una barrera física frente a la invasión por microorganismos. Ésta corresponde principalmente al estrato córneo, aunque las capas epidérmicas nucleadas, sobre todo las uniones intercelulares y las proteínas del citoesqueleto proporcionan otros elementos importantes. La barrera químico/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).

✓ **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. 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 (tacto: Meissner, Krause, Discos de Merkel; dolor, prurito y temperatura: Ruffini, Vater-Paccini), etc.. (Critchley, 2002).

✓ **Termorregulación:** La piel actúa como regulador térmico o aislante. 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 ejercen un papel importante en la regulación térmica; de hecho, gran cantidad de calor se elimina del organismo con la evaporación del sudor. El pánículo 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 ade-

cuada, independiente-mente de la temperatura externa) dentro de ciertos límites (Falk, 1998).

- ✓ **Secreción y excreción:** Citocrina melánica, ecrina sudorípara, apocrina sudorípara y mamaria, holocrina sebácea. A través de la piel son eliminados catabolitos y otras sustancias de desecho del interior del organismo. La piel elimina CO₂, agua y grasa, además son eliminados 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 etc.
- ✓ **Reserva y depósito de energía:** Tejido celular subcutáneo.
- ✓ **Defensa inmunológica:** Queratinocitos, células de Langerhans, dendrocitos dérmicos.
- ✓ **Comunicación:** la piel es el "órgano de las relaciones sociales", de ahí la gran importancia que tiene su cuidado y su aspecto en la actualidad (Pons, 2004).

RADIACIÓN SOLAR

El espectro solar está formado por radiaciones de distinta longitud de onda, cuya energía es inversamente proporcional a su longitud de onda (Sánchez-Saldaña, 2002).

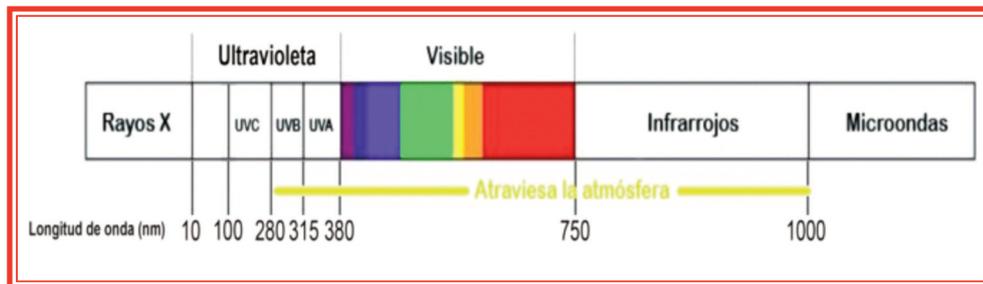


Figura 2.- Características de las radiaciones del espectro solar según (Honeyman, 2002)

Tabla 2: Características de la radiaciones.

Radiación		Longitud de Onda	Energía
		nm	Kcal/Einstein
Infra rojo	Lejano	10.000 (10 micrometros)	2.86
	Cercano	1.000 (1 mcm)	28.60
Luz Visible	Rojo	700	40.8
	Anaranjado	620	46.1
	Verde	530	49.3
	Azul	470	60.8
Ultravioleta	UV-A 1	340-400	68.1-89.4
	UV-A 2	315-340	68.1-89.4
	UV-B	280-315	89.4-102.1
	UV-C	<280	>102.1

La **Radiación Ultravioleta** comprende aproximadamente entre el 5 y el 10% de toda la energía del espectro solar, de la que la luz visible supone el 50% y la infrarroja cerca del 40%. Pero estos porcentajes pueden variar por distintos factores como latitud, altitud, capa de nubes, polución, concentración de la capa de ozono, estación del año y ángulo del cenit solar y variar según las horas. Las radiaciones ultravioleta que llegan a la superficie terrestre suponen alrededor del 7% de las radiaciones solares. El 6,7% son UVA y el 0,3% son UVB; mientras que la radiación UVC es absorbida por la capa de ozono (*Montero, 2008*). A su vez se divide en varias bandas de emisión con características y efectos diferentes:

UV-A (320-400 nm): se denomina también región de onda larga o cercana a la infrarroja. Es la encargada de producir la reacción de bronceado cutáneo inmediato y tardío, con o sin eritema, además es la responsable del fotoenvejecimiento, de la fotosensibilidad cutánea y de la inmunosupresión. La franja UVA I es menos eritematogena y melanogena que la franja UVA II. Esta última tiene efectos similares a la radiación UVB respecto a la inducción de quemadura solar, pigmentación y proliferación de melanocitos. Esta banda se encuentra asimismo en fuentes de luz artificial como las lámparas de vapor de mercurio y los fluorescentes. Estos últimos se utilizan para fototerapia y fotoquimioterapia y tienen la capacidad de atravesar los cristales.

UV-B (290-320 nm): es conocida también como radiación de la quemadura solar. A dosis moderadas estimula la formación de vitamina D, pero también causa eritema solar y desencadena la verdadera pigmentación de la piel con formación de melanina. Origina engrosamiento del estrato córneo, disminución de la capacidad del sistema inmunológico y cáncer cutáneo. A nivel ocular produce irritación de la conjuntiva y la córnea. Está presente en fuentes artificiales de luz como las lámparas de vapor de mercurio. Es filtrada por el cristal, pero no por el cristal de cuarzo ni el agua.

UV-C (100-290 nm): es la de menor longitud de onda, se denomina también radiación germicida. Está presente solo a gran altitud, pues afortunadamente es absorbida por la capa de ozono, ya que es letal para todos los seres vivos. Es eritematogena, mutagénica y carcinogénica en animales de experimentación. Pero al ser absorbida totalmente por la capa de ozono y filtrada por el oxígeno no llega a la superficie terrestre. Sin embargo, se produce artificialmente y se encuentra en las lámparas de xenón y las de vapor de mercurio. Estas radiaciones son bloqueadas por el cristal de las ventanas.

Los **rayos Infrarrojos** corresponden a las radiaciones del espectro solar responsables del efecto calórico del sol y que además aumentan la capacidad eritematogena de la RUV.

Además existen diversos **factores** o **procesos ópticos** que participan en la captación de las radiaciones:

- 1.- *Reflexión* directa y epidérmica.
- 2.- *Dispersión* en los tejidos y células de la piel.
- 3.- *Transmisión* directa.
- 4.- *Absorción*: Sólo la absorbida es capaz de iniciar cambios fotoquímicos que provoquen respuestas fotobiológicas.

A su vez, cada radiación tiene un nivel de penetración distinto en su contacto con la piel humana:

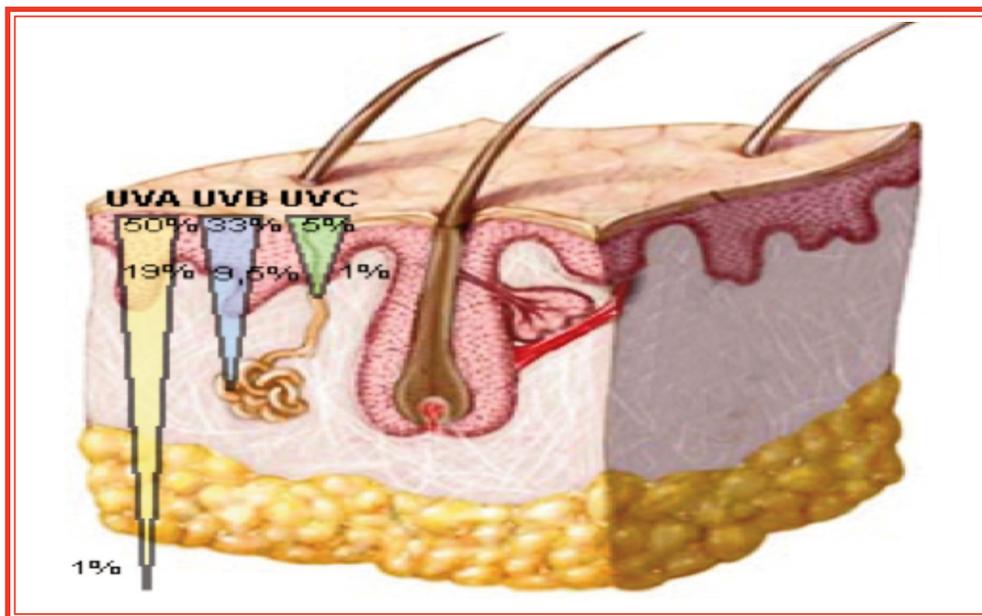


Figura 3.- Penetración de las RUV en la piel.

Patología de la RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

La **radiación solar** origina alteraciones cutáneas porque las RUV son absorbidas por determinadas moléculas o cromóforos específicos: ADN, ARN, proteínas, melaninas, lípidos de las membranas y organelas celulares de la epidermis y dermis, que tras su liberación, originan reacciones fotoquímicas a través del daño directo o por daño oxidativo indirecto. Esto da lugar a la liberación de mediadores inflamatorios que modulan el comportamiento de una serie de tipos celulares (queratinocitos, células de Langerhans, fibroblastos, etc.). Estos efectos son acumulativos y dosis-dependiente, y están en relación con la duración, frecuencia y calidad e intensidad de la radiación. Se han clasificado en dos grandes grupos (*Sánchez-Saldaña, 2002*).

PATOLOGÍA AGUDA.

A.- Eritema / quemadura solar.

El enrojecimiento y la quemadura solar es la respuesta cutánea aguda más conocida tras la exposición a RUV. Se caracteriza por enrojecimiento, calor, dolor y tumefacción de la zona fundamentalmente en individuos de fototipos I a III. El mecanismo no está bien establecido; no se conoce con precisión cuáles son los cromóforos responsables, pero la hipótesis del daño di-

recto de los UVB y UVA de onda corta sobre el ADN, se sumaría al daño oxidativo indirecto, secundario a las reacciones endógenas de fotosensibilidad. Las secuelas agudas se caracterizan por eritema.

El enrojecimiento es debido a la congestión por dilatación de los vasos sanguíneos superficiales de la dermis (vénulas subcapilares), lo que puede ocurrir en una persona rubia tras una exposición al sol de media hora al medio día. Este eritema puede permanecer entre 8 y 12 h y desaparece a los varios días.

Cuanto mayor es la exposición, menor es el tiempo de aparición y persiste durante más tiempo y con mayor intensidad. Dosis mayores de exposición pueden originar edema, dolor, ampollas y descamación.

Las pieles moderadamente pigmentadas precisan entre dos y cuatro veces más exposición, mientras que las fuertemente pigmentadas no suelen quemarse. Hay que tener en cuenta que tanto los niños como los ancianos son más sensibles: los primeros porque su sistema melánico no está totalmente desarrollado y los ancianos porque lo tienen disminuido, ya que se calcula a que a partir de los 30 años disminuye un 10% el número de melanocitos (Iozumi 1993).

B.- Bronceado:

La pigmentación o bronceado inmediatos se presentan a los pocos minutos de la exposición. Esta pigmentación tiende a desaparecer en minutos; pero si la exposición es continua y prolongada puede durar varios días y se combina con el bronceado tardío. Este bronceado sería consecuencia de longitudes de onda comprendidas entre los 320-450 nm, que corresponderían a UVB de onda larga, UVA y luz visible. Los cambios histológicos observados corresponderían a la oxidación de la melanina existente y a la migración de los melanosomas a las dendritas y al citoplasma de los queratinocitos.

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

PATOLOGÍA SUBAGUDA

Se caracteriza por **hiperplasia** o **engrosamiento** progresivo de la **piel**, de forma que hacia la 7ª semana puede aumentar hasta cinco veces el espesor del estrato córneo. Dicha reacción

es reversible, ya que tras varios meses sin exposición, puede volver al espesor normal. Constituye un mecanismo de defensa endógeno más importante que el bronceado.

PATOLOGÍA CRÓNICA

A.- Fotoenvejecimiento:

El fotoenvejecimiento se caracteriza por sequedad de la piel, con aparición de arrugas profundas, surcos cada vez más acentuados, pérdida de la elasticidad, pigmentación moteada y telangiectasias que representan cambios estructurales profundos de la dermis. Es un proceso degenerativo multisistémico y acumulativo cutáneo, que depende fundamentalmente de la exposición al sol y de la pigmentación de la piel. Afecta a las zonas expuestas al sol (Sjerobabski, 2008).

B.- Fotocarcinogénesis:

Diversos factores extrínsecos (RUV) e intrínsecos, pueden modificar la capacidad reparadora del ADN celular. La radiación UVB tiene la capacidad de dañar proteínas, ácidos nucleicos, etc., por lo que altera la capacidad reparadora del ADN, a través de mutaciones de los genes que participan en los procesos de reparación celular, lo que, junto a la disminución del 25-50% de las

células de Langerhans (en la que también se ha descrito la acción de la RUVA), disminuye la capacidad de detectar y destruir células alteradas, permitiendo la progresión de neoplasias.

C.- Alteraciones oculares:

- **Agudas:** queratitis, conjuntivitis, etc.
- **Crónicas:** cristalino (cataratas), retina, etc.

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

ENVEJECIMIENTO CUTÁNEO

La piel, como los restantes órganos del organismo, sufre el fenómeno del **envejecimiento** denominado **intrínseco** o **fisiológico**, que es la consecuencia del paso del tiempo, pero además, y a diferencia con los otros órganos, puede sufrir el denominado **envejecimiento extrínseco** o **fotoenvejecimiento**, que es patológico; más precoz en su presentación que el anterior y de mayor gravedad, puesto que está íntimamente relacionado con el cáncer cutáneo. En cierto modo, puede ser autoprovocado, puesto que es debido a la exposición crónica al sol (Vicente, 1999).

El envejecimiento es un fenómeno biológico complejo, que puede definirse como un declinar progresivo en la homeostasis, además de la incapacidad del organismo para responder al estrés. Existen diversas teorías para explicar dichos fenómenos. Desde las que están basadas en el papel de los factores genéticos (a los que actualmente se les atribuye alrededor del 30%), a otras que refuerzan el papel de los factores exógenos o ambientales hasta en un 70% junto a los factores epigenéticos.

ENVEJECIMIENTO CUTÁNEO INTRÍNSECO O CRONOLÓGICO

Este fenómeno se inicia a partir de los 30 años, intensificándose entre los 40 y 50 años, coincidiendo con la menopausia en las mujeres.

El envejecimiento intrínseco afecta a todas las capas de la piel: epidermis, dermis e hipodermis, así como a todas las estructuras que las componen, como glándulas, vasos, nervios y sus diferentes células, lo que lleva al adelgazamiento gradual de la piel y a la atrofia. Es un conjunto de cambios clínicos, histológicos y fisiológicos que acontecen con la edad y que afectan al recambio celular epidérmico, al aclaramiento de varias sustancias de la dermis, al grosor y a la celularidad de la propia dermis, a la termorregulación y la cicatrización, a la respuesta inmunológica, a la

percepción sensorial, a la producción de glándulas sebáceas y sudoríparas, y a la síntesis de vitamina D.

En general, en el envejecimiento cronológico o intrínseco se produce una alteración del metabolismo, que se manifiesta por descenso de los procesos anabólicos e incremento de las actividades responsables del catabolismo (*Branco, 2010*).

Los cambios estructurales y funcionales del envejecimiento normal de la piel hacen que la epidermis se vuelva más delgada; el número de melanocitos y células de Langerhans disminuye; la dermis es relativamente acelular y avascular y se atrofia; el colágeno dérmico, los glucosaminoglicanos y la elastina sufren alteraciones; el número de glándulas apocrinas se reduce; las glándulas sebáceas, aunque aumentadas de tamaño, disminuyen su secreción; las uñas se vuelven más delgadas y la densidad de los folículos pilosos sufre una reducción progresiva; el diámetro del pelo también se reduce, etc.

CAMBIOS CLÍNICOS (Glogau, 1997):

El deterioro de la **piel** más llamativo desde el punto de vista clínico que se produce por la edad corresponde a las **arrugas**. Estas son la consecuencia de alteraciones físico-químicas y estructurales por la pérdida gradual de tres elementos muy importantes para la **piel**:

-
- ❖ COLÁGENO (la fibra proteínica que da firmeza a la piel), lo que provoca que se vuelva más delgada y débil.
 - ❖ ELASTINA responsable de la elasticidad;
 - ❖ GLICOSAMINOGLICANOS, por su capacidad de retención de agua.

Además se suele acompañar de:

- Adelgazamiento de la superficie cutánea (15% a partir de los 60 años) y de la dermis (alrededor del 20%).
- Profundización de los surcos.
- Disminución de la elasticidad y flexibilidad.
- Disminución de la producción de sebo y aumento de la permeabilidad (sequedad y descamación).
- Alteración de la percepción sensorial.
- Disminución del espesor y de la velocidad de crecimiento de las uñas (estrías y fragilidad).
- Alteraciones del pelo (alopecia y canicie).
- Mayor fragilidad y menor eficacia como barrera.

- Trastornos de la termorregulación, con tendencia a la hipotermia o golpe de calor en temperaturas extremas.
- Infecciones crónicas más frecuentes.
- Aumento del umbral doloroso.
- Menor resistencia a pequeños traumas.
- Facilidad de rotura de los vasos
- Frialdad cutánea, alteración de la respuesta inflamatoria, cicatrización lenta y anómala.
- Crecimiento del vello en las cejas, orificios nasales, conducto auditivo externo y parte anterior del tórax en los hombres. En la mujeres en el área del bigote y la barba.
- Disminución del número de folículos por cm² del cuero cabelludo, con encanecimiento y aumento del grosor del pelo.

CAMBIOS HISTOLÓGICOS:

A). EPIDERMIS:

- ❖ Aplanamiento de la unión dermoepidérmica (con borramiento y disminución al 50% de las papilas dérmicas y de las crestas interpapilares), con mayor tendencia a las abrasiones y la aparición de ampollas.
- ❖ Grosor variable (acantosis, atrofia).
- ❖ Estrato córneo estable.
- ❖ Pleomorfismo.
- ❖ Queratinocitos con tamaño y forma variable.
- ❖ Atipia nuclear ocasional.
- ❖ Disminución del número de melanocitos (10%/década/30 años)
- ❖ Menos células de Langerhans (20-50%), con menor capacidad de la respuesta inmune cutánea.

B). DERMIS.

Sufre una disminución de grosor y de la celularidad, así como aplanamiento y ensanchamiento de las papilas dérmicas. La disminución del grosor dérmico se aproxima al 20%, aunque en las zonas no expuestas al sol, ocurre sólo después de la octava década.

Existe engrosamiento de la pared vascular, junto con degeneración del componente elástico de las arteriolas. Esta pérdida del lecho vascular provoca una piel más pálida, disminución de la temperatura y reducción del flujo hasta el 60%, que junto a la disminución de la grasa favorece el golpe de calor y/o la hipotermia.

En cuanto a los componentes estructurales de la dermis:

- **El colágeno** Representa el 80% del peso seco de la piel del adulto y posee una gran fuerza tensil, impidiendo que la piel se rasgue por el estiramiento. Se ha usado como marcador del envejecimiento cutáneo en numerosos estudios, considerándose que su déficit es la razón principal del envejecimiento cutáneo. La concentración de colágeno por unidad de superficie disminuye un 1% por año durante toda la vida y las fibras que van quedando presentan un aspecto desorganizado, más compacto y granular. De modo que *el grosor de la piel está íntimamente relacionado con la cantidad y calidad del colágeno que contiene.*

Con el envejecimiento existe una disminución de la síntesis de colágeno y de enzimas implicadas en el procesamiento postraducciona del colágeno en la piel. La molécula de colágeno del anciano no difiere mucho de la de una persona joven, sin embargo su cantidad y su malla se hacen más gruesas y degeneran. El colágeno cutáneo se hace cada vez menos soluble con la edad y hay una disminución de la síntesis de nuevo colágeno. La consecuencia clínica de la descompensación del contenido de colágeno provoca un aumento de la laxitud y aparecen las arrugas.

La dermis además se caracteriza por un descenso significativo de glucosaminoglicanos, que presentan una alta capacidad de unión al agua y son esenciales para la hidratación normal lo que explica la apariencia seca y arrugada de la piel envejecida.

- **La elastina**, es una proteína elástica que mantiene la tensión cutánea de la piel y representa el 5% de la dermis.

C). ANEJOS CUTÁNEOS.

- Disminuye el número de pelos por cm² de superficie cutánea. (calvicie temporal, occipital, etc.).

- Disminuye la pigmentación melánica, dando lugar a las canas o canicie. De modo que en la quinta década de la vida, el 50% de la población posee un 50% de cabello canoso y el 100% de la población posee alguna cana debido a la pérdida de melanocitos del bulbo capilar.
- Aumentan los pelos en la orejas, fosas nasales, así como en labio superior y la barbilla.
- Alteraciones en las uñas.
- Disminuyen las glándulas sebáceas y sudoríparas.
- Disminuyen $\frac{1}{3}$ las células de Meissner, Pacini, Merckel (encargadas de la sensibilidad).

CAMBIOS FUNCIONALES:

Con la edad también se van alterando distintas funciones:

- Disminuye la función barrera.
- Disminuye el recambio celular (senescencia).
- Disminuye la eliminación de productos de catabolismo o degradación.
- Disminuye la percepción sensorial.
- Disminuye la protección mecánica.
- Disminuye la producción de sudor, sebo y vitamina D.

-
- Disminuyen los niveles hormonales.
 - Disminuye la elasticidad y flexibilidad.
 - Aumenta la fragilidad (abrasiones, ampollas).
 - Aumentan las infecciones.
 - Retraso en la curación de las heridas.
 - Alteraciones en la reparación del DNA.
 - Alteraciones en la respuesta inmunológica.
 - Alteraciones en la termorregulación.

ENVEJECIMIENTO EXTRINSECO / FOTOENVEJECIMIENTO

Es un proceso que se caracteriza por la aparición prematura de lesiones en la piel; comienza desde una edad temprana, normalmente cuando no se toman precauciones frente a la exposición solar. Se ha especulado que quizás hasta el 80% de los cambios inducidos en la piel por las radiaciones ultravioleta, ocurren durante los primeros veinte años de la vida, a excepción de aquellas personas que por su profesión o estilo de vida sufren una exposición intensa durante la vida adulta (Vicente, 1999).

El proceso de fotoenvejecimiento incluye daños molecula-

res, estructurales y funcionales de la piel, con una llamativa traducción clínica: piel atrófica, arrugada, con cambios en la coloración, telangiectasias, etc., que además se van a acompañar frecuentemente de la presentación de lesiones neoplásicas benignas (queratosis seborreicas, léntigos, hiperplasias sebáceas); lesiones premalignas como queratosis actínicas (placas rojas con escama) o tumores malignos como carcinomas escamosos o melanomas.

Los cambios cutáneos característicos del fotoenvejecimiento han sido agrupados por Castelo-Branco en 2010, según la edad de los individuos expuestos al sol de forma crónica en:

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

1.- Cambios Clínicos.

Tipo I: Edad: 20-30 a. Fotoenvejecimiento Leve.

- Ligeros cambios por fotoenvejecimiento
- Escasos cambios en la pigmentación
- No hay queratosis actínicas
- No hay arrugas o son mínimas

Tipo II: Edad: 30-50 a. Fotoenvejecimiento Moderado.

- Arrugas finas y paralelas: comisuras boca y ojos
- Léntigos seniles incipientes
- Queratosis actínicas palpables, pero no visibles
- Alopecia temporal y occipital

Tipo III: Edad: 50-60a. Fotoenvejecimiento importante.

- Arrugas estables en la frente (expresión), peribucales y periorbitarias
- Intensificación p. geométrico
- Discromías (manchas, lentiginosis, etc.)
- Sequedad y descamación
- Telangiectasias
- Queratosis visibles
- Canicie (en mayores de 50 años, el 100% presenta alguna cana y el 50% se considera canoso pues mas del 50% de su pelo es blanco).

Tipo IV: Edad: >60 a. Fotoenvejecimiento Severo.

- Arrugas totales en región facial y zonas descubiertas
- Mayor profundidad de los surcos cutáneos
- Piel engrosada, irregular, granulosa, nodular
- Piel amarillento-grisácea, lentigos, hipocromías, etc.
- Lagos sanguíneos (hematomas)
- Queratosis con frecuente transformación en carcino

- Crecimiento del pelo en: cejas, fosas nasales y conducto auditivo
- En mujeres en labio superior y barba
- Alteración uñas: frágiles, estrías, amarillas, grisáceas
- Pérdida de la elasticidad.
- Disminución de la sudoración
- Producción de escamas
- Comedones

2.- Cambios funcionales: los descritos en el envejecimiento intrínseco, pero agravados o de mayor intensidad.

3.- Cambios Histológicos:

EPIDERMIS

- Engrosamiento reactivo alternando con áreas de atrofia
- Alargamiento de las crestas epidérmicas
- Pérdida de la polaridad celular con hiperplasia de células basales
- Pleomorfismo celular y nuclear (atipia)
- Disminución marcada del número y función de las células de Langerhans

DERMIS

- Zona de Grenz en la dermis papilar
- Engrosamiento y alteración funcional de las fibras elásticas
- Aumento de material elastótico amorfo
- Aumento de la colagenogénesis y de fibroblastos activados
- Aumento de la actividad de la colagenasa
- Disminución del colágeno maduro
- Colágeno fragmentado
- Aumento de glucosaminoglicanos y proteoglicanos
- Desorganización marcada de vasos capilares
- Aumento de grosor de venas post- capilares
- Disfunción marcada en número y función de glándulas sudoríparas
- Aumento marcado del tamaño de glándulas sebáceas con disminución de la función

4. Cambios Patológicos:

Con la edad se va produciendo un agotamiento progresivo de la inmunovigilancia, lo que favorece una respuesta inmunológica anormal o patológica. De modo que más del 60% de los mayores de 65 años presentan algún tipo de dermatosis que requiere tratamiento médico.

Los principales problemas de la piel anciana son:

- ✓ Prurito
- ✓ Asteatosis
- ✓ Eccema
- ✓ Penfigoide
- ✓ Herpes zoster
- ✓ Queratosis seborreica
- ✓ Queratosis actínica
- ✓ Carcinoma basocelular
- ✓ Carcinoma espinocelular
- ✓ Léntigo maligno
- ✓ Melanoma

SISTEMAS DE PROTECCIÓN CUTÁNEA

De modo fisiológico, existe una reserva biológica protectora frente al sol, para reducir los efectos de la exposición solar. Esta representa una adaptación individual, que está determinada genéticamente para defenderse de las radiaciones solares, en especial de las RUV, a través de:

- **Melanogénesis:** consiste en el proceso de síntesis y distribución de las melaninas (eumelanina y feomelanina) responsables del color de la piel y del cabello. Este proceso está regulado por diferentes factores de tipo ambiental (radiaciones solares, traumatismos, etc.), estímulos hormonales (MSH, ACTH), inmunitarios y factores hereditarios (Latour 1992 y Hirobe 1995).

El color de la piel va a depender, en su mayor parte, de la cantidad de melanina y de su composición química (eumelanina, feomelanina, etc.): La eumelanina es un filtro activo contra la radiación UV pero no así la feomelanina, característica de los pelirrojos, que no es fotoprotectora. Ambas son sintetizadas en las mismas células, aunque en proporción variable en las distintas etnias; así, en la negra, la enzima tirosinasa es diez veces más activa y origina diez veces más melanina que en la etnia blanca (Iozumi, 1993).

Además, el color de la piel va a depender de un fenómeno de adaptación a las diferentes intensidades de las radiaciones ultravioleta ambientales en las áreas del hábitat original (Holubar, 1998), y en menor proporción de la hemoglobina de la sangre de los vasos dérmicos y de los carotenos procedentes de los alimentos. También otros muchos componentes de los alimentos y numerosas sustancias exógenas como conservantes, colorantes e incluso medicamentos pueden alterar la pigmentación cutánea.

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

No obstante, la gran variedad individual de la especie humana es la responsable de que no todos respondamos de igual forma ante la agresión solar, ya que los mecanismos intrínsecos de protección no son idénticos.

En este sentido Fitzpatrick (1975), definió **seis fototipos cutáneos** que son universalmente admitidos (*Honeyman, 2002*):

Tabla 3: Fototipos según Fitzpatrick, 1975				
Fototipo	Quemaduras	Bronceado	Color Piel	Grupos de individuos, etnias
I	Siempre	No	Muy blanca	Pecosos, pelirrojos, celtas
II	Muy fácilmente	Mínimo	Blanca	Nórdico europeo y centroeuropeo
III	Fácilmente	Gradual	Lig. morena	Cabello rubio/moreno
IV	Ocasionalmente	Sí	Morena	Latinos
V	Raramente	Intenso y rápido	Muy morena	Árabes, asiáticos, indios
VI	Nunca	Máximo	Negra	Negros

Su utilidad consiste fundamentalmente en que permite la estimación del riesgo relativo de desarrollo de alteraciones agudas y crónicas por efecto de la exposición a la radiación UV, y que han sido resumidas en:

Los **fototipos I y II** corresponden a personas que en general presentan piel clara, cabellos rubios o pelirrojos, ojos de color azulado, a veces con pecas (efélides). Son consideradas como “melanocitocomprometidas”. Deben evitar exposiciones solares intensas desde edad muy temprana y a lo largo de toda la vida, y utilizar fotoprotección.

Los **fototipos III y IV** también pertenecen al grupo de población blanca o ligeramente pigmentada. Son considerados “melanocitocompetentes” por la pigmentación constitucional o adquirida (bronceado), presentan protección adecuada frente a los efectos de la radiación solar en situaciones de irradiación normal, pero su susceptibilidad al daño agudo y crónico dependerá de los hábitos de exposición solar y la latitud geográfica donde vivan.

Los **fototipos V y VI** generan un denso filtro protector de melanina al exponerse a las radiaciones UV. Son “melanocitocompetentes” y los cambios de foto-envejecimiento se manifiestan a partir de los 40-50 años de edad (Montero, 2004).

La pigmentación cutánea se debe a unos gránulos, localizados en los citoplasmas de una población de células especiales de morfología dendrítica, que aunque derivadas de la cresta neural, se encuentran en la capa inferior de la epidermis, llamadas melanocitos. Éstos son muy escasos, se calcula que hay entre 1.000 y 2.000 melanocitos por mm³ de piel, lo que supone alrededor del 10% de las células epiteliales. Su masa total, que constituye el denominado sistema pigmentario melánico, pesa alrededor de 1,5g, pero están enormemente especializados, puesto que son los responsables últimos de la pigmentación de la piel, pelo y ojos (Quevedo, 1987).

El número de melanocitos es el mismo en todas las etnias humanas, lo que varía es la capacidad de sintetizar melanina y de transportarla a los queratinocitos adyacentes. (Vicente, 1999)

Por otro lado, la sensibilidad individual a la radiación UV, se determina con la **dosis eritematogena mínima** (DEM, MED en inglés), que se define como la cantidad mínima de radiación capaz de inducir eritema en la piel de la persona estudiada. La exposición a radiaciones (flujo, dosis) se mide en julios (J) o milijulios (mJ) por centímetro cuadrado (J/cm²) (Montero, 2004).

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

TRATAMIENTO DEL FOTOENVEJECIMIENTO CUTANEO

HISTORIA

La historia parece demostrar “el peligro que pueden entrañar algunos modelos de atractivo físico o belleza basados en el color de la piel”.

Hasta el siglo XVI, los conocimientos sobre el color de la piel se basaban en los mitos del mundo antiguo, fundamentalmente dirigidos a explicar el color negro de los africanos, más que a aclarar la palidez de los caucásicos; de modo que en Europa existían dos teorías: una que responsabilizaba al calor y al sol de esos países y otra que apoyaba un origen divino. Dichas opiniones fueron cuestionadas a partir del descubrimiento de América, al ser encontrados individuos amarillo cobrizo, lo que hizo que se fueran desarrollando nuevas técnicas de disección de la piel y nuevos métodos de estudios clínicos.

Para el mundo griego y romano el color de la piel se debía al efecto del sol sobre algún humor interno. Esta creencia se mantuvo durante la edad media, e incluso el renacimiento, época en la que el binomio palidez-belleza adquirió tal esplendor que las mujeres que querían estar a la moda comían greda y bebían vinagre, con el fin de alcanzar un grado de palidez enfermiza que constituía el máximo de belleza; incluso varios siglos después lo encontramos reflejado en una canción de García Lorca (1934):

“Que romántica eras, bebías vinagre a escondidas de la abuela y te pusiste blanca como una celinda primavera”.

En el siglo XVII, Sir Thomas Browne realizó un estudio más detallado del color de la piel en diferentes razas, concluyendo que éste no dependía del clima y atribuyéndolo a algún factor del esperma. Posteriormente, se responsabilizó a alguna sustancia contenida en la bilis, puesto que existían observaciones de que la bilis cuando se exponía al sol viraba a negro. También se le achacó a la sangre.

En el siglo XVIII, las variaciones en la pigmentación cutánea adquieren connotaciones sociales y se considera que los negros africano no son hermanos de los europeos, sino que blancos y negros eran dos especies separadas (Vicente, 1999).

Es a partir de 1840, cuando el desarrollo del microscopio permitió demostrar la estructura celular de la piel, cuando comienza el conocimiento científico moderno, tanto de su estructura y función, como de la pigmentación cutánea (Holubar 1998).

En el color de la piel se distingue:

- Una **pigmentación constitutiva** que está basada en el color sin la exposición, es decir en el color determinado genéticamente.

- Una **pigmentación facultativa** que es la coloración que se desarrolla tras la exposición al sol o a modificaciones endocrinas.

Ambas son la base de la **clasificación de Fitzpatrick**, 1975, antes referida, que mide la función protectora de la melanina frente al sol.

En la actualidad, el bronceado de la piel es considerado como factor cosmético y por tanto relacionado con la belleza, y esto es así sólo a partir del primer tercio de nuestro siglo XX cuando, de forma masiva, comienzan a cambiar los gustos estéticos de la mayoría de la población.

A partir del periodo entre las dos guerras mundiales, se extiende la opinión sobre el efecto beneficioso del sol. Un hito importante en este sentido lo constituye Coco Chanel, una de las vanguardistas del bronceado, de forma que la exposición al sol a partir de esta fecha, es considerada como la consecución de una mayor libertad individual y por tanto algo socialmente deseable (Vicente, 1999).

El bronceado consiste en el aumento de la pigmentación melánica facultativa, es decir la que se obtiene tras la exposición al sol. Es de producción inmediata (1-2 h) y tarda en completarse uno o dos días, aumentando gradualmente durante varios días y

puede persistir durante semanas o meses.

Hasta hace aproximadamente un siglo, la palidez significaba pertenencia a un alto estatus social, por lo que pasar al predominio del bronceado ha supuesto un cambio total de estilo de vida.

Durante las últimas décadas, la exposición solar ha sufrido un aumento considerable, sobre todo la intermitente o de tipo recreativo, por lo que la **“dermatoheliosis”** se produce también en personas jóvenes, que se exponen caprichosamente a la radiación solar sin protección, o a fuentes de luz ultravioleta artificial, buscando un bronceado rápido, más frecuentemente mujeres jóvenes. Durante los últimos años se ha ido generando de forma paulatina un nuevo cambio, gracias a la acumulación de conocimientos en el sentido de que la exposición solar y por tanto, el bronceado, comportan un riesgo (*Camacho, 2001*).

Cuando la radiación solar incide sobre la piel, ésta pone en marcha una serie de mecanismos para reparar la agresión sufrida. Sin embargo, exposiciones prolongadas o en condiciones extremas, hacen que estos mecanismos se sobrepasen, siendo entonces necesaria la protección externa.

FOTOPROTECCIÓN

Consta a su vez de dos aspectos, la **intrínseca** o **endógena**, también llamada **natural** (antes comentada) y la **fotoprotección**

externa o artificial que se basa fundamentalmente en el uso de **FOTOPROTECTORES**, sustancias en cuya composición se incluyen filtros solares que, usados tópicamente, cumplen la misión de prevenir los daños causados por la radiación solar.

Principios generales de la fotoprotección:

- **Absorción y disminución de la transmisión de RUV.** Se realiza en el estrato córneo, mediante el uso de sustancias químicas absorbentes de RUV B (290-315 nm) y RUV A (315-400 nm).
- **Aumento de la dispersión de RUV:** Se produce en el estrato córneo y en la epidermis, mediante el uso tópico de partículas micronizadas de dióxido de titanio, óxido de cinc o melanina.
- **Inactivación de los radicales libres y formas reactivas de oxígeno** (singlete, anión superóxido, radical hidróxilo, etc.): Se produce en las células viables de la epidermis y dermis. Son inhibidos por antioxidantes y supresores de radicales libres. Al contrario de lo que sucede con los anteriores, este tipo de fotoprotección es de efectividad variable.
- **Bloqueo físico de la RUV:** Se produce en la superficie cutánea y se realiza mediante sombrillas, sombreros y ropas o vestidos gafas de sol, etc., que muestran una efectividad buena o incluso excelente.

Los fotoprotectores se clasifican a su vez en distintos tipos, según el tipo de filtro que contienen y su mecanismo de acción (Montero, 2008):

1. Filtros Químicos:

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

El número de filtros solares disponibles depende de la legislación en cada país. En los Estados Unidos de América, la introducción de un filtro solar requiere la aprobación de la Food and Drug Administration (FDA), como si fuera un medicamento. La reglamentación de la Unión Europea determina la lista de sustancias autorizadas con su concentración máxima. A diferencia de las pantallas físicas, cada filtro químico tiene un espectro de absorción determinado.

Los filtros que absorben predominantemente RUV B son los que se utilizan con mayor frecuencia: PABA, octocrylene, homosalate, 4-methylbenzylidene, camphor, ethylhexyl methoxy-

cinnamate, phenylbenzimidazole sulfonic acid, etc. El espectro de absorción de otros filtros, que actualmente se emplean en combinación con los anteriores y que los están sustituyendo progresivamente en el mercado, incluye tanto los RUV B como los RUV A (con un pico de absorción en este rango): benzophenone-3, butylmethoxydibenzoyl methane, terephthalidene dicamphor sulfonic acid, drometrizole trisiloxane, bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb® S), methylene bis-benzotriazolyl tetramethyl-butylphenol (Tinosorb® M), entre otros. No existen filtros que absorban exclusivamente RUV A de alta energía (Longitud de onda corta) con excitación a un estado de energía superior. Al retornar al estado basal, la energía liberada es de menor magnitud (Longitud de onda más larga) e inocua.

2 Filtros Físicos:

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

Sin embargo, presentan el inconveniente de formar una máscara blanca, especialmente inestética a concentraciones superiores al 5%. Si se disminuye la concentración el aspecto cosmético mejora, pero a costa de una disminución en el coeficiente de protección. Con el fin de optimizar el empleo de pantallas solares, se ha reducido el tamaño de las partículas. La reflexión de la luz visible es menor en las formas micronizadas o ultrafinas, en las que el diámetro de las partículas varía entre 20 y 50 nm, lo que les confiere un aspecto más transparente, mejorando asimismo sus propiedades cosméticas.

En la actualidad, el dióxido de titanio microfino se formula en forma de rutilo recubierto con óxido de aluminio, zirconio o sílice, lo que le confiere menor tendencia a la formación de microagregados, que disminuyen el efecto fotoprotector; por otra parte, puede combinarse con otros filtros físicos o químicos, lo que aumenta tanto el FPS como el espectro de la fotoprotección. (Montero, 2008). Son eficaces tanto para RUV como IR. (Sánchez-Saldaña, 2002).

3. Filtros Biológicos:

Los filtros biológicos son sustancias que penetran más allá de la superficie y refuerzan a las células para que se defiendan mejor de la radiación. Tienen actividad antioxidante y aplicadas tópicamente, disminuyen el estrés oxidativo inducido por la ra-

diación ultravioleta. Potencian, por lo tanto, la protección conferida por los filtros solares convencionales, y disminuyen el consiguiente daño celular que podría ser origen de fotoenvejecimiento y cáncer de piel.

Entre estos filtros biológicos se encuentran sustancias que, como diversas vitaminas, presentan actividad antioxidante directa. Sin embargo, también existen otras sustancias que ejercen esta actividad antioxidante a través de su capacidad quelante del hierro (diferentes flavonoides) y sustancias que aumentan la actividad de las enzimas antioxidantes de la piel (algunos oligoelementos). Estos filtros han demostrado su eficacia frente a los efectos de los rayos ultravioleta, pues son antioxidantes que evitan la formación de radicales libres y, por lo tanto, potencian el subsistema inmunológico cutáneo. Se están utilizando cada vez con más profusión, siendo las vitaminas A y E las más utilizadas en forma de palmitato o acetato, así como la vitamina C en sus diferentes variedades.

Administrados sistémicamente, los filtros biológicos tienen la ventaja de proporcionar una protección basal beneficiosa y permanente, que actúa independientemente del uso de fotoprotección tópica. Afectan a la piel por completo y constituyen una reserva antioxidante que protege a medida que la fotoexposición va agotando los antioxidantes naturales de la piel. Además, evitan los problemas inherentes a la fotoprotección tópica, como

la aplicación insuficiente de producto, poco respeto a los tiempos de reaplicación o la influencia del roce, agua o sudor. Pero debe tenerse en cuenta que en ningún caso sustituyen a los fotoprotectores tópicos, sino que los complementan. Por ejemplo, si se toman betacarotenos, no se puede dejar de usar fotoprotectores tópicos.

4. Filtros Organominerales:

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

De la combinación de estos tipos de filtros se pueden obtener un fotoprotector, cuya capacidad protectora viene determinada por el **Factor de Protección (FPS)**. El FPS es un índice que nos da idea del tiempo que podremos permanecer expuestos al Sol sin riesgo de quemadura.

Cuanto mayor sea el FPS, más alta será la protección frente al Sol. Por ejemplo y dependiendo de su tipo de piel, si un individuo es capaz de permanecer el primer día de exposición 20 minutos

bajo el sol sin quemarse, de modo que la elección de un fotoprotector con factor 8 le proporcionaría una protección 8 veces superior.

La actual definición del factor de protección solar, en la que están basados la totalidad de los métodos de evaluación hoy conocidos, se fundamenta en los trabajos de Schulze. En 1956, él definió el FPS como la ratio entre la mínima dosis eritematogena (MED) de la piel protegida con el producto y sin él, a las 24 horas de la irradiación.

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

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

A la hora de elegir el fotoprotector más adecuado se debe tener en cuenta varios factores:

-
- ✓ **Individuales:** Fototipo cutáneo (Fitzpatrick), edad, situaciones especiales (embarazo, patologías, tratamientos farmacológicos, antecedentes familiares con melanoma).
 - ✓ **Medioambientales:** horario, latitud, climatología, altitud, reflexión.
 - ✓ **Dependientes del producto:** formulación galénica.

a.- Factores Individuales

Entre los factores individuales, el más importante es el *Fototipo*, en función del cual se determina el FPS solar (Fitzpatrick, 1975). Además del fototipo cutáneo se debe considerar:

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

- **Individuos con antecedentes familiares de *melanoma*.**

b.- Factores medioambientales

- **Horario:** la radiación es más intensa entre las 12-15h.
- **Latitud:** en el Ecuador los rayos inciden sobre la Tierra de forma perpendicular, luego la radiación será más intensa, disminuirá a medida que nos acercamos a los polos.
- **Altitud:** a mayor altitud mayor intensidad de radiación.
- **Estación del año:** en verano estamos más cerca del sol que en invierno, por tanto la radiación será mayor.
- **Clima:** las nubes dejan pasar el 90% de la RUV pero no IR. Por tanto, aunque desaparece el efecto calórico, se deben seguir las normas básicas de la fotoprotección aun en días nublados.
- **Reflexión:** el agua, la nieve y la arena reflejan la radiación solar, por lo que en estas condiciones, además de la radiación que llega de forma directa del sol habrá que sumar la reflejada.

c.- Factores dependientes del producto

Además de los factores dependientes del producto y de la forma galénica que se recomendarán según el tipo de piel (crema, loción, gel, gel-crema, stick, spray, Dry-oil, espuma, compacto), influirán otros aspectos como su inocuidad, estabilidad, resistencia

y acción prolongada (Water-resistant, Waterproof y Sweatproof). Pero sobre todo, lo más importante es elegir aquel fotoprotector que asegure una buena absorción de las radiaciones nocivas a las que se vaya a exponer. El sol tiene un efecto acumulativo y la piel tiene memoria y no olvida los daños que ha sufrido.

Respecto a la **formulación**, existen en el mercado distintos tipos según su forma farmacéutica o galénica:

Emulsiones:

Las emulsiones son las fórmulas cosméticas más adecuadas para los productos antienvjecimiento. Dado que la piel senil es casi siempre alipídica, puede ser adecuado realizar fórmulas que posean la fase externa grasa, pero para evitar su pegajosidad, se ha seleccionado como fórmula base una emulsión de fase externa silicona, cuya elaboración puede realizarse en frío y que puede contener o no glicerina.

Geles:

Los geles han perdido algo de aceptación, aunque su posible formulación en frío facilita la estabilidad de la fórmula. Se ha seleccionado como fórmula base un gel realizado con un polímero acrílico, que incorpora un tensioactivo y un hidrocarburo para ofrecer el aspecto de una emulsión. Para seleccionar los ingredientes se puede recurrir a un lipoaminoácido adecuado para se-

cuestrar radicales libres, e impedir la peroxidación de los lípidos cutáneos y la oxidación de las proteínas cutáneas, filtro solar y liposomas.

SUSTANCIAS CON PROPIEDADES ANTIENVEJECIMIENTO

A lo largo de la historia, se ha intentado conseguir sustancias que ayudaran a retrasar o incluso a mejorar los problemas estéticos que se manifiestan durante el proceso del envejecimiento. Actualmente, los principales activos empleados en las fórmulas antienvjecimiento son los siguientes:

Quelantes de iones ferrosos. Regeneradores y reparadores.

Enzimas y antienzimas. Protectores inmunológicos. Activos antiglicosilación. Aceites esenciales. Hidratantes y fotoprotectores y fundamentalmente los **agentes antioxidantes** y **secuestradores de radicales libres**.

Está aceptado universalmente que la formación de radicales libres es uno de los procesos que intervienen en el envejecimiento cutáneo. Los radicales libres son moléculas altamente reactivas con un número impar de electrones en su orbital externo. Pueden dañar diversas estructuras celulares, tales como ADN, proteínas y membranas celulares y originar inflamación, lo que parece desempeñar un papel adicional en el envejecimiento de la piel.

El organismo posee mecanismos endógenos de defensa, tales como enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa) y moléculas antioxidantes no enzimáticas (vitamina E, vitamina C, glutatión, ubiquinona), que lo protege de los radicales libres mediante la reducción y neutralización de los mismos. Un antioxidante es definido como una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Algunos de estos mecanismos de defensa antioxidante pueden ser inhibidos por la luz ultravioleta (UV).

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

El uso de antioxidantes puede ser particularmente bueno para mejorar los signos del envejecimiento producido por UV-A, el cual se cree que está inducido en gran parte por los procesos oxidativos. Se ha demostrado que la aplicación tópica de antioxidantes aumenta la dosis mínima de RUV A requerida para provocar aumento de la pigmentación y disminuye la seriedad de las

fotodermatitis inducidas por RUV A (Inja, 2009)

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

Actualmente, la formulación se ha basado en la utilización del bloqueador del primer radical de oxígeno superóxido dismutasa (SOD), que se forma en el tejido cutáneo y actúa sobre el radical superóxido, convirtiéndolo en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Puede encontrarse en forma pura (se incorpora entre el 0,1 y 0,5% en las fórmulas cosméticas) y en forma SOD encapsulado en liposomas (se utiliza entre el 5 y el 10%).

También se utiliza una coenzima de la cadena respiratoria, la ubiquinona coenzima Q10, cuya aplicación tópica produce un potente efecto antieritematígeno capaz de reducir la formación de radicales libres. Para ciertos formuladores parece ser mucho más interesante la incorporación a las fórmulas cosméticas de ingredientes que posean una actividad antielastasa y antihialuronidasa (en el caso de este último, se utiliza el extracto de vid y el

extracto de mimosa tenuiflora a dosis comprendidas entre 3 y 5%). Trabajos relativamente recientes consideran la posibilidad de utilizar, por vía tópica, endonucleasas mediante liposomas cargados con esta enzima, cuya función es reparar los daños que la radiación solar provoca en el ADN de las células cutáneas irradiadas.

Para que los antioxidantes administrados tópicamente sean eficaces en la prevención de envejecimiento cutáneo existen dos consideraciones que deben tenerse en cuenta en su formulación:

- La estabilización, pues son muy inestables, pueden oxidarse e inactivarse antes de alcanzar el blanco de acción.
- Deben ser adecuadamente absorbidos, llegar en forma activa a su tejido diana y permanecer allí el tiempo suficiente para ejercer los efectos deseados.

Es importante tener en cuenta también los productos con propiedades antioxidantes que pueden ser utilizadas como ingredientes cosméticos antienvjecimiento. El grupo más importante corresponde al formado por los antioxidantes fenólicos, como son el x-tocoferol o vitamina E y sus derivados, como acetato de tocoferol, nicotinato de tocoferol, acetyl salicilato de tocoferol, dioleil tocoferil metil silanol, tocoferil ascorbil fosfato, liposomas cargados con x-tocoferol y ácido úrico.

La vitamina A y sus derivados son esenciales para el desarrollo, crecimiento y mantenimiento del tejido epitelial. Ayudan a

mantener las condiciones normales de la piel y tienden a normalizar la sequedad cutánea. Otros compuestos importantes en las formulaciones antienvjecimiento son los quelantes, como el ácido etilendiamino tetra acético (EDTA), que secuestran los iones de hierro y cobre y, por tanto, bloquean la reacción oxidativa.

Muchos antioxidantes han sido utilizado durante siglos en las culturas antiguas y modernas de todo el mundo para diversas enfermedades. Además de su actividad antioxidante, la mayoría de ellos poseen numerosas propiedades biológicas. Entr los mas utilizados en formulaciones cosméticas: **Vitaminas A, E, C; Coenzima Q10; ldebenona; licopeno; té verde; silimarina; coffee-Berry®; resveratrol; semillas de uva; granada; genisteína; pycnogenol ; niacinamida** (Inja, 2009).

Los **carotenoides** se encuentran entre los pigmentos naturales más comunes, de los que se han caracterizado de 600 compuestos diferentes. Son responsables de muchos de los colores rojo, amarillo y naranja de las hojas, flores y frutas, así como del color de algunos insectos, aves, peces y crustáceos.

Solamente pueden ser sintetizados por plantas, hongos, bacterias y algas, sin embargo muchos animales los incorporan a través de la dieta. Dos carotenoides dietarios importantes son el licopeno y el β -caroteno que están involucrados en la eliminación de dos especies reactivas del oxígeno, el oxígeno singlete y el ra-

Como muchos carotenoides, es un pigmento liposoluble coloreado (que como tal se puede incorporar a las membranas celulares, sin sufrir decoloración). Se clasifica como una xantófila,¹ (etimológicamente xantina, significa “hoja amarilla” y el prefijo “asta” procede del griego *Αστακός* que significa cangrejo).

Es producido por diversos tipos de **microalgas** (*Haematococcus pluviales*; *Chlorella zofingiensis*, *Chlorococcum*, y *Phaffia rhodozyma*) que son la base de la alimentación del zooplancton y el krill, (se pueden encontrar en levaduras) y también en los organismos que se alimentan de ellos, por lo que se puede ir acumulando en cierta medida a lo largo de la cadena alimentaria, en especial en los pescados de carne rosada como el salmon, trucha, crustáceos, (*Pandanus borealis*, Krill), camarones, cangrejos; en algunos vegetales como el arándano rojo (cranberry) y en las plumas de algunas aves, a los que presta su coloración rojiza (Yang,2013).

La astaxantina, a diferencia de otros carotenoides, no se convierte en vitamina A (retinol) en el cuerpo humano lo que ayuda a que sea posible su acumulación. Es un potente antioxidante:10 veces más que otros carotenoides en relación con la captación de radicales libres y ha demostrado efectos favorables en relación con el metabolismo tanto en modelos “in vitro” como “in vivo” (Park, 2013; Yamashita, 2013) así como efectos beneficiosos en relación con distintos procesos patológicos tales como:pro-

cesos inflamatorios (Park,2010; Santos, 2012; Chew, 2013), alteraciones de tipo degenerativo-metabólico (diabetes: Ryu, 2012) cardiovasculares (Nakao,2010; Fassett, 2011; Monroy-Ruiz, 2011; neurodegenerativos (Wibrand, 2013), anticancerosos (Prabhu, 2009; Gal, 2012; Maoka, 2012; Ranga-Rao, 2013) o también potenciando la inmunidad (Park,2011), etc.

Entre las funciones de la **Astaxantina** destacan la de proteger las membranas celulares y mitocondriales de las agresiones medioambientales, en especial de las radiaciones. Estas agresiones facilitan la posibilidad de errores en la replicación del ADN y con ello la formación de tumores malignos (Ranga Rao, 2014).

La FDA norteamericana así como la EFSA europea aprobaron su uso como colorante para la comidas animales y de peces (Roche,1987; EFSA, 2005; 2007).

MODELOS EXPERIMENTALES DE FOTOENVEJECIMIENTO

La exposición crónica a las radiaciones solares, es aceptado universalmente, que provoca el envejecimiento patológico de la piel (fotoenvejecimiento) y constituye uno de los principales factores etiológicos implicados en el desarrollo del cáncer cutáneo. Existen numerosas evidencias epidemiológicas y clínicas que relacionan a las radiaciones ultravioleta solares con el fotoenvejeci-

miento cutáneo o dermatoheliosis como ha sido denominado también por Oppel, 2004. Estas, a su paso a través de los tejidos, pueden originar estrés oxidativo, responsable de las alteraciones tisulares que tendrán lugar tanto en la epidermis como en la dermis, así como de la inmunosupresión (Wlaschek, 2001; Nishigori, 2004).

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

No obstante, tanto por motivos metodológicos como por motivos éticos, es imposible demostrar que la radiación UV, es capaz de ocasionar cáncer cutáneo en el ser humano, sin embargo, existen suficientes datos epidemiológicos, clínicos, y resultados obtenidos de los numerosos modelos experimentales desarrollados en animales para poder afirmar que la RUV es la causa más importante del cáncer cutáneo (Borrego, 2008).

Por otra parte y debido a la gran similitud de las lesiones desarrolladas por los animales, con las que tienen lugar en la piel humana tras la exposición crónica a las radiaciones ultravioleta, consideramos que estos modelos experimentales son idóneos para el estudio del fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis,

así como para el ensayo de sustancias antioxidantes y fotoprotectoras (Cano, 2010).

En la bibliografíaa son numerosas las especies animales que se han utilizado como modelos para este tipo de estudios, que van desde los minipigs (*Kligman, 1982*), cobayas (*Kreuzmann, 1990*), ratas, (*Nakamura, 1968*), ratones (*Sams, 1964*), e incluso peces (xiphophorus, medaka y pez cebra) (*Kurita, 2004*). No obstante, los animales más utilizados corresponden a roedores, tanto con pelo como sin él y fundamentalmente a los ratones (*Becker, 2010*): C57BL/6J; BALB/C; CBA, (*Benavides, 2009*), Swiss, Hairless: HR-1, SKH1, etc. (*Sharma, 2011*).

Sin embargo, la utilización de animales con pelo presenta algunas desventajas que explican su escasa utilización en la actualidad, además del inconveniente y el trauma que supone el afeitado o depilación repetitivos, los animales con pelo requieren dosis de RUV superiores a las experimentadas por los seres humanos.

En 1960, Winkleman y colaboradores describieron unos ratones sin pelo que, como los humanos, desarrollaban carcinomas de células escamosas como resultado de la exposición a la RUV crónica. A partir de entonces, el ratón sin pelo se convirtió en el animal de elección para los estudios de carcinogénesis con RUV.

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

Otro modelo correspondió al ratón sin pelo ligeramente pigmentado (Oslo / BOM cepa endogámica) que fue utilizado por Poulsen, 1984 para estudiar la elastosis con diferentes combinaciones de UV-B (Westinghouse FS tubos) y UV-A (negro tubos de luz: Pico 365 nm, y sin filtro). De modo que no se originaba elastosis significativa cuando se aplicaba exclusivamente RUV-A durante 3 ó 6 meses, mientras que cuando se aplicaba solo la RUV-B, se desarrollaba una elastosis moderada después de 3 meses. Por otra parte, la exposición secuencial a la radiación RUV-B y una gran dosis de RUV-A produjo una elastosis severa y una dosis moderada de RUV-A, administrada simultáneamente con RUV-B produjo una ligera reducción del grado de elastosis frente a los RUV-B individualizada.

Con el objeto de reproducir experimentalmente los efectos de las radiaciones ultravioleta y ensayar tratamientos preventi-

vos frente a las mismas, en los últimos años han seguido siendo desarrollados varios modelos animales.

En la actualidad, los ratones sin pelo más utilizados en modelos de fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis son los Skh-1 (albino) y Skh-2 (ligeramente pigmentada) (Kambayashi, 2001; Mitani, 2004; Reeve, 2005; Gómez, 2010).. Estos modelos sufrían lesiones cutáneas similares a las humanas de fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis (Kambayashi, 2001; Mitani, 2004; Reeve, 2005).

En el modelo experimental establecido por nuestro grupo de investigación, Cano (2010) se puede considerar como idóneo para el estudio de estas patologías así como para el ensayo de sustancias antioxidantes y fotoprotectoras.

Por lo que para la realización de este trabajo elegimos como modelo animal el ratón sin pelo SKH1/CRL, procedentes del Skin and Cancer Hospital, Temple University. Philadelphia, 1986 (Charles River Laboratories. New York, USA) que fueron aclimatados y criados en el Servicio de Animales de Laboratorio (SAI) de la Universidad de Murcia, porque consideramos que suponen un modelo animal de elección, por ser albinos y sin pelo, con menor protección frente a las RUV; además de ser eutímicos y por lo tanto, inmunocompetentes y sobre todo, un modelo animal de fácil manejo y bajo coste.



1. Desarrollar un modelo experimental de fotoenvejecimiento cutáneo en ratones SKH-1/CRL mediante la exposición crónica a Radiación Ultravioleta.
2. Determinar los efectos de la Astaxantina sobre el citado modelo de fotoenvejecimiento.
3. Estudiar el comportamiento biopatológico y la capacidad de invasión de los tumores desarrollados, mediante técnicas inmunohistoquímicas (marcador de proliferación celular PCNA, metaloproteinasa-9 (MMPs-9) e inhibidores de metaloproteinasas, TIMP-1).

NW

MATERIAL Y MÉTODOS

I MATERIAL

1. Animales

Hemos utilizado 60 ratones SKH1/CRL, hembras de 33 días de edad y un peso medio de 20g, al principio del experimento. Son animales eutímicos e inmunocompetentes. Procedían del Servicio de Animales de Laboratorio (SAI, nº REGAES 300305440012) de la Universidad de Murcia.

Todos los animales han sido mantenidos en jaulas de 40x30 cm en una habitación con foto-periodo-luz-oscuridad 12-12 horas, y una temperatura media de 22°C con aporte de comida y bebida "ad libitum". Han sido tratados según las normas de la Unión Europea sobre la protección de animales utilizados en experimentación (Real Decreto 1201/2005 de 10 de Octubre). Asimismo, el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia ha aprobado todos los experimentos.



Figura 4.- Ratón SKH1 / CRL.

Los ratones se distribuyeron en dos grupos:

- Grupo I: Control (n=30): expuestos a radiación ultravioleta UV (RUV).
- Grupo II (n=30): RUV + astaxantina

2. Lámpara

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

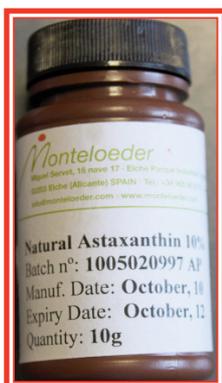


Figura 5.- Lámpara Philips Type HB 554/01/A.

3. Astaxantina

Astaxantina natural al 10%. Batch nº 1005020997AP.

Laboratorio Monteloeder.Alicante.España



4.Gelatina

Gelatina (240/260 Bloom 18 Mesh tipo A)

Juncá.Bañoles.Girona.España



II MÉTODOS

1. Procedimiento experimental

Los animales se dispusieron en jaulas de metacrilato transparente de 40 x 30 cm, con cubierta metálica de rejas y con espacio para alimento y agua.

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

La energía absorbida por sesión fue de 21,1 J/cm², por lo que al final de las 80 sesiones, la energía total absorbida por cada animal fue de 1688 J/cm².

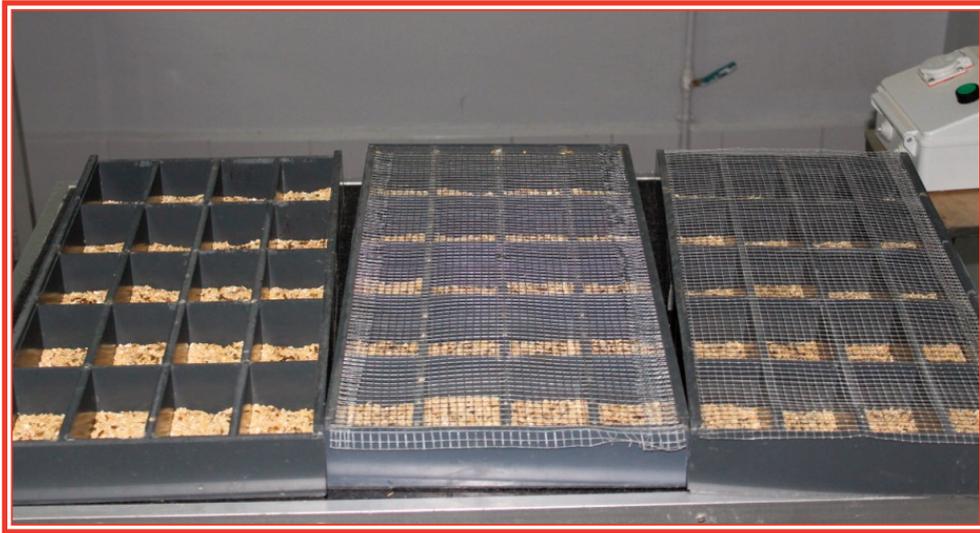


Figura 6.- Jaulas para los animales/sesiones.

La astaxantina se administró por vía oral mediante su adición a la gelatina de origen porcino Juncá a la dosis de 0,05mg/animal/día.

Los animales fueron revisados diariamente y a las 25, 50, 60 y 80 sesiones, realizándose fotografías de la piel del dorso expuesta a las radiaciones en cada uno de estos tiempos.

Una vez acabado el experimento (80 sesiones) como la mayoría de los animales no presentaban lesiones tumorales apreciables, 20 ratones fueron sacrificados por el método habitual del SAL y a los 10 restantes se le administró un total de 113 sesiones, realizándose fotografías cutáneas a la 100 y 113 sesiones. La energía total recibida por animal fue de 2.384,3 J/cm²., procediéndose a continuación a su sacrificio.

B. Método anatomopatológico

Tras el proceso experimental, se procedió a la eutanasia de todos los animales del estudio mediante exanguinación total por punción cardiaca, previamente anestesiados con isoflurano. A continuación se les realizó la necropsia, extirpándoseles la piel del lomo, así como las vísceras: pulmones, riñones e hígado. Las muestras recogidas fueron fijadas en formal neutro tamponado al 10%, al menos durante 48 horas, incluidas en parafina:

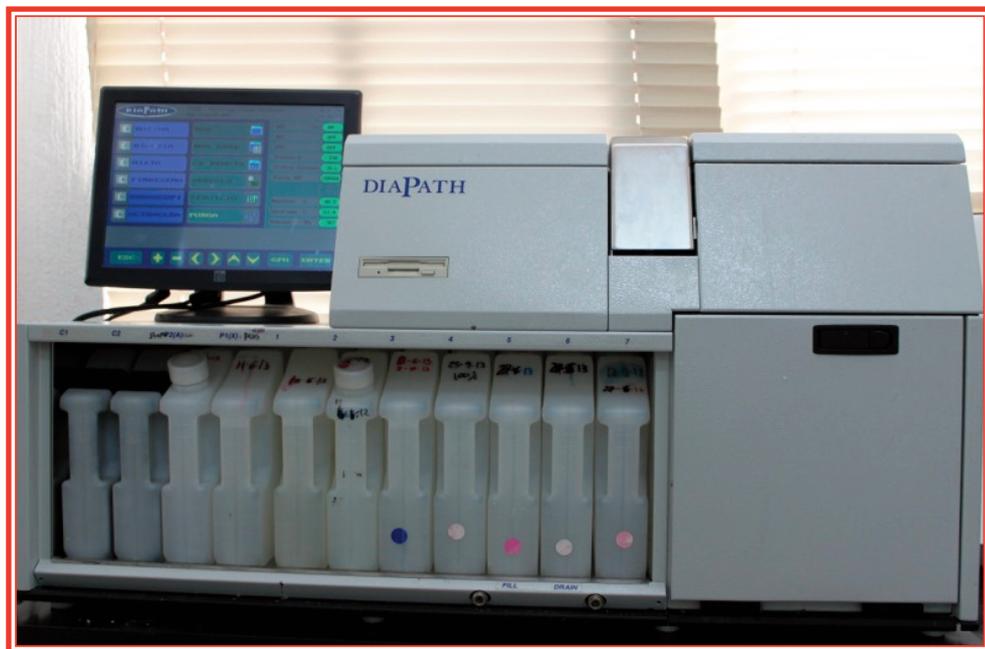


Figura 6.- Incluidor automático DiaPath.

De los bloques de parafina se realizaron secciones histológicas de 3 μ que fueron teñidas con Hematoxilina-eosina (H&E) y la técnica de Van Giemson-Ver Hoeff (que tiñe específicamente las fibras colágenas y elásticas de la dermis, respectivamente).

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



Figura 8.- Microtomo Thermo HM 3555.



Figura 9.- Microscopio Leica DM 4000B.

ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

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

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

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

(Sigma-Aldrich) durante 3,5 minutos y las muestras se contrastaron con Hematoxilina de Mayers.

El estudio semicuantitativo de la expresión de los diferentes anticuerpos se realizó mediante la visualización de las preparaciones histológicas con el equipo Leica SCN400F, por dos observadores experimentados, blindados a los resultados del estudio. Se determinó la intensidad del marcaje de cada anticuerpo en el estroma, vasos, glándulas sebáceas y epitelio, otorgando la puntuación 0 cuando no existía marcaje, 1 cuando la intensidad de éste era leve, 2 cuando era moderado y 3 cuando era severo.

Evaluación e interpretación de los resultados

En todos los animales, se ha evaluado el grado de lesión, para posteriormente, semicuantificar la cantidad de la inmunotinción dependiendo de la lesión observada. La semicuantificación se ha hecho a ciegas por triplicado utilizando un microscopio óptico Axioscope (Zeiss) acoplado a una cámara AxioCam MRc5 (Zeiss), haciendo una evaluación subjetiva utilizando una escala de 0 (ausencia) a 4 (máxima intensidad observada).



Figura 10.- Microscopio óptico Axioscope (Zeiss) /
Cámara Axiocamp MRc5 (Zeiss).

Análisis de imagen

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

El número de lesiones que presentaba cada animal.

El tamaño medio de la lesión.

Semana de aparición de la primera lesión.

Para la cuantificación de la primera y segunda de las variables, con el objetivo de medir el área de la piel del lomo ocupada por lesiones macroscópicas (sin hacer distinción de su morfología), tras la última sesión de radiación UV, realizamos fotografías

digitales en color a todos los animales (cámara Canon EOS 500D), colocándolos junto a un papel milimetrado. Utilizamos una aplicación del programa de análisis de imagen Leica Qwin, dibujando una máscara binaria de las áreas de lesión, que posteriormente se midieron individualmente.

Para la tercera utilizamos las anotaciones que se habían realizado con periodicidad semanal, a la vez que eran pesados los animales, determinando la presencia o ausencia de lesión, cuando se observaba macroscópicamente abultamiento en la piel del ratón; a continuación se fotografiaba con cámara Canon EOS 500D y con el software mencionado anteriormente se realizaba la medición. Establecimos el criterio para la determinación de la presencia de lesión, el que ésta tuviera las siguientes medidas: área mayor o igual a 1 mm^2 y perímetro mayor o igual 3,5 mm.

C. Método Estadístico

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

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

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

V

RESULTADOS

RATONES SANOS

Clínicamente el pelo en estos ratones se desarrolla de modo normal. A partir de la segunda semana de vida se origina una pérdida del pelo rápida y completa, que comienza afectando a los párpados, para seguir desprendiéndose de forma progresiva en sentido caudal, de modo que a las tres semanas de vida, los animales se quedan sin pelo, exceptuando la persistencia de algunas vibrisas.

La piel de los ratones SKH1 es rugosa, rugosidad que va aumentando con la edad. Las uñas son largas y retorcidas. La epidermis es similar en espesor en los dos sexos, pero la dermis es más gruesa y la hipodermis más delgada en los machos.

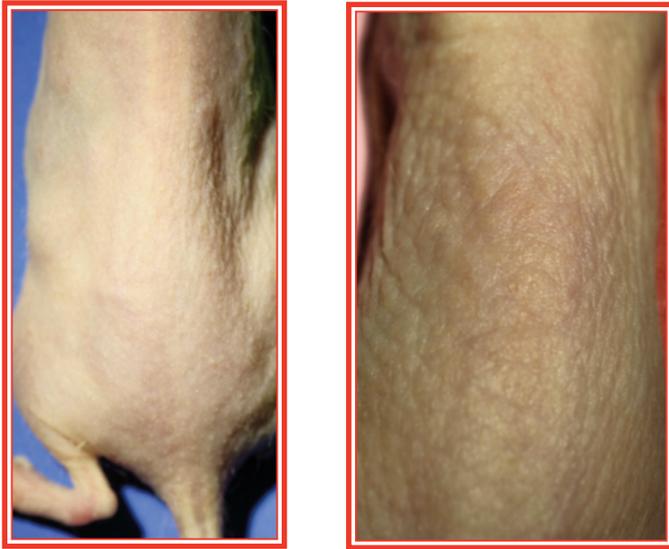


Figura 11.- Detalle de la piel de ratones sanos.

Microscópicamente la epidermis está constituida por entre 3 a 5 capas de queratinocitos poligonales, que se van aplanando en las capas más superficiales; éstas se encuentran tapizadas por un estrato córneo delgado (2-3 capas de corneocitos). En la dermis destaca la presencia de numerosos folículos pilosos dilatados y quistificados.

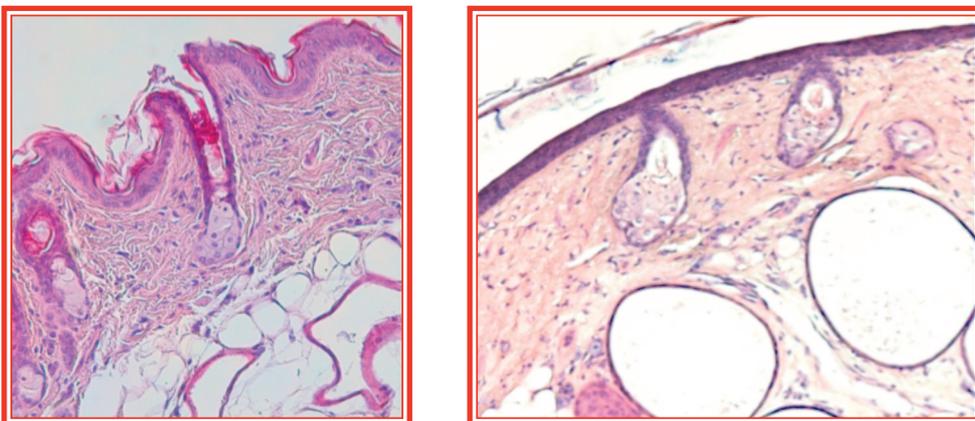


Figura 12.- Detalles microscópicos de piel sana. (H&E 125x.)

GRUPO I (CONTROL)

Clínicamente los primeros cambios observados en todos los animales expuestos exclusivamente a las Radiaciones Ultravioleta (RUV) correspondían a la presentación de **eritema cutáneo**, que predominaba en la zona del dorso: lomo, cabeza y orejas. Se presentaba desde la primera sesión y era pasajero durante las tres o cuatro primeras semanas, ya que desaparecía entre treinta y sesenta minutos después de acabar la exposición a las radiaciones.



Figura 13.- Eritema.

Macroscopicamente se presentaba como zonas, más o menos extensas de enrojecimiento, que afectaban en principio al lomo y a la porción posterior de la cabeza y del cuello; en el transcurso del experimento (sobre todo a partir de la quinta-sexta semana) se hacía de distribución difusa, además de mantenerse entre las sesiones, adquiriendo carácter permanente. Con frecuencia adoptaba un aspecto reticulado y la coloración variaba de rojo a violácea. En las últimas etapas del experimento mostraba aspecto **telangiectásico**.

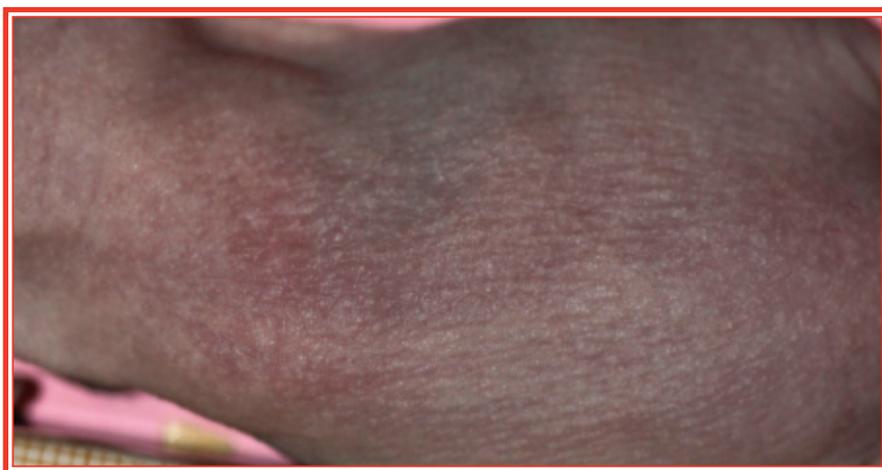


Figura 14.- Eritema difuso dorsal, rojo-violáceo.

Microscópicamente correspondía a la dilatación de los vasos del plexo capilar de la dermis papilar durante las primeras semanas del experimento; a partir de la seis u ocho semanas se acompañaba además de vasodilatación y tortuosidad del plexo subpapilar.

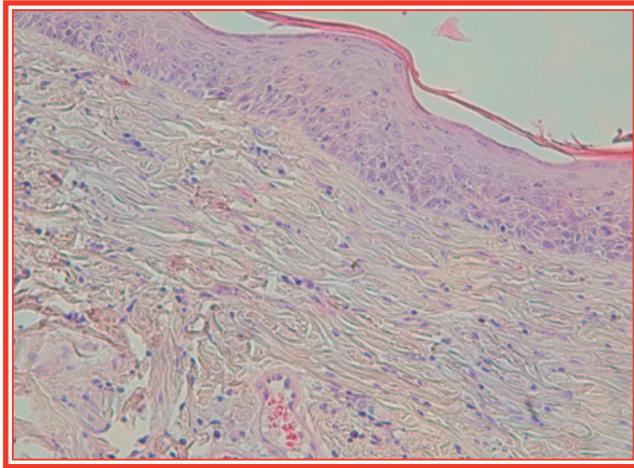


Figura 15.- Dermis papilar con congestión vascular. (H&E. 212,5x.)

A partir de las sesiones 30 a 32 era muy destacable el marcado **patrón geométrico de la piel**, que en el transcurso del experimento aumentaba de modo progresivo.

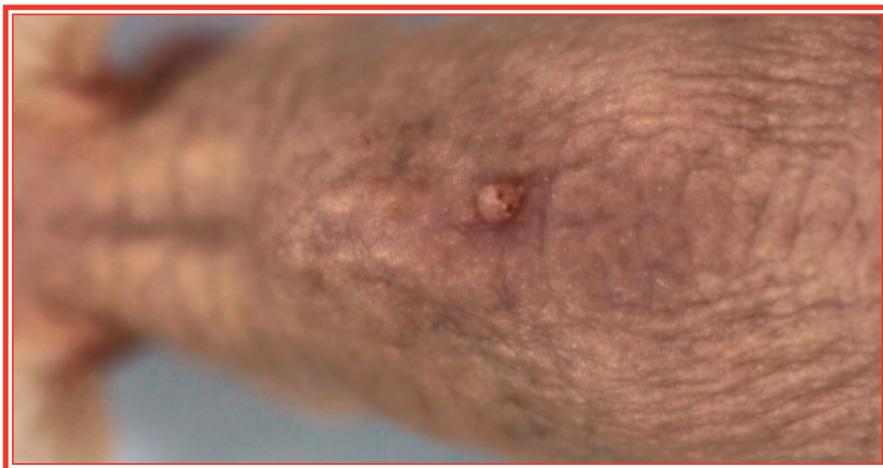


Figura 16.- Marcado patrón geométrico cutáneo

A continuación, a partir de 32-35 sesiones predominaban las **arrugas** cutáneas, que se localizaban preferentemente a lo largo del dorso de los animales y adoptaban un patrón longitudinal; conforme aumentaba el número de exposiciones, se hacían más irregulares y se acompañaban de áreas de engrosamiento irregular. Mientras que en las zonas con lesiones tumorales nodulares, así como en las lesiones ulceradas se disponían de forma radial alrededor de las mismas.

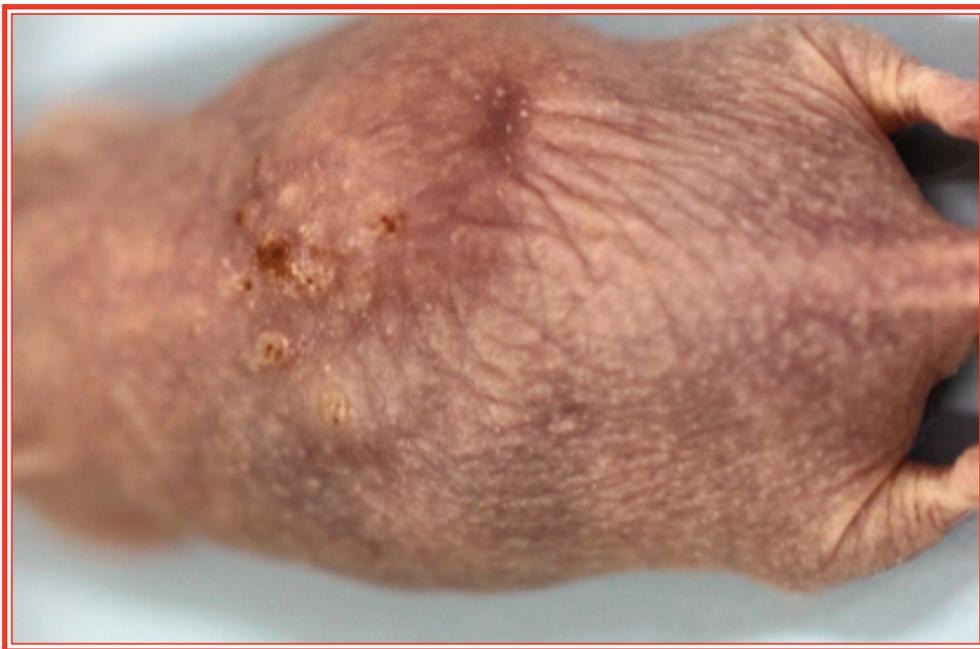


Figura 17.- Arrugas cutáneas.

Microscópicamente, en la dermis destacaba el engrosamiento de la papilar, debido al aumento y la disposición tortuosa de los capilares sanguíneos así como de la red capilar subpapilar y el de la reticular, en la que destacaban los fenómenos de desorganización de la estructura general y de la disposición del entramado de las fibras colágenas y elásticas que iba haciéndose mas patente.

Respecto al entramado fibrilar, se podían distinguir tres patrones o grados de disposición:

Uno en el que predominan las fibras mal organizadas, dispuestas preferentemente de forma individualizada, también considerado como elastosis solar grado I;

Otro en el que las fibras con estas características alternaban con zonas en que se disponían en acúmulos irregulares y compactos de elastina, ligeramente basófilos o grado II;

Y otro, caracterizado por predominio marcado de los acúmulos compactos de elastina o grado III.

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

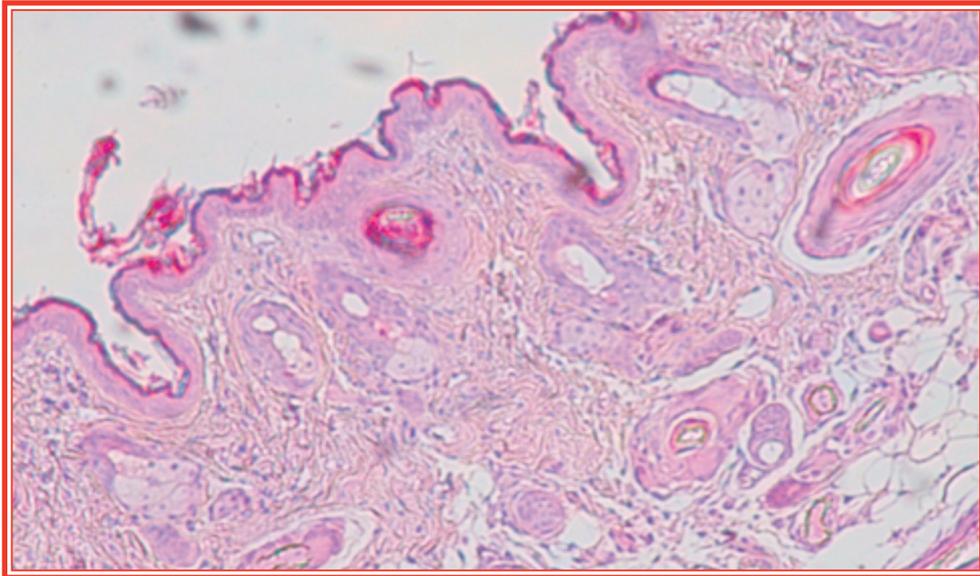


Figura 18.- Engrosamiento fibroso de la dermis papilar y reticular. (H&E 212,5x.)

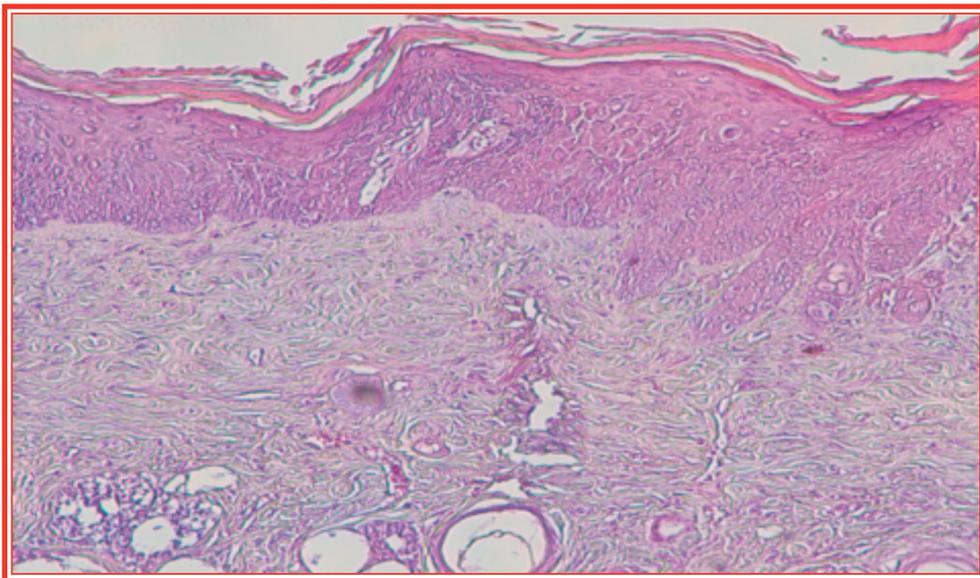


Figura 19.- Detalle de la elastosis. (H&E 300 x.)

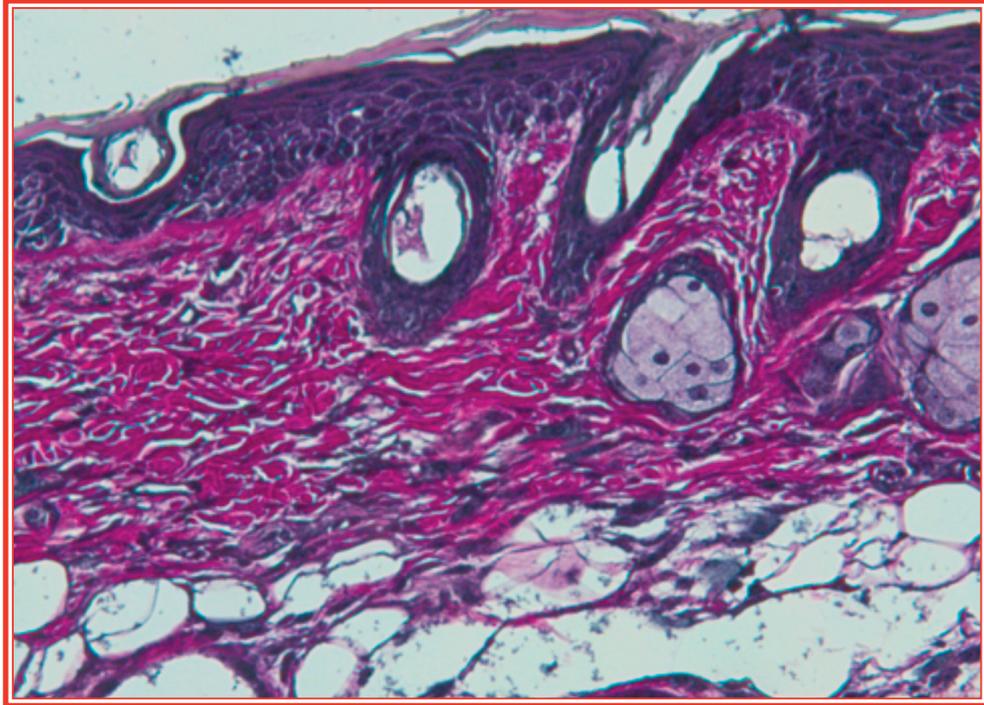


Figura 20.- Elastosis dérmica grado I. T. Verhoeff-Van Gienson. (H&E 420 x)

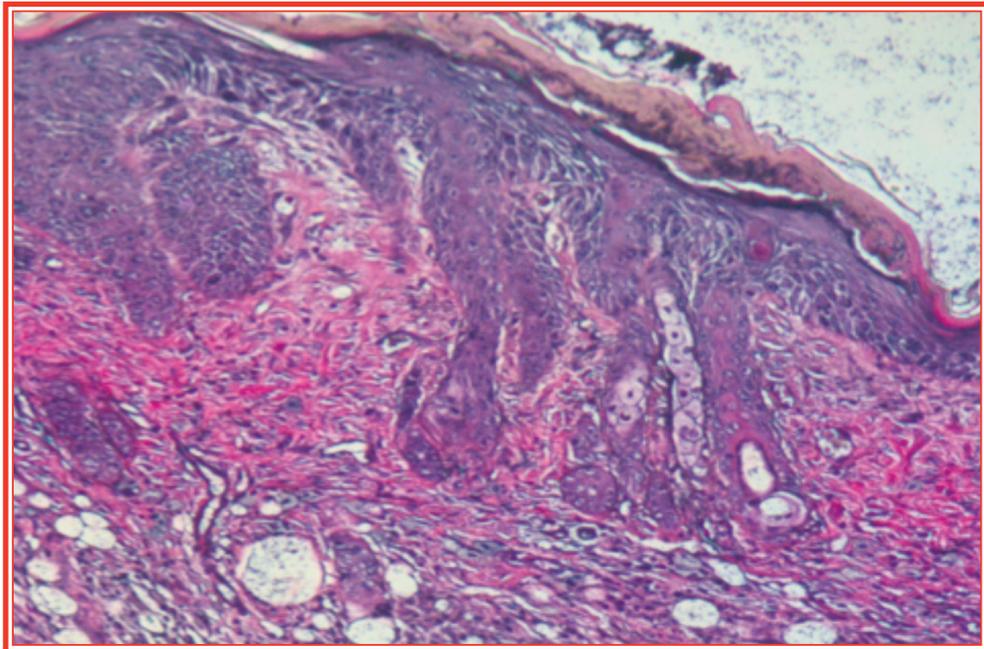


Figura 22.- Elastosis dérmica grado II. T. Verhoeff-Van Gienson. (H&E 400x)

A partir de la segunda mitad del experimento, hacia la sesión cuarenta, destacaba en toda la superficie cutánea dorsal el **engrosamiento irregular** de aspecto granular difuso, que se acompañaba con frecuencia de superficie escamosa con marcado patrón geométrico de la piel. Sobre ella se observaban múltiples lesiones de aspecto queratósico, que frecuentemente se mostraban firmes al tacto.

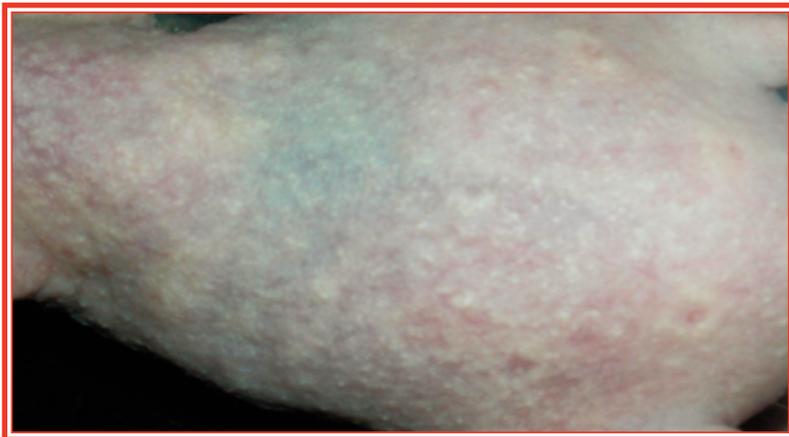


Figura 23.- Engrosamiento cutáneo irregular.

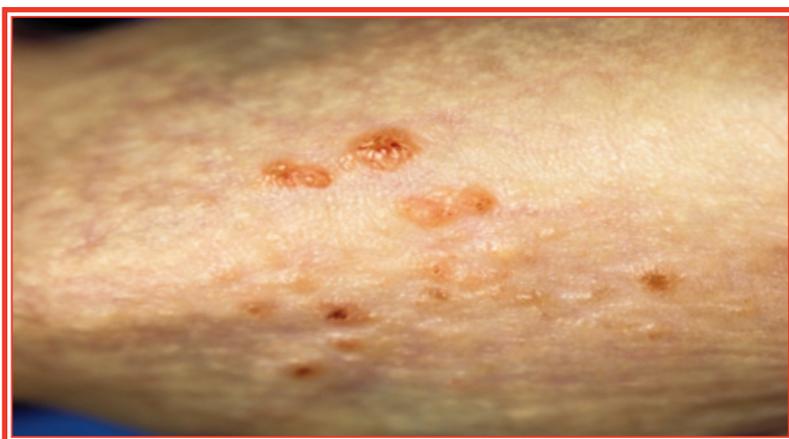


Figura 24.- lesiones eritemato-queratósicas.

A partir de la **sesión 45-50**, predominaban las lesiones de aspecto **eritemato-escamoso**, que estaban caracterizadas por lesiones escamosas situadas sobre las zonas de eritema. Mostraban aspecto puntiforme al principio; después progresivamente se iban haciendo más extensas e incluso confluían en placas irregulares.



■ *Figura 25.-* Lesiones eritemato-escamosas y erosivas.

En otras áreas, las lesiones eran frecuentemente **erosivas** y estaban recubiertas por costras fibrino-necróticas; se solían disponer en grandes placas de límites irregulares. Las de mayor volumen se cubrían de costras hemorrágicas y mostraban los

bordes sobreelevados, en esta fase, generalmente estaban fijadas a los planos profundos.



Figura 26.- Lesiones erosivas con costras fibrino-necróticas.



Figura 27.- Placas erosivas.



Figura 28.- Lesiones queratósicas y nodulares erosivas.

Microscópicamente, las lesiones descritas correspondían a diversos tipos de alteraciones morfológicas, pues alternaban las áreas de **atrofia epidérmica**, de distinto grado, caracterizadas por la disminución del espesor de la epidermis debida al menor número de capas celulares y al aplanamiento de los queratinocitos con otras de engrosamiento epitelial.

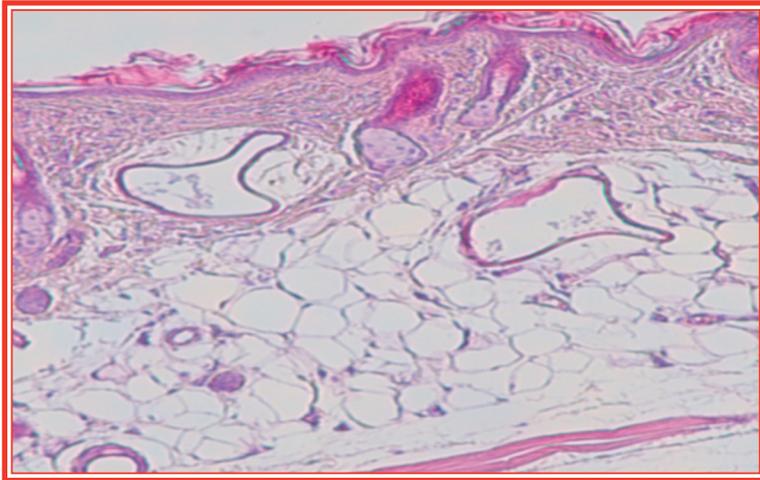


Figura 29.- Área de atrofia epidérmica. (H&E 125x.)

En otras zonas sin embargo, dichas áreas alternaban con otras en las que predominaban el engrosamiento epitelial, con fenómenos de **hiperplasia de células basales**. No obstante, estas se observaban más frecuentemente en relación con las zonas cutáneas que mostraban distintas alteraciones como displasia, carcinoma, etc., aunque a veces se disponían también como focos aislados.

Estaban constituidas por varias hileras (entre 3 y 10) de queratinocitos basales de morfología poligonal. Los citoplasmas eran escasos y los núcleos voluminosos con los ejes mayores perpendiculares a la membrana basal epidérmica. Mostraban nucleolos muy patentes y en ocasiones se observaban algunas figuras de mitosis.

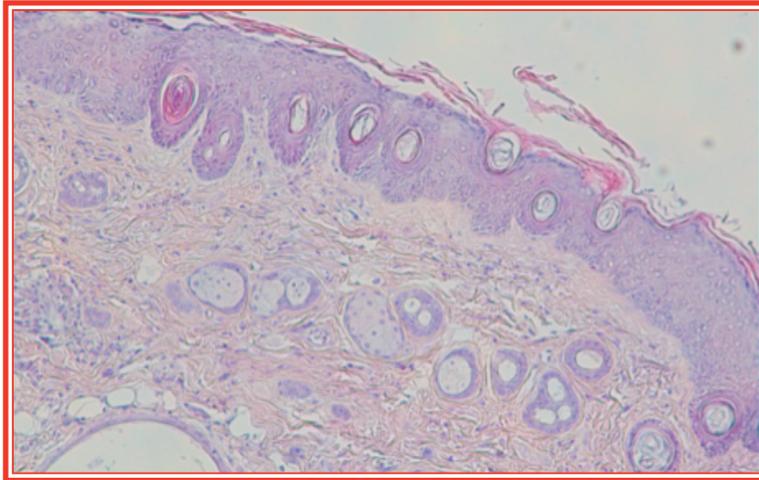


Figura 30.- Áreas de acantosis con hiperplasia de células basales. (H&E 200x)

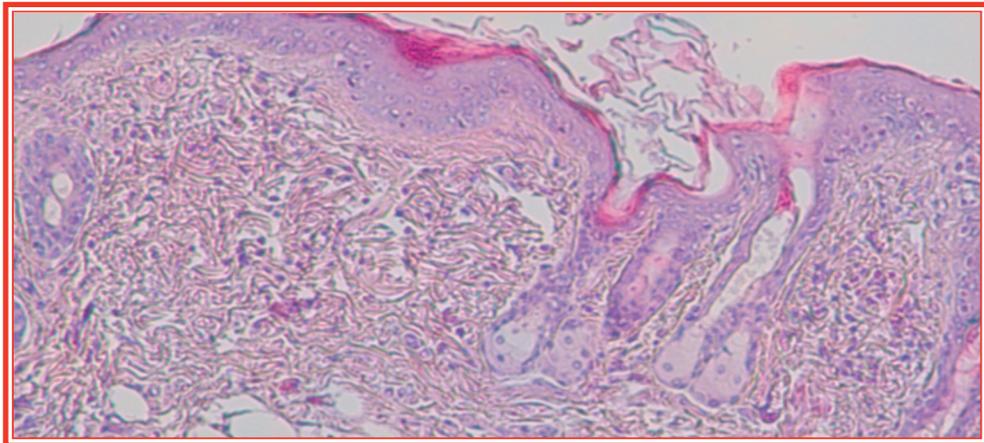


Figura 31.- Detalle de la hiperplasia de células basales. (H&E 212,5x)

No obstante, las alteraciones más frecuentemente observadas correspondían a engrosamiento irregular de la epidermis, con mayor o menor grado de **papilomatosis**. Esta acantosis era el fenó-

meno 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 gran heterogeneidad, pues alternaban las áreas de un gran espesor (15 a 20 capas celulares) con otras no tan engrosadas, que solían acompañarse de frecuente pleomorfismo celular y nuclear.

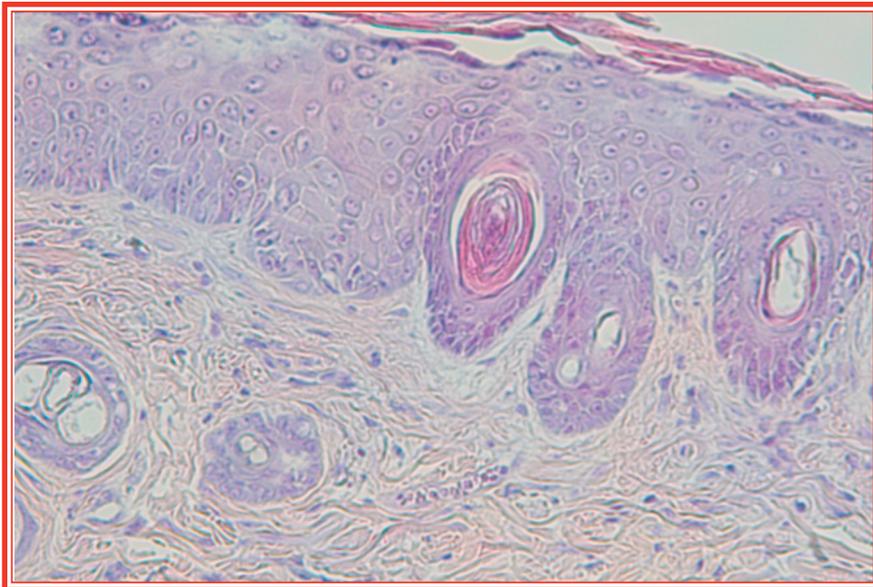


Figura 32.- Área con acantosis e hiperqueratosis. (H&E 420x)

Generalmente, estas lesiones se acompañaban de **hiperqueratosis** con **hipergranulosis**, consistentes en el engrosamiento de la epidermis por aumento del estrato córneo y del granuloso, constituidos por varias hileras de células totalmente queratinizadas y anucleadas adoptando un patrón denso o en ho-

jaldre recubriendo la superficie epidérmica. En algunas zonas se observaban en estas capas numerosos gránulos de queratohialina en los citoplasmas de algunos de los queratinocitos. Con menos frecuencia se observaba **paraqueratosis**, caracterizada por la presencia de núcleos en las células del estrato epidérmico más superficial totalmente queratinizadas (estrato córneo).

Ocasionalmente también observamos en la zona **disqueratosis** caracterizada por la queratinización de forma individualizada de los queratinocitos, preferentemente a nivel del estrato espinoso de Malpighio.

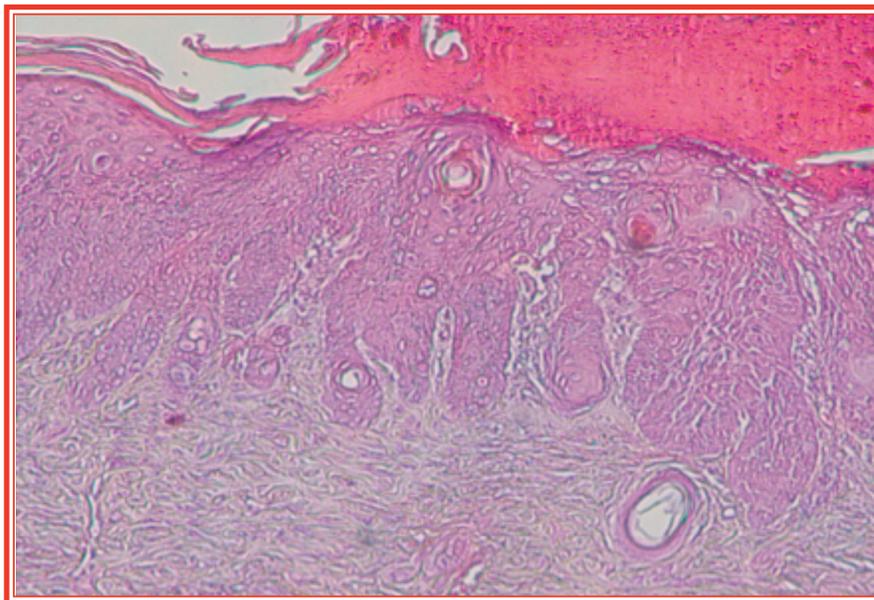


Figura 33.- Acanthosis con hiperqueratosis y paraqueratosis. (H&E 340x)

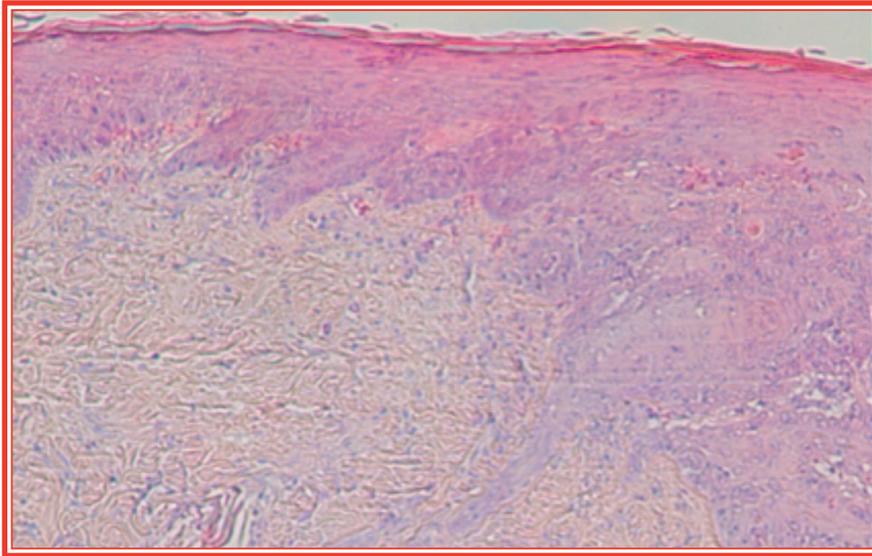


Figura 34.- Disqueratosis. (H&E 212,5x)

En algunas áreas cutáneas también se observaban zonas de **displasia** epitelial. Estas lesiones se encontraban, con frecuencia, tanto de forma aislada como junto a los fenómenos descritos previamente, así como en la vecindad de las lesiones neoplásicas malignas.

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

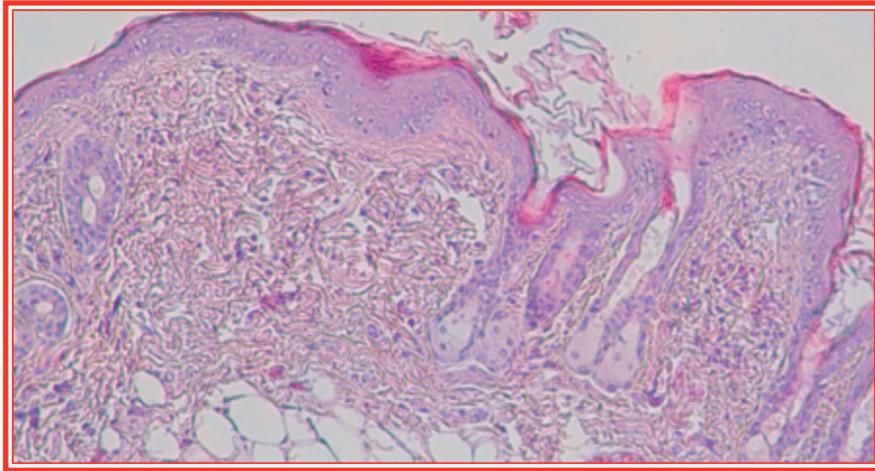


Figura 35.- Displasia grado I. (H&E 212,5x.)

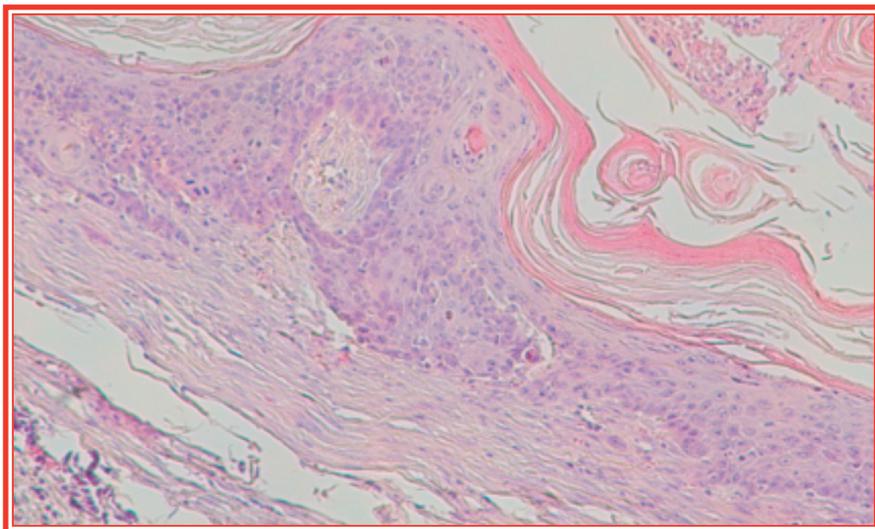


Figura 36.- Displasia grado II-III(H&E 360x)

Con menos frecuencia, también observábamos algunas áreas de **Carcinoma "in situ"**, caracterizadas por la presencia de todas las alteraciones arquitecturales y celulares que hemos des-

crito en las áreas de displasia, y que afectaban a todo el espesor de la epidermis, lo que llevaba al borramiento los estratos epidérmicos normales (basal, espinoso y córneo). Sin embargo, la membrana basal se mantenía íntegra en todas estas zonas.

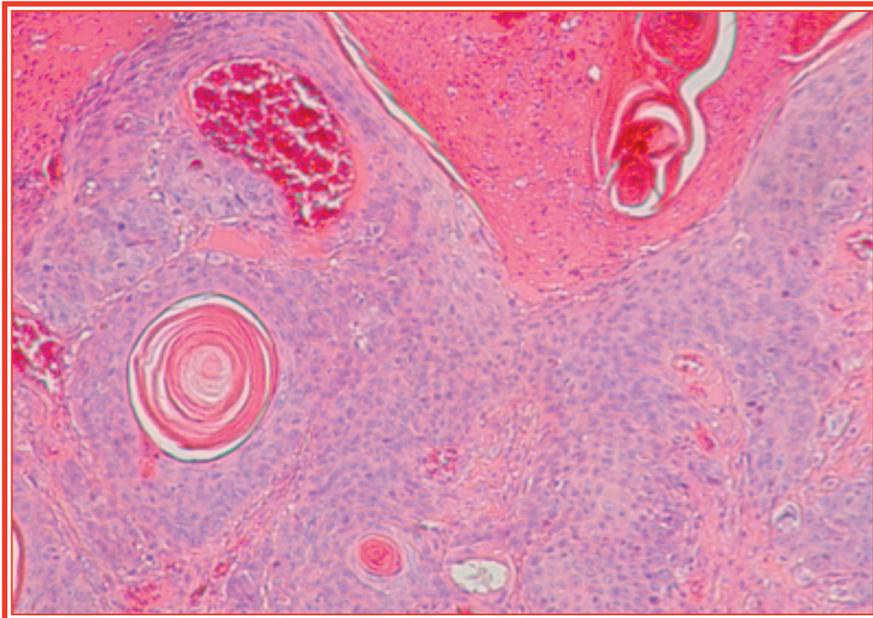


Figura 37.- Carcinoma "in situ". (H&E 450x.)

A partir de **sesenta** sesiones, **clínicamente** era constante en todos los animales la presencia de lesiones tumorales nodulares que usualmente eran múltiples. La mayoría de ellas se encontraban en relación con las zonas de engrosamiento queratósico, mientras que en otras áreas se disponían de forma aislada.

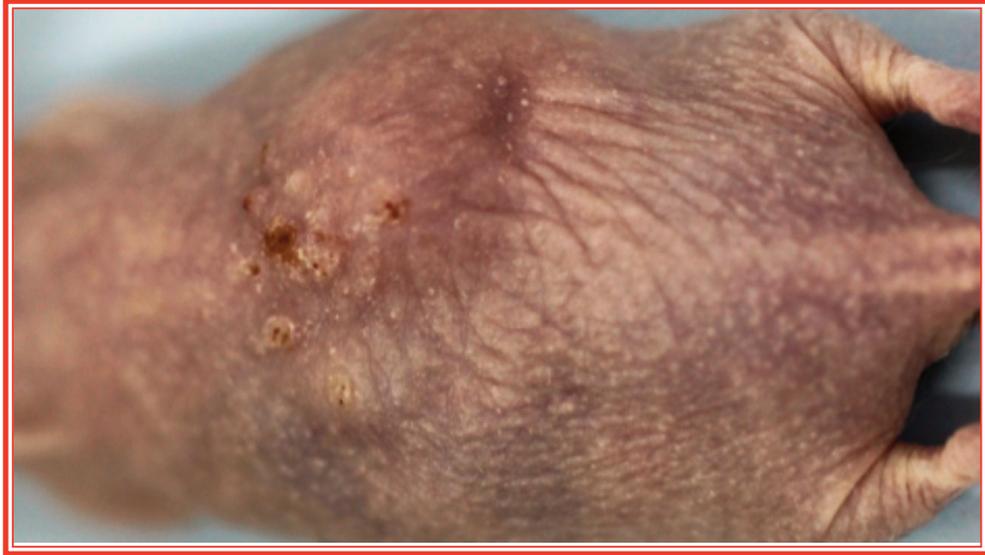


Figura 38.- Múltiples lesiones nodulares.

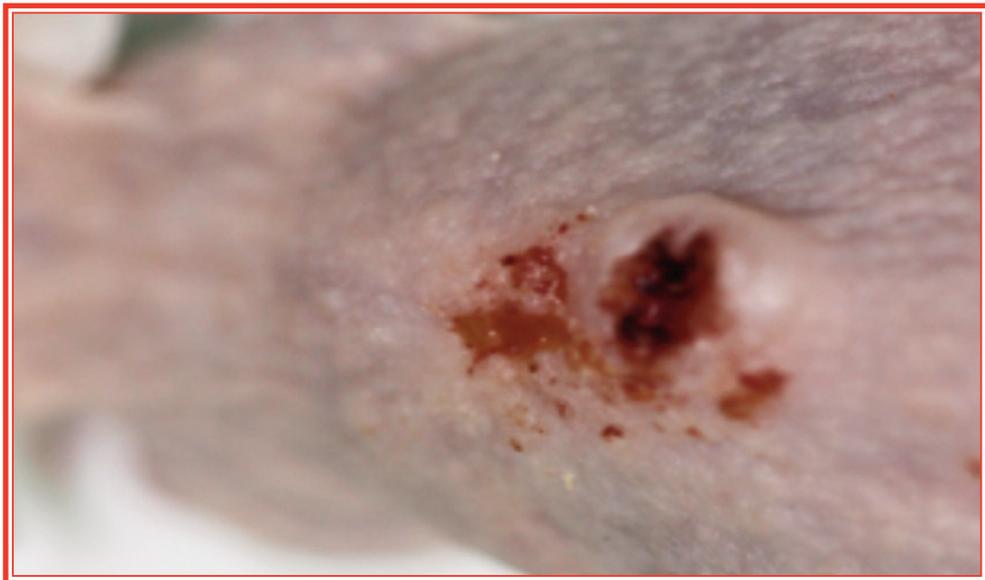


Figura 39.- Tumoración nodular crateriforme.



Figura 40.- Lesiones múltiples nodulares de superficie erosiva.

Las **lesiones ulceradas** eran también muy frecuentes a partir de este periodo. Generalmente mostraban bordes irregulares y engrosados en algunas zonas; éstas se disponían bien en el seno de las áreas eritematosas o de forma individualizada.



Figura 41.- Lesión ulcerada.



Figura 42.- Ulceración con costra fibrino-hemorrágica.

Con menor frecuencia, las lesiones tumorales adoptaban un aspecto **verrucoso** o **vegetante**, con la porción central deprimida, de aspecto crateriforme recubierto de costra queratósica.



Figura 43.- Tumoraciones de aspecto queratoacantomatoso.

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

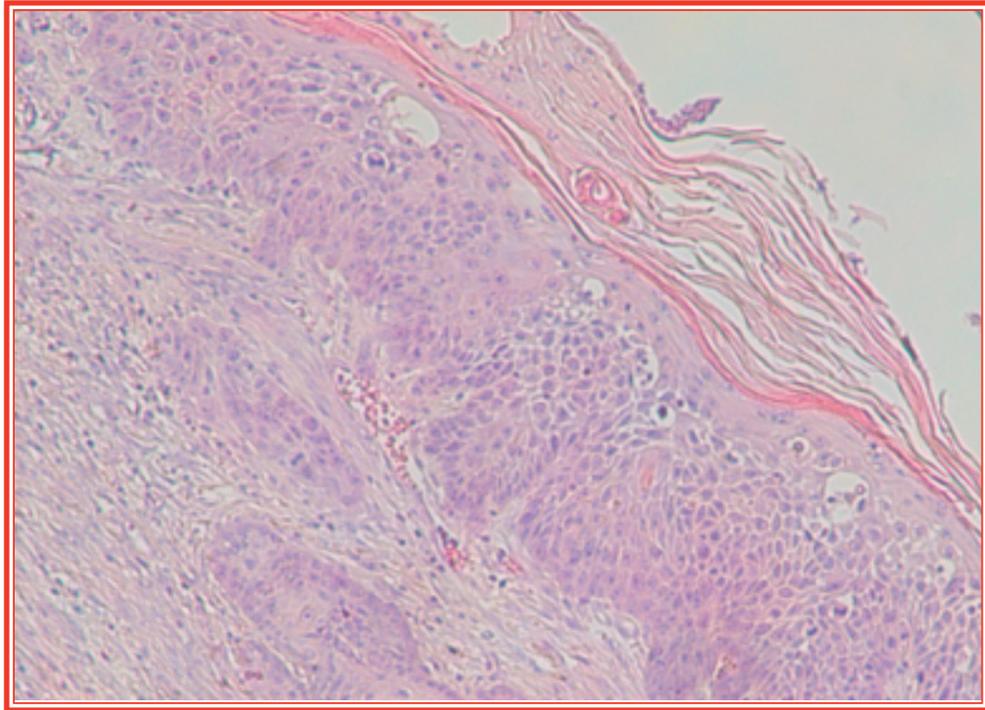


Figura 44.- Carcinoma escamoso microinvasor. (H&E 320x)

No obstante, las lesiones neoplásicas más frecuentemente encontradas correspondían a los **carcinomas de células escamosas**. Estaban constituidos por columnas, nidos irregulares y reguerros de células escamosas, que desde la epidermis crecían infiltrando la dermis. Con frecuencia la invasión dérmica estaba localizada en la dermis papilar, y con menor frecuencia se extendía de forma irregular hacia la dermis reticular subyacente. Las células eran poligonales, con núcleos voluminosos y moderado pleomorfismo celular y nuclear. Los núcleos eran, en general, muy voluminosos, con uno o varios nucléolos grandes e hipercromáticos.

También eran frecuentes los fenómenos de queratinización celular individual o disqueratosis, así como la presencia de numerosos globos córneos. Las mitosis eran frecuentes, mientras que eran escasas las mitosis monstruosas. Los cordones y nidos irregulares rompían la membrana basal epidérmica e infiltraban la dermis subyacente y con frecuencia hasta el músculo esquelético subyacente. Alrededor de estas áreas era frecuente la presencia de fenómenos de fibrosis e infiltrados linfoplasmocitarios.

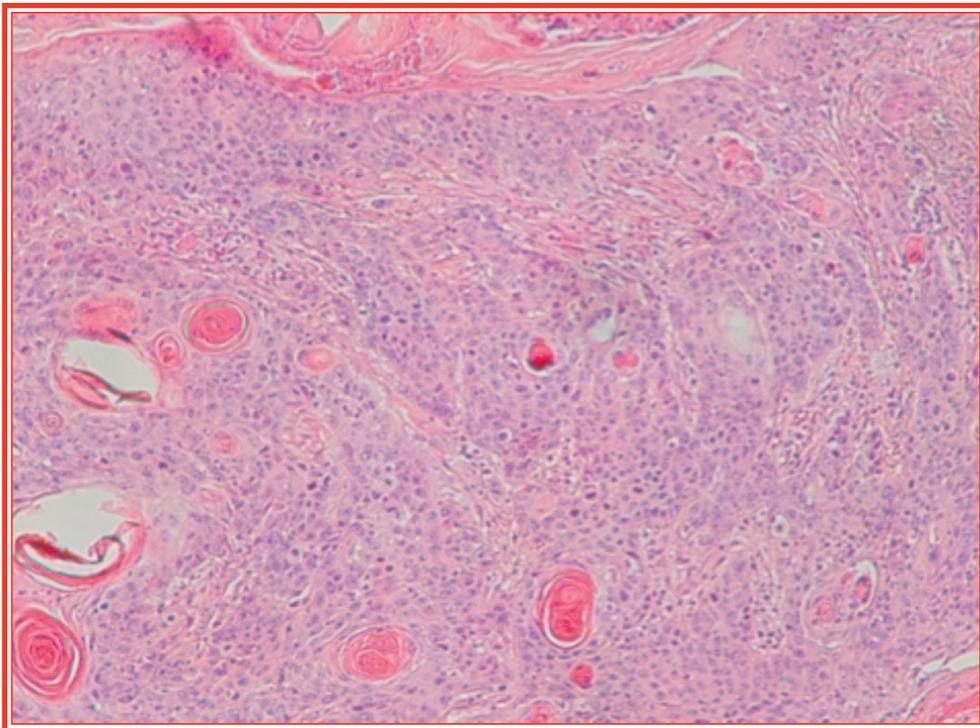


Figura 45- Carcinoma escamoso invasor. (H&E 360x)

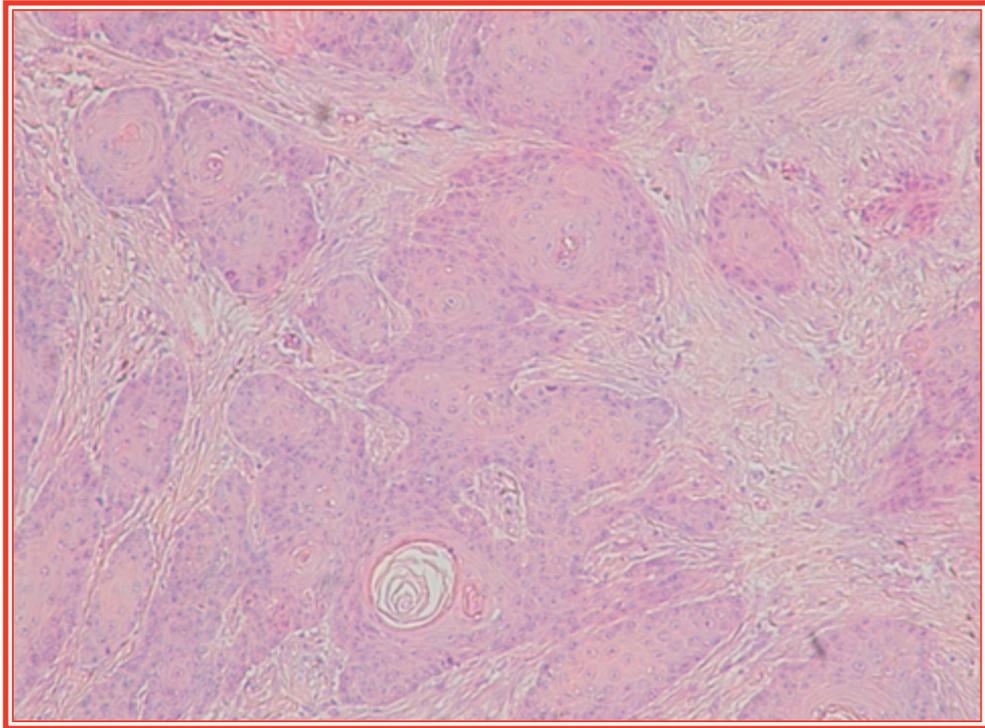


Figura 46- Invasión intradérmica. (H&E 420x)

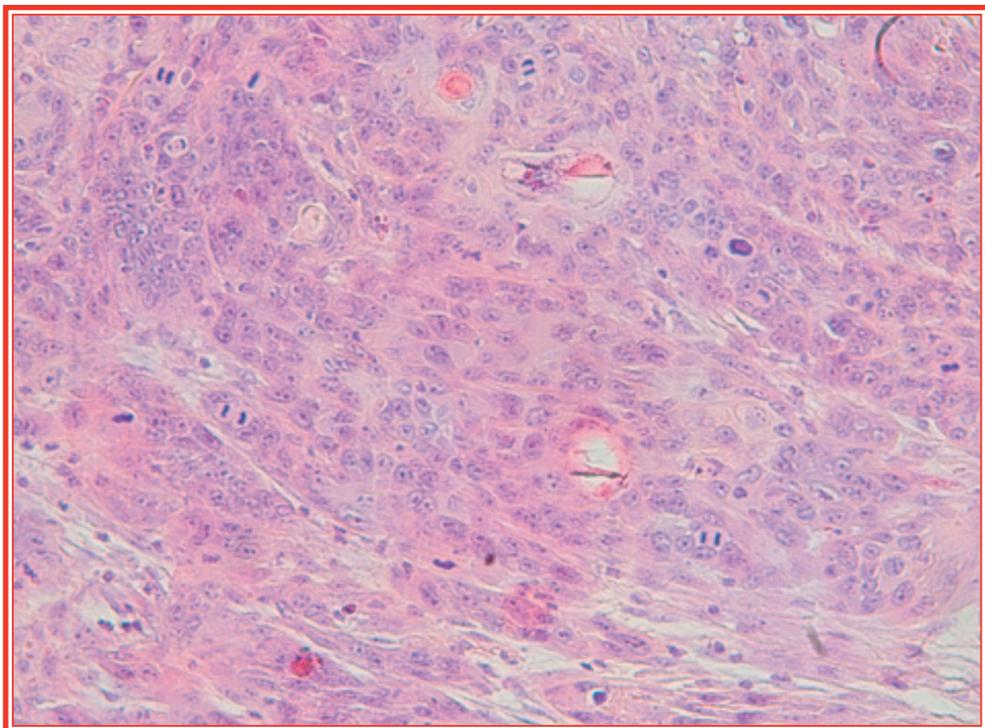


Figura 47- Detalle de atipia celular, disqueratosis . (H&E 500x)

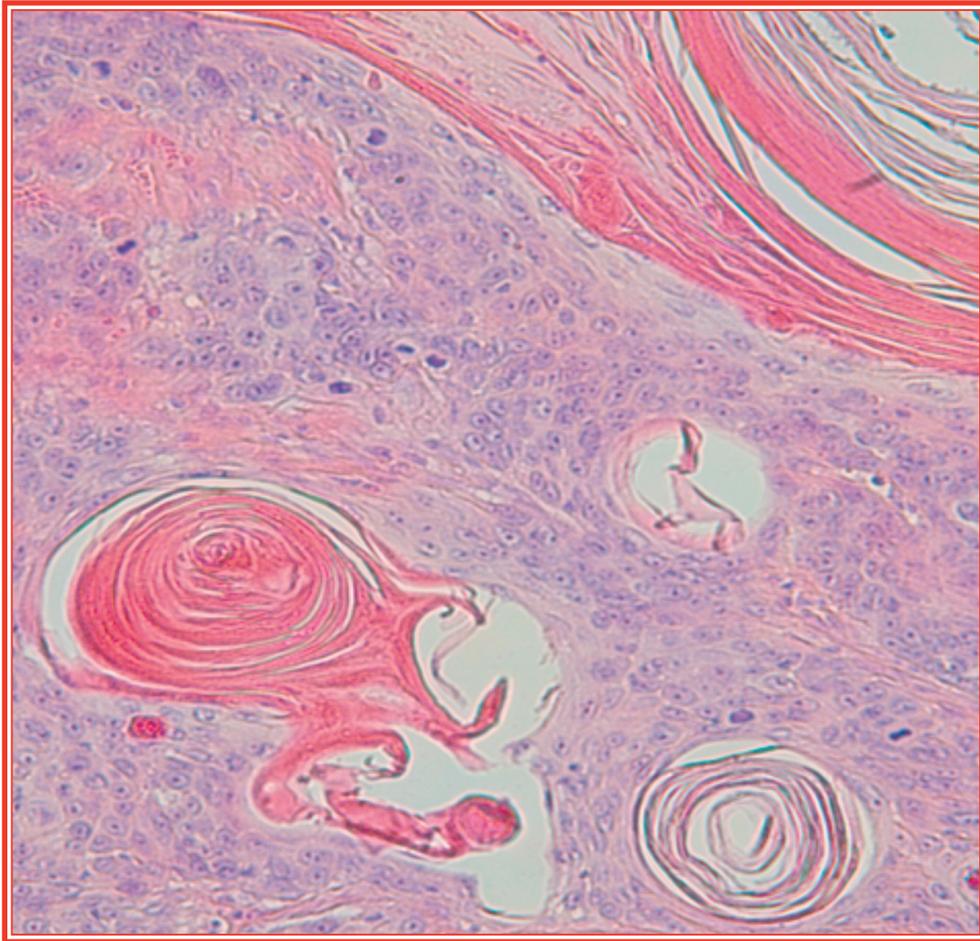


Figura 48- Detalle de atipias celulares y globos córneos. (H&E 500x)

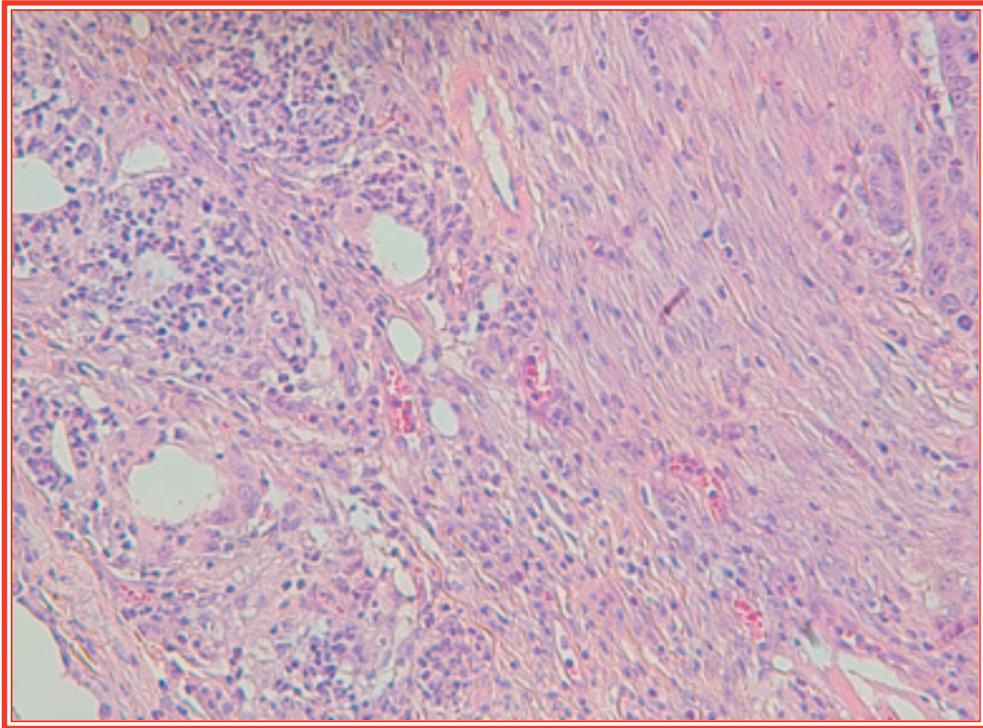


Figura 49- Infiltrados linfoplasmocitarios dérmicos. (H&E 240x)

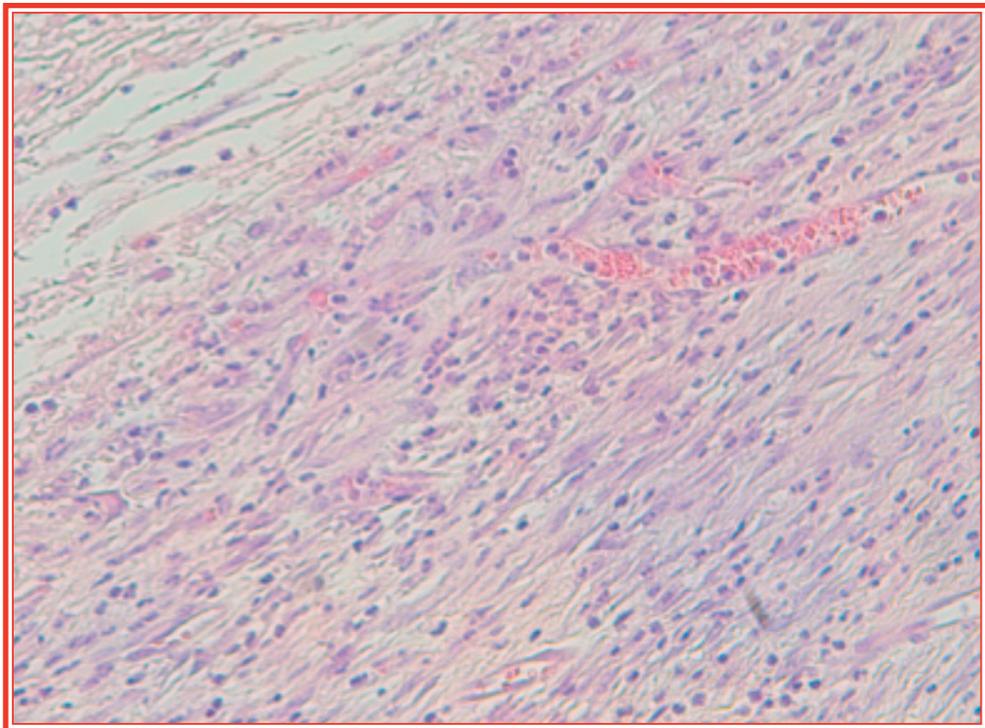


Figura 50- Detalle de congestión vascular e infiltrados linfoplasmocitarios dérmicos. (H&E 240x)

GRUPO II (ASTAXANTINA)

Como en el **grupo control**, los primeros cambios observados en los animales tratados con RUV y la **Astaxantina** correspondían **clínicamente**, a la presentación de **eritema cutáneo** que predominaba en la zona del dorso: lomo, cabeza y orejas. Se presentaba desde la primera sesión y era pasajero durante casi la primera mitad del experimento pues solía desaparecer alrededor de una hora después de acabar la exposición a las radiaciones.



Figura 51.- Eritema.

A partir de 30-35 sesiones se hacía mas difuso y además permanecía entre las sesiones. Con frecuencia adoptaba un aspecto reticulado, la coloración variaba de rojo a violácea y en las últimas etapas del experimento mostraba aspecto telangiectásico.



Figura 52.- Eritema difuso, rojo-violáceo.

A continuación (40-42 sesiones) predominaba el marcado **patrón geométrico de la piel**, que se hacía patente y permanecía durante el transcurso del experimento, aumentando de modo progresivo.

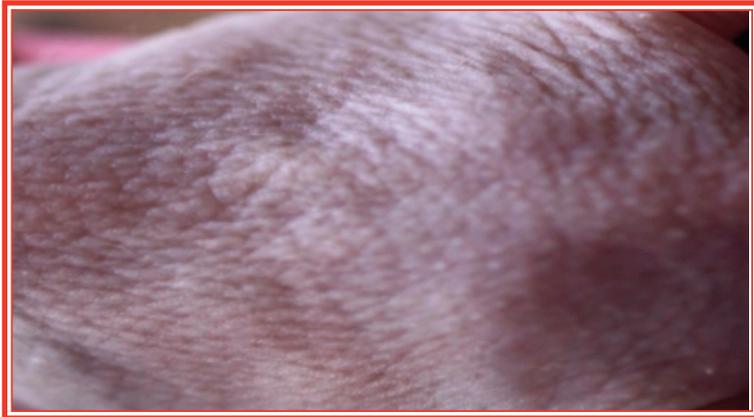


Figura 53.- Patrón geométrico cutáneo.

Las **arrugas** eran manifiestas y permanentes a partir de las 45-50 sesiones; al principio adoptaban un patrón longitudinal y se situaban a lo largo de toda la zona del dorso de los animales. Conforme aumentaba el número de exposiciones, se hacían de disposición más irregular y se acompañaban de áreas de engrosamiento irregular.



Figura 54.- Arrugas cutáneas.

Microscópicamente destacaba en la dermis el engrosamiento de la papilar debido al aumento y a la disposición tortuosa de los capilares sanguíneos así como de la red capilar subpapilar. También aumentaba el grosor de la dermis reticular, en la que destacaban los fenómenos de desorganización de la estructura general y de la disposición del entramado de las fibras colágenas y elásticas en el que podía observarse los tres grados de elastosis descritos. Asimismo, encontramos con frecuencia áreas irregulares de fibrosis así como múltiples focos con infiltrados de linfocitos y de células plasmáticas.

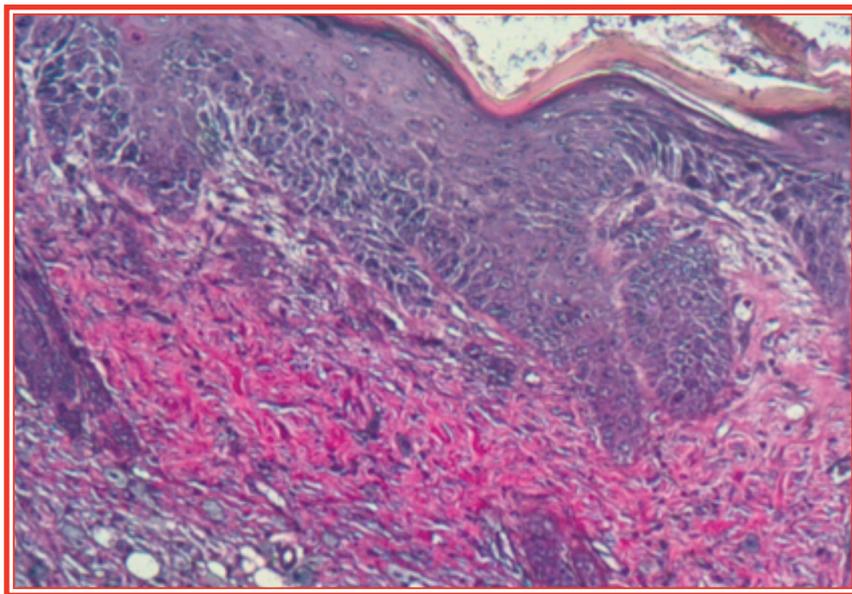


Figura 55.- Elastosis dérmica (H&E.320 x)

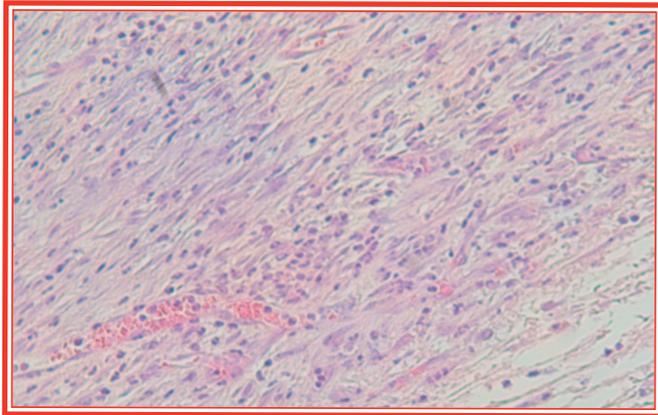


Figura 56.- Infiltrados linfoplasmocitarios dérmicos (H&E 212,5x)

A partir de las **50-55** sesiones, **clínicamente** destacaba en toda la superficie cutánea dorsal el **engrosamiento irregular** de aspecto granular difuso ,que se acompañaba con frecuencia de superficie escamosa y con marcado patrón geométrico de la piel. Sobre ellas se observaban algunas lesiones de aspecto queratósico, que frecuentemente se mostraban firmes al tacto

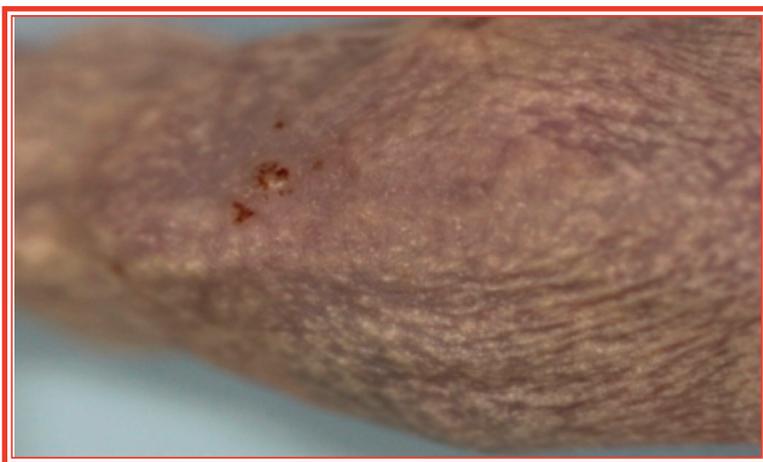


Figura 57.- Engrosamiento queratósico.

A partir de este periodo (**55-60** sesiones) dichas lesiones se hacían **erosivas**, y estaban cubiertas por escamas y costras fibrino-hemorrágicas que tendían a confluir en placas de límites irregulares. Las de mayor volumen se cubrían de costras hemorrágicas que mostraban los bordes sobreelevados y estaban fijadas generalmente a planos profundos.

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



Figura 58.- Lesiones eritemato-escamosas.

Microscópicamente, las lesiones descritas correspondían a diversos tipos de alteraciones morfológicas, destacando las áreas de **atrofia epidérmica** que alternaban con otras irregulares de **engrosamiento** epitelial. En estas zonas, predominaba la **hiperplasia de células basales**, o bien el engrosamiento irregular de la epidermis con mayor o menor grado de **papilomatosis** que mostraba gran heterogeneidad, con áreas de un gran espesor (15 a 20 capas celulares) así como frecuente pleomorfismo celular y nuclear. Solían acompañarse de **hiperqueratosis con hipergranulosis** y a veces existía **paraqueratosis** con presencia de los núcleos en las células del estrato epidérmico más superficial y totalmente queratinizadas (estrato córneo). Ocasionalmente

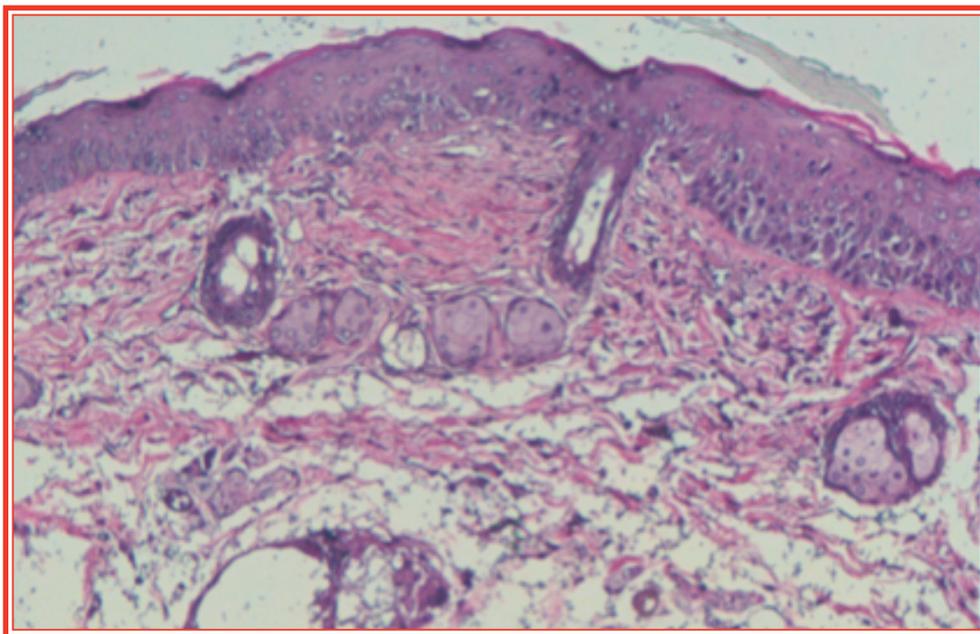


Figura 59.- Acanthosis irregular con hiperplasia de células basales (H&E 312,5x)

también observamos en esas zonas **disqueratosis** caracterizada por queratinización celular individual de los queratinocitos.

En algunas de estas áreas cutáneas también se observaban zonas de **displasia** epitelial. Estas lesiones se encontraban tanto de forma aislada como en la vecindad de las lesiones neoplásicas malignas. Dichas áreas se caracterizaban por las alteraciones de la polaridad celular, así como por el intenso pleomorfismo celular y nuclear, con frecuentes fenómenos de disqueratosis y mitosis atípicas. Afectaban al tercio inferior del epitelio, a la mitad o más de dos tercios de la misma (grados I,II,III, respectivamente). No obstante predominaban las de grado I, siendo las menos frecuen-

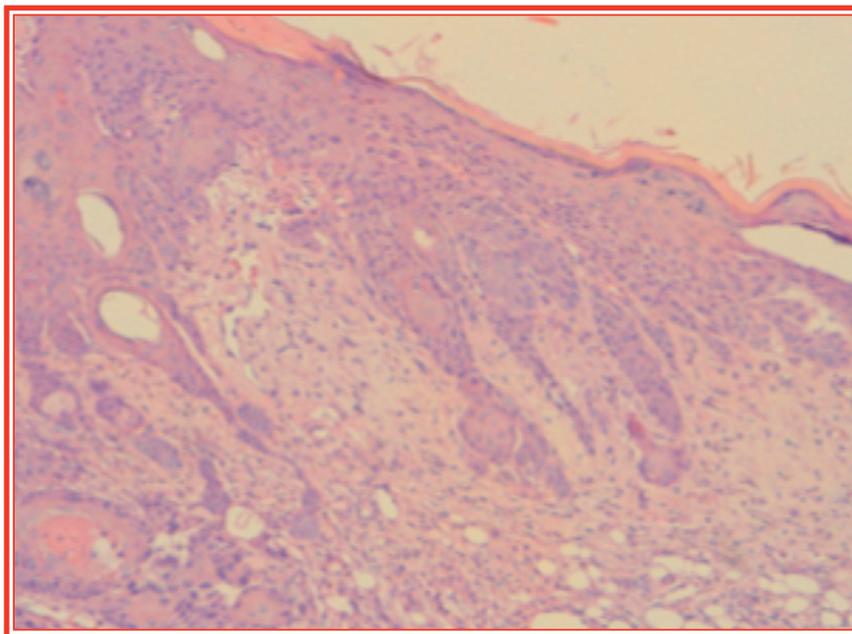


Figura 60.- Displasia epidérmica II (H&E 212,5x.)

tes las de grado III. Estas alteraciones las observamos en el 60% de los animales sacrificados al finalizar la 80 sesión y en el 80% de los sacrificados a la 113 sesión.

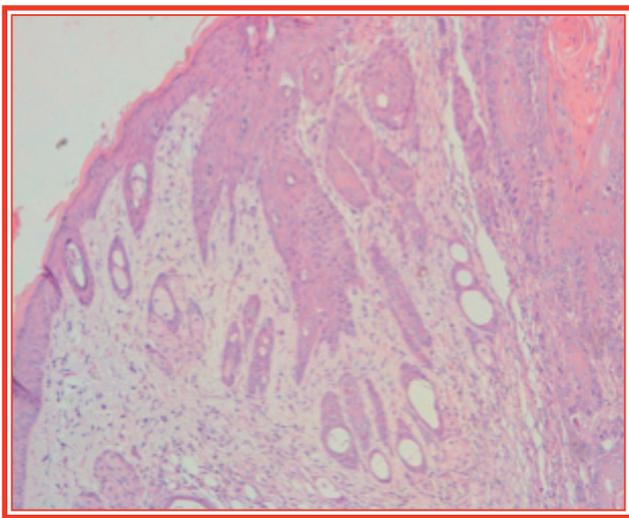


Figura 61.- Displasia III (H&E x)

Con menos frecuencia observamos también pequeños focos de **Carcinoma in situ** (25% de los animales sacrificados tras la 80 sesión y 75% de los de 113 sesiones). Se caracterizaban por la presencia de alteraciones celulares descritas en la displasia, y consistían en la afectación de todo el espesor epidérmico, de modo que no podían distinguirse los estratos epidérmicos normales (basal, espinoso y córneo). No obstante, la membrana basal en todas estas zonas se mantenía íntegra.

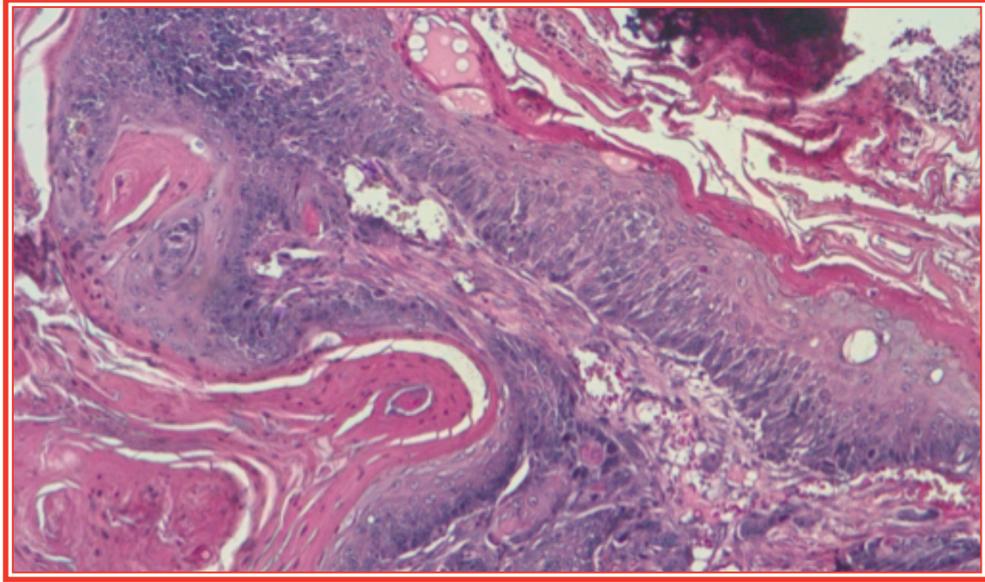


Figura 62.- Áreas de carcinoma "in situ" (H&E 420x)

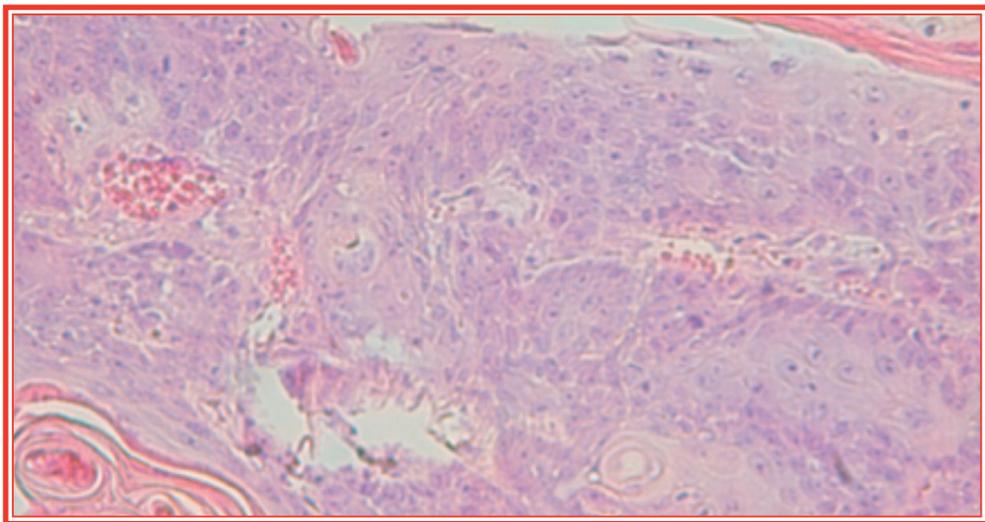


Figura 63.- Carcinoma "in situ" (H&E 500x.)

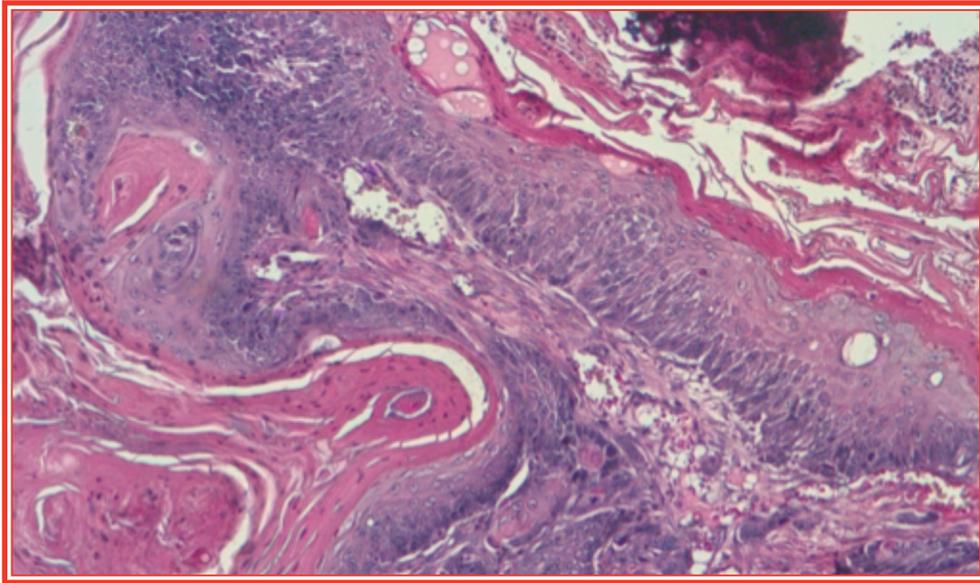


Figura 64.- Infiltrados linfoplasmocitarios dérmicos (H&E 240x)

Las lesiones **tumorales nodulares** fueron de presentación excepcional, ya que solo ocurrieron en **2** animales tras la **80 sesión** que en principio constituía la duración total del estudio. Por ese motivo decidimos seguir sometiendo a **diez animales** a mayor número de **sesiones (113)**. De ellos, **6** animales presentaron tumoraciones tras la sesión **100** y otros **2** animales tras la sesión **113**. Es decir que solo **10 animales** en total de los treinta que constituían el Grupo tratado con **Astaxantina** además de **RUV** presentaron lesiones claramente neoplásicas. La mayoría de ellas se encontraban en relación con las zonas de engrosamiento queratósico, mientras que en otras áreas se disponían de forma aislada.



Figura 65.- Lesiones nodulares queratósicas.

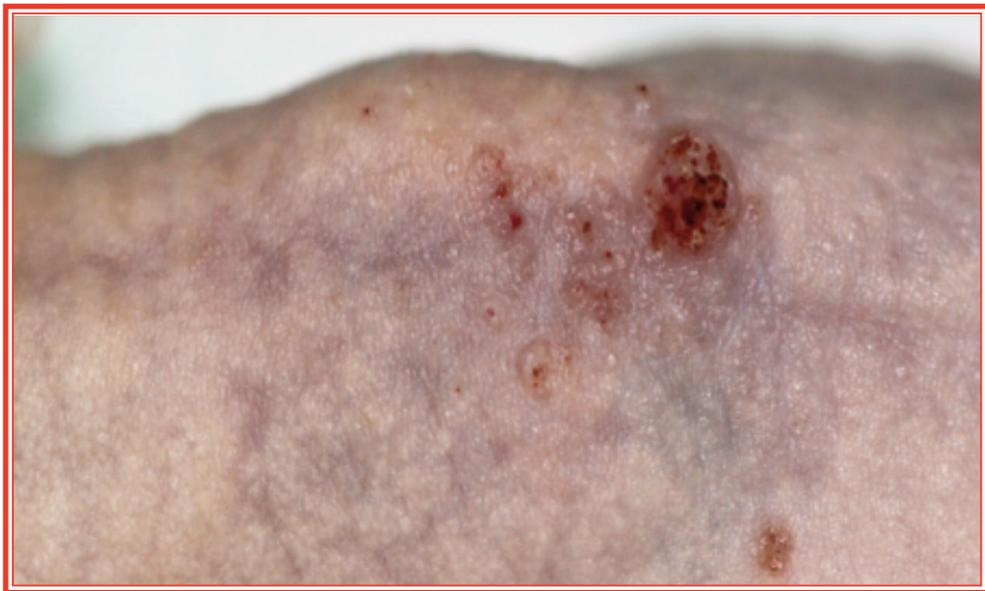


Figura 66.- Lesiones tumorales erosionadas.

Las lesiones **ulceradas** eran también muy poco frecuentes y fueron observadas casi todas a partir de las 70 sesiones). Generalmente mostraban bordes irregulares, que en algunas zonas, estaban engrosados; se disponían de forma individualizada o en el seno de las áreas eritematosas.



Figura 67.- Lesión ulcerada sobre placa queratósica erosiva.

Microscópicamente estas lesiones correspondían a áreas de **carcinoma microinvasor**, en las que además del componente epidérmico atípico de características similares a las del carcinoma

“in situ” antes descrito, se observaban otras zonas que mostraban cordones epiteliales irregulares con atipias celulares marcadas que invadían la membrana basal sobrepasándola e infiltrando la dermis subyacente. En esta, era frecuente observar pequeños focos epiteliales aislados de características morfológicas similares, así como infiltrados periféricos y parcheados de linfocitos y células plasmáticas así como a **Carcinomas de células escamosas**, que fueron las únicas lesiones epiteliales malignas desarrolladas en este modelo experimental. Las células se disponen en cordones amplios y nidos irregulares, que desde la epidermis infiltraban la dermis subyacente y con frecuencia el músculo esquelético subyacente. Estaban constituidos por células escamosas poligonales, con núcleos voluminosos, moderado pleomorfismo con nucléolos muy voluminosos. 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.

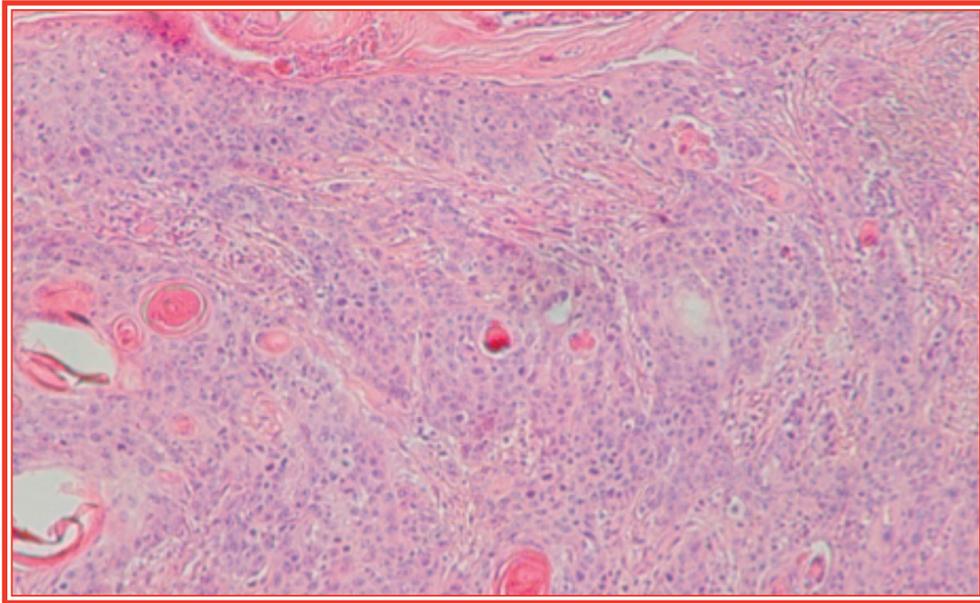


Figura 68.- Carcinoma invasor.(H&E 460x)

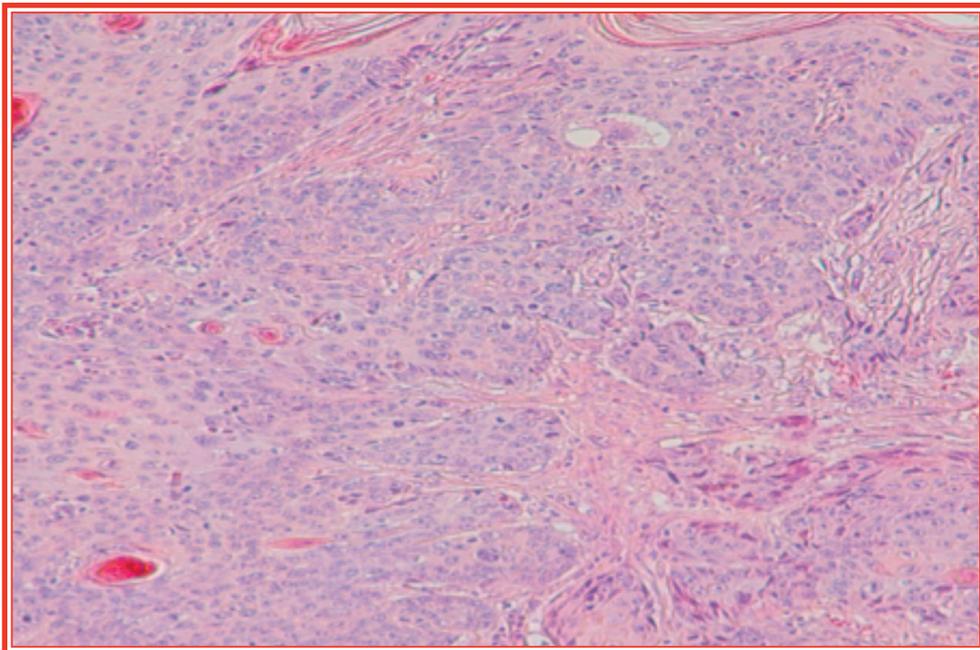


Figura 69.- Carcinoma escamoso. Invasión dérmica (H&E 420x)

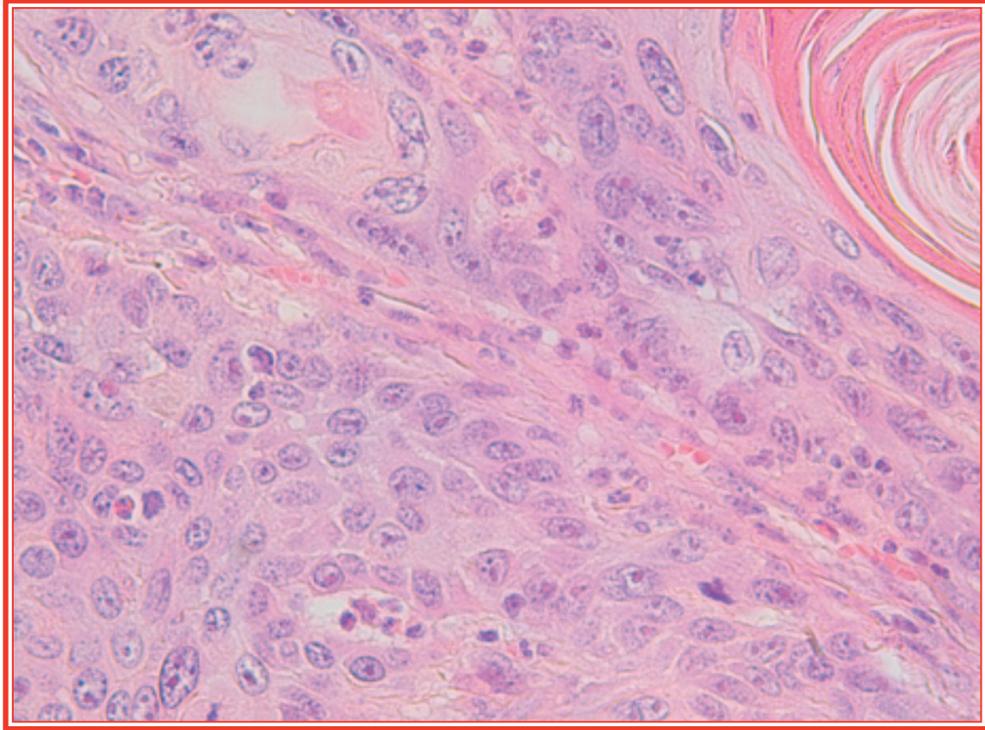


Figura 70.- Detalle de las atipias celulares . (H&E 500x)

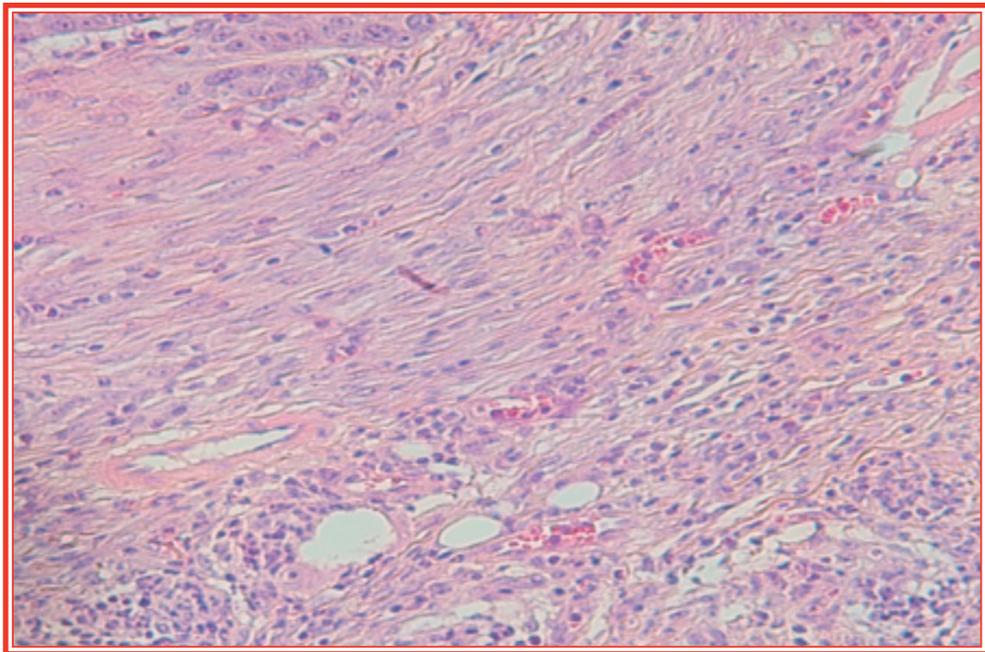


Figura 71.- Áreas de fibrosis e infiltrados linfoplasmocitarios (H&E 212,5x)

RESULTADOS COMPARATIVOS ENTRE GRUPOS

ÁREAS DE LAS LESIONES CLÍNICAS CUTÁNEAS (mm²)

Tabla 4: Áreas de las lesiones cutáneas		
Ratón Nº	Grupo I (Control)	Grupo II (Astaxantina)
1	167,2	6,2
2	216,5	0
3	305,15	8,4
4	221,3	72,6
5	198,3	0
6	202,4	0
7	186,3	18,2
8	220,5	8,4
9	199,8	0
10	163,3	6,6
11	162,15	9,1
12	123,9	0
13	98,2	152,5
14	126,1	60,3
15	263,2	0
16	199,8	6,2
17	190,5	0
18	322,2	8,1
19	88,4	4,2
20	98,7	0
21	79,6	6,8
22	213,5	0
23	299,6	4,3
24	196,5	173,2
25	163,6	0
26	278,5	21,3
27	145,3	0
28	63,2	42,6
29	198,5	0
30	133,3	26,7
Media	184,18	42,55

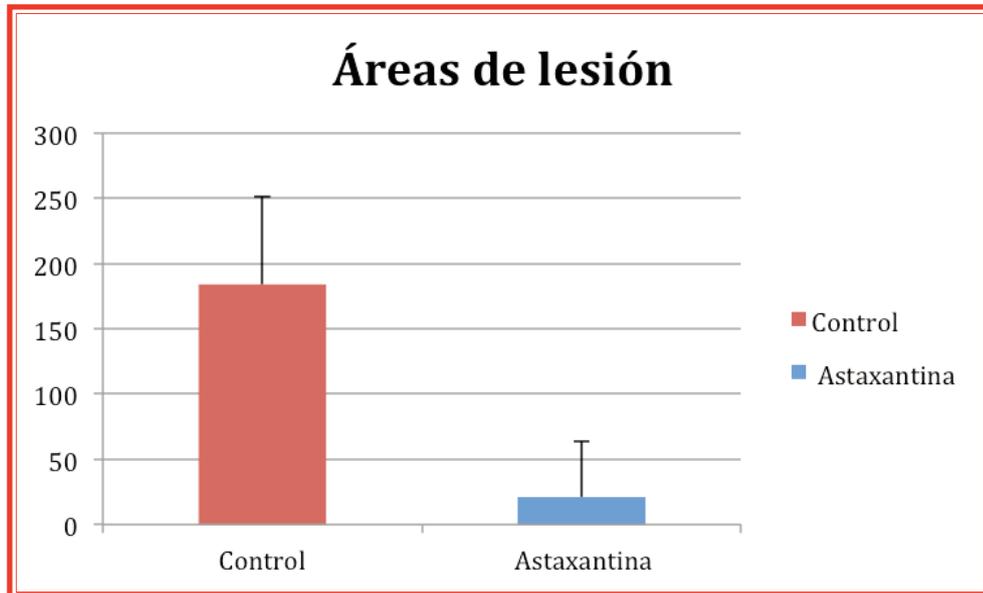


Gráfico 1.- Áreas de las lesiones.

Tabla 5: Tiempo de presentación de las lesiones

Presentación lesiones clínicas cutáneas (sesión)	Grupo I (Control): UV	Grupo II: UV + Astaxantina
Eritema pasajero	1	1
Eritema permanente	15-18	30-35
Patrón geométrico	30-32	40-42
Arrugas	32-35	45-50
Queratosis	40-42	50-55
Lesiones erosivas	45-50	55-60
Lesiones ulceradas	55-60	70-75
Tumores	60	80

Tabla 6: Lesiones microscópicas			
Incidencia de lesiones microscópicas (%)	Grupo I (Control): UV	Grupo II: UV + Astaxantina	
		80 sesiones	113 sesiones
Epiteliales			
Displasia	100	60	80
Carcinoma in-situ	100	25	75
Carcinoma invasor	100	6,5	20
Dérmicas			
Elastosis	100	55	75
Linfocitos T y B	100	75	80
Fibrosis	100	70	75
Vasos	100	75	80

ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

1. PCNA

Existía un marcaje positivo en las capas basales y suprabasales de las zonas cutáneas no afectadas por los tumores en todos los animales (Fig.74). En el caso de los tumores, el marcaje era de predominio leve los desarrollados por los tratados con astaxantina, mientras que los tumores del grupo control mostraron un marcaje muy extenso e intenso. Así, mientras que la media del grupo control fue de **3,23±0,29**, la del grupo tratado con astaxantina fue de **0,84±0,33**. Existían diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (**p<0,01**).

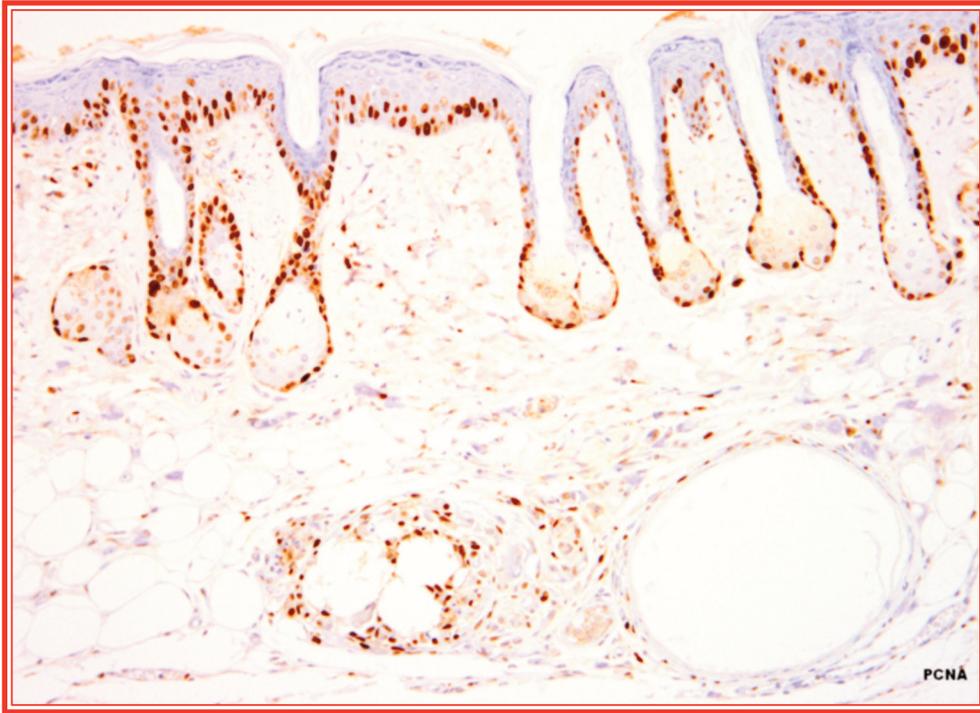


Figura 72.- Marcaje de PCNA en capa basal epidérmica y glándulas.

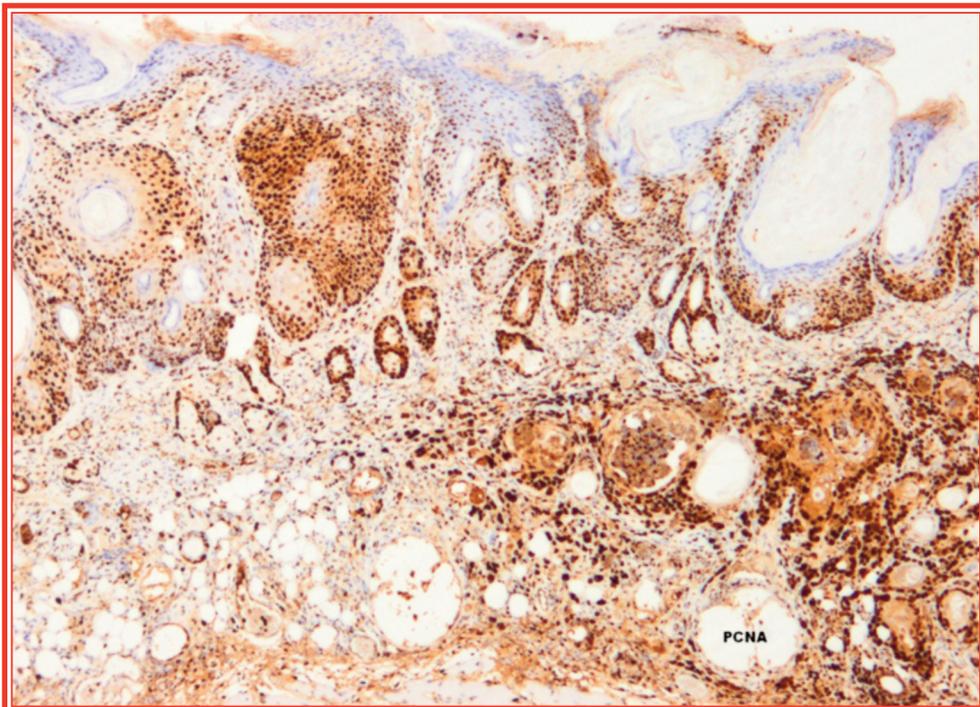


Figura 73.- Marcaje intenso de pcna en carcinoma espinocelular del grupo control.

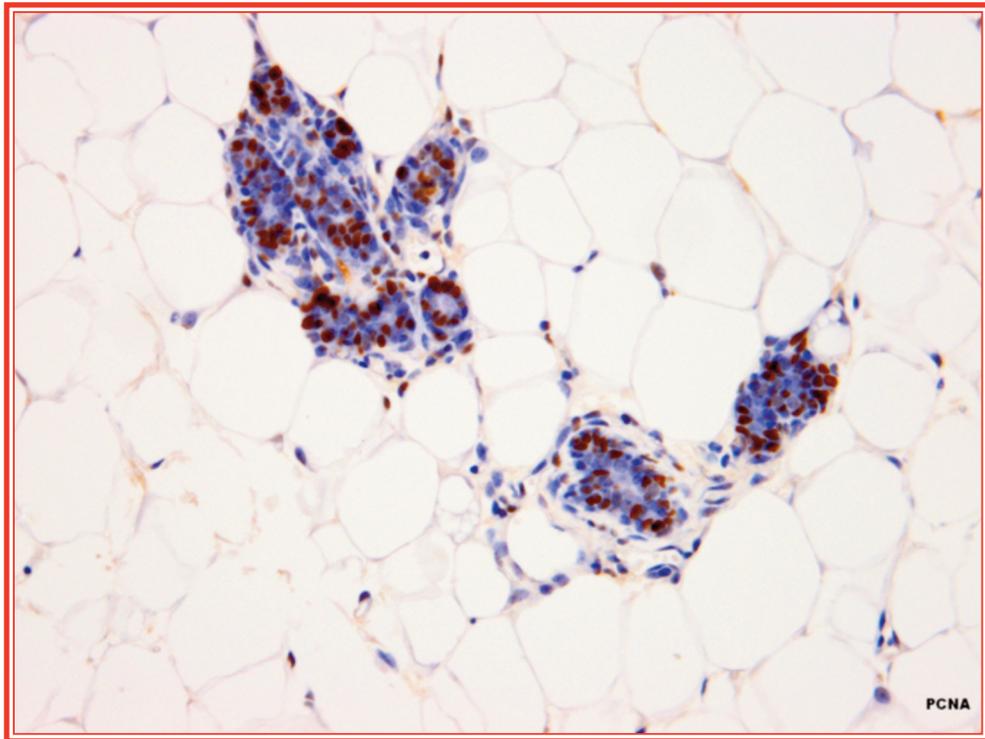


Figura 74.- Detalle del marcaje con pcna en nidos tumorales infiltrantes en tejido celular subcutáneo.

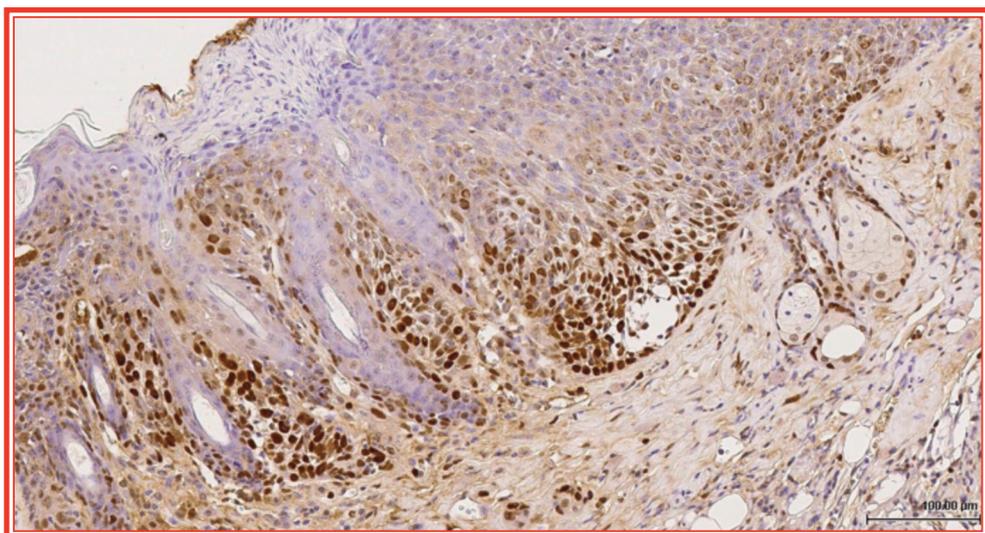


Figura 75.- Inmunotinción con PCNA en carcinoma in-situ del grupo astaxantina.

2. MMP-9

La inmunotinción con metaloproteinasa-9 (MMP-9) fue menos intensa en el grupo control que en el grupo tratado, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. El control obtuvo una puntuación de **0,71±0,15**, el grupo II de **0,8±0,3**.

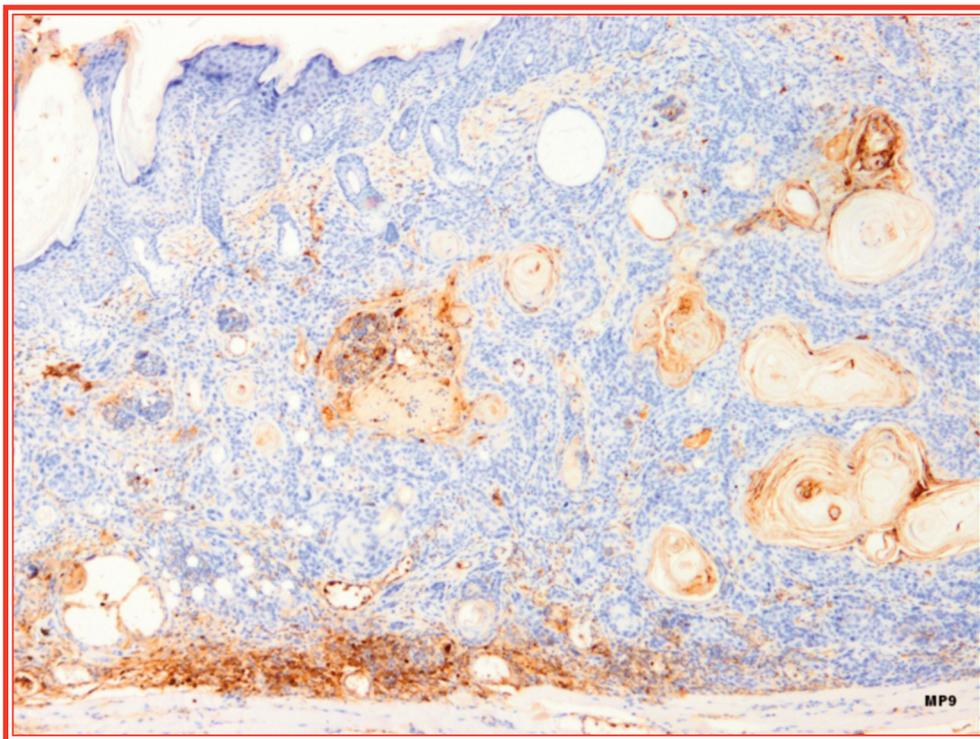


Figura 76.- Marcaje con MMP-9 en el estroma tumoral de un animal del grupo control.

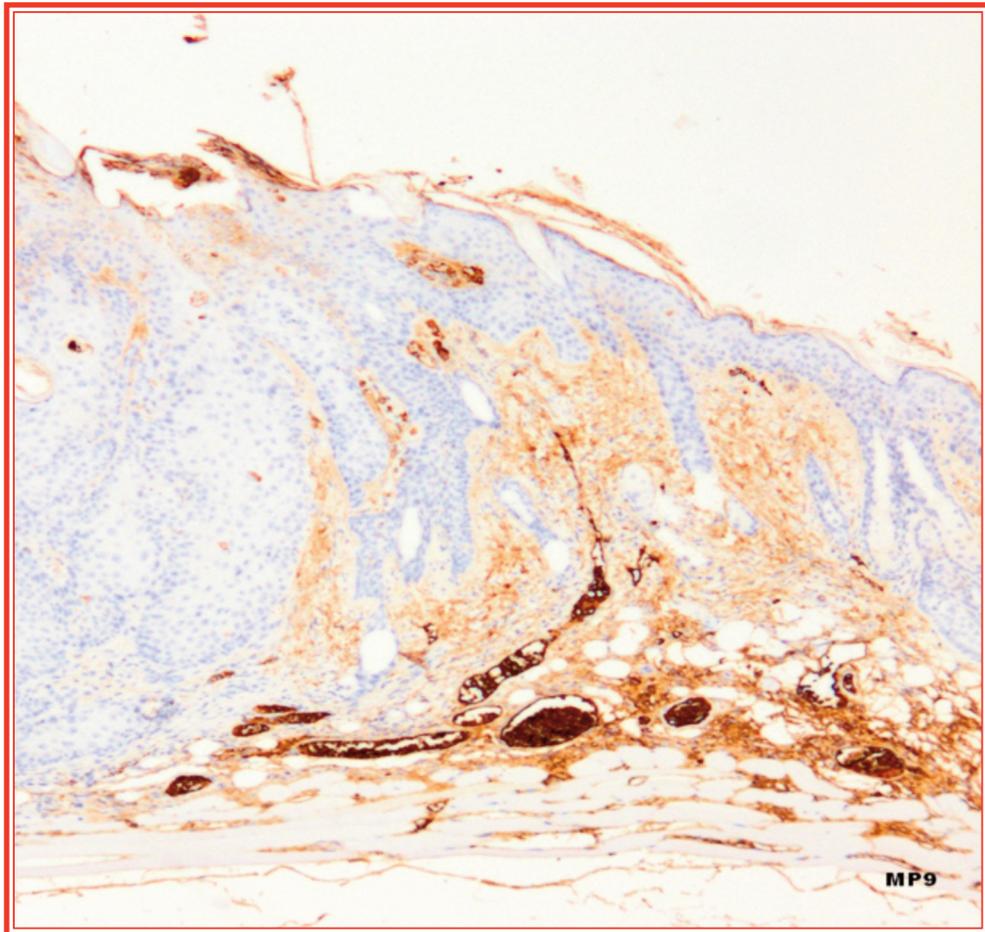


Figura 77.- Inmunotinción con MMP9 donde se observa un intenso marcaje en el estroma tumoral de un animal del grupo tratado con astaxantina.

3. TIMP-1

En el estudio del inhibidor de metaloproteinasas TIMP-1, el marcaje fue más intenso en el caso del grupo tratado que en el control, con diferencias estadísticamente significativas (**$p < 0,001$**). El

grupo de animales tratados con astaxantina obtuvo una puntuación para este anticuerpo de **2,96±0,47**, y el control de **0,51±0,5**.

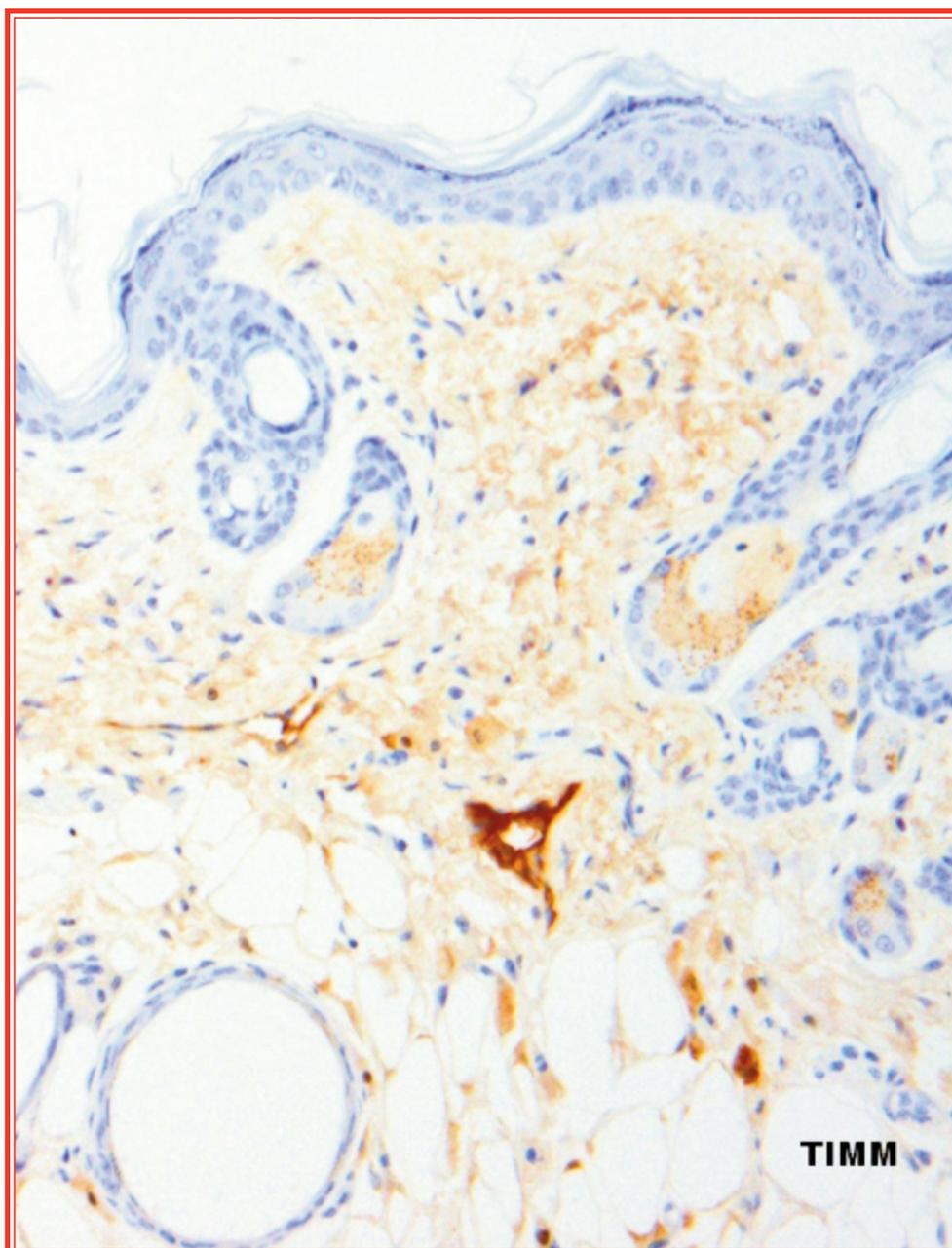


Figura 78.- Expresión de TIMP-1 en los bordes de un tumor del grupo control.

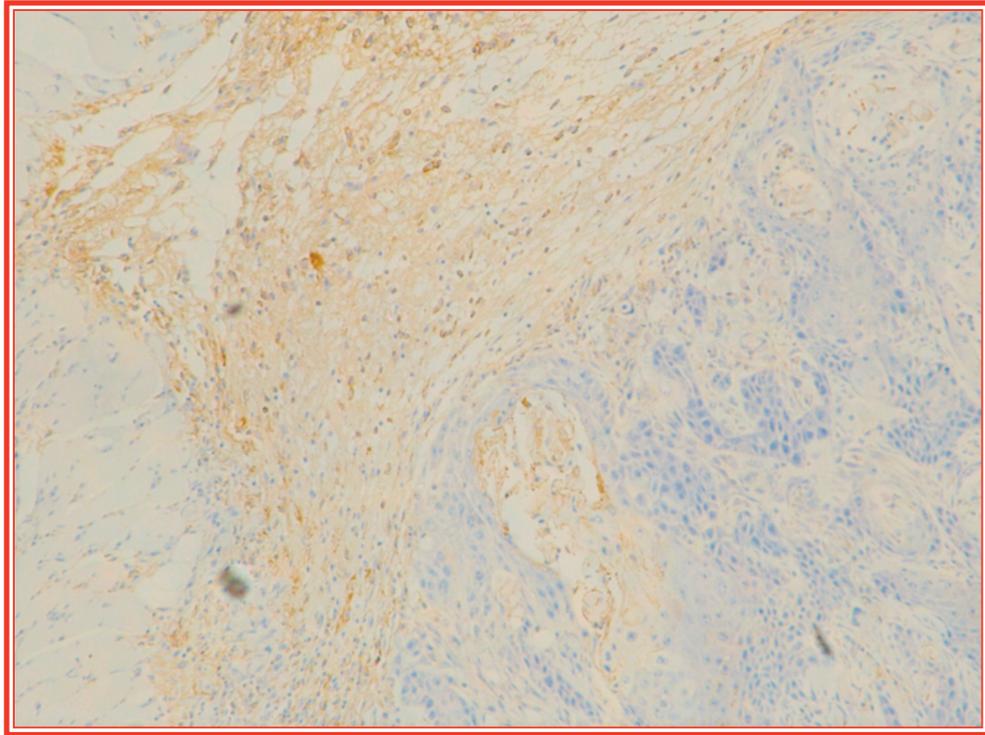


Figura 79.- Expresión de TIMP-1 en un tumor del grupo astaxantina. Marcaje intenso.

4. CD3/CD20

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

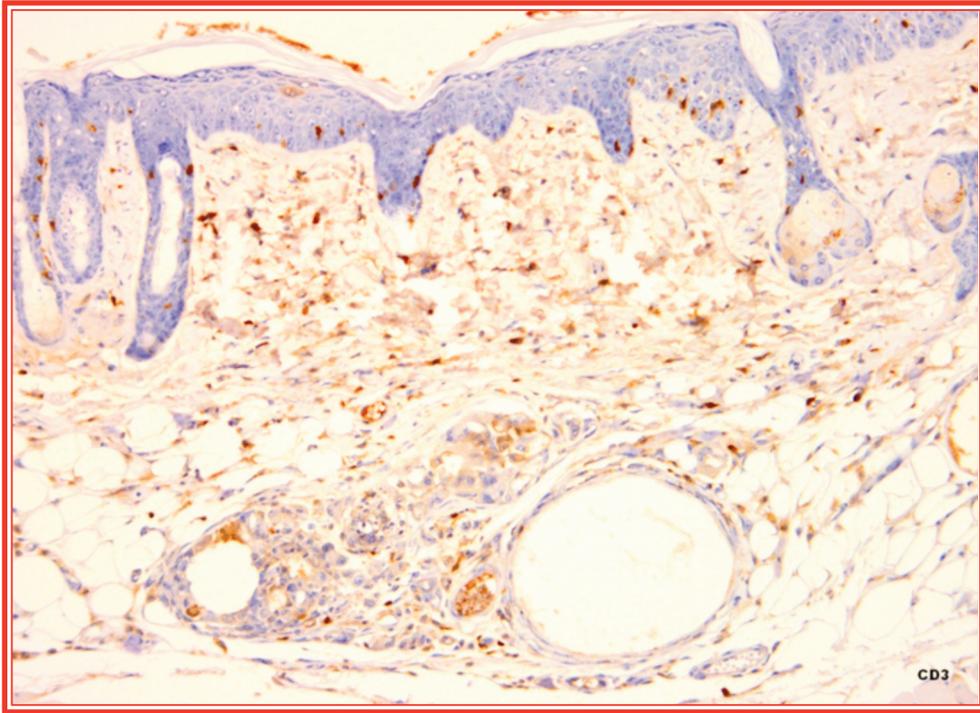


Figura 80.- Marcaje con CD3 en animal del grupo astaxantina.

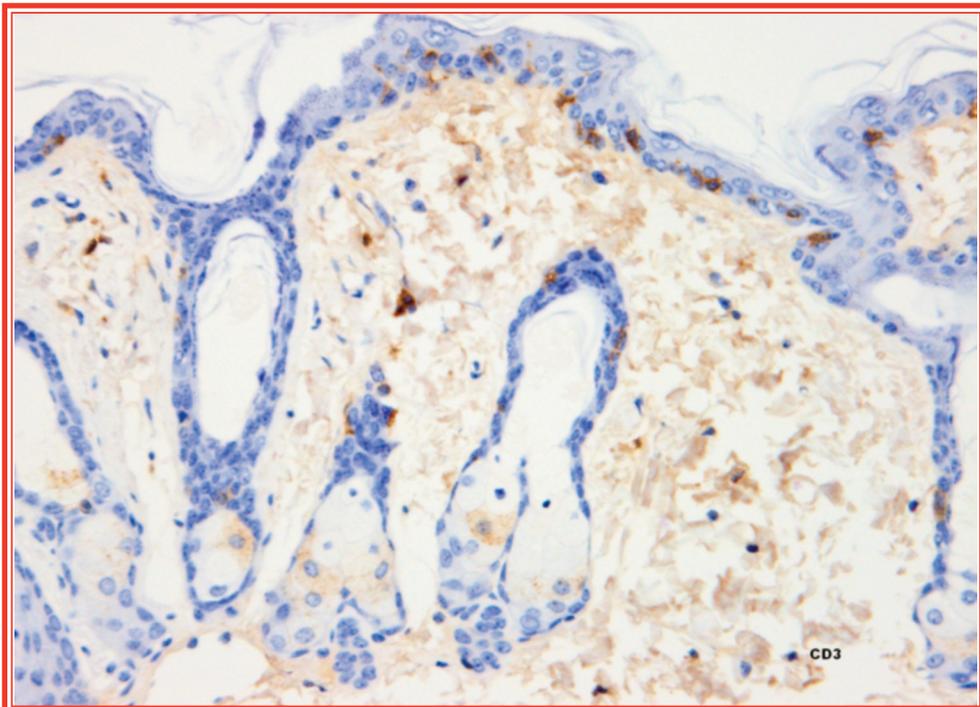


Figura 81.- Marcaje con CD3 en animal del grupo control.

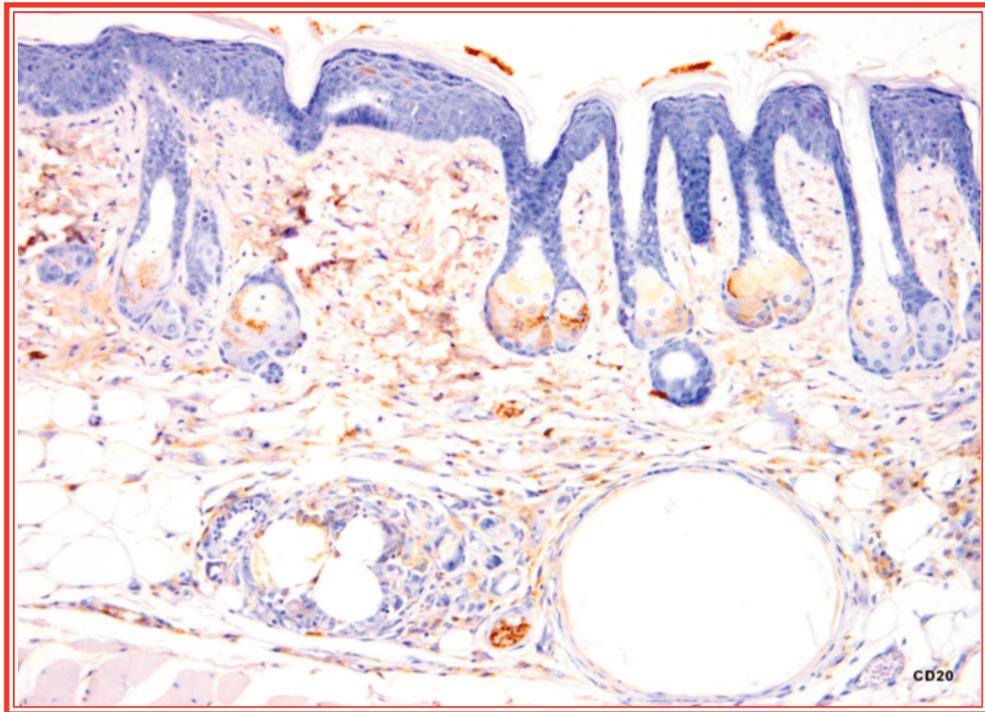


Figura 82.- Marcaje con CD20 en el grupo astaxantina.

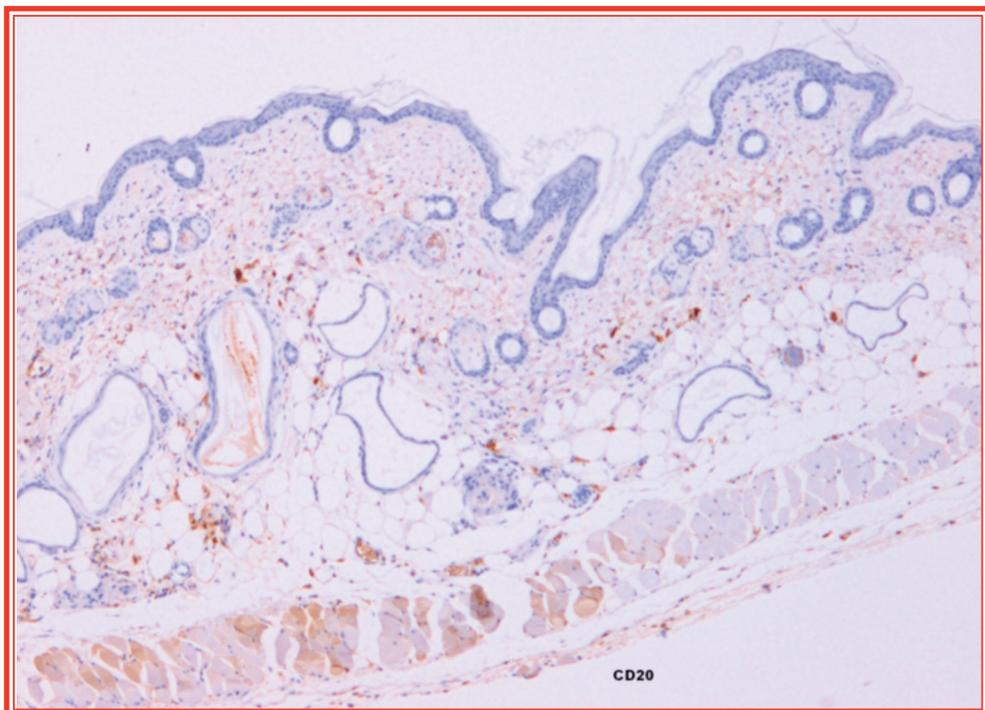


Figura 83.- Marcaje con CD20 en piel del grupo control.

Tabla 7: Resultados E. Inmunohistoquímico			
	CONTROL UV	UV + ASTAXANTINA	P-VALOR
PCNA	3,23±0,29	0,84±0,33	p<0,001
MMP-9	0,71±0,15	0,8±0,3	p>0,5
TIMP-1	2,96±0,47	0,51±0,5	p<0,001

VI

DISCUSIÓN

La piel, como los restantes órganos del organismo, sufre el proceso del **envejecimiento**, fenómeno biológico complejo que puede definirse como un declinar progresivo en la homeostasis, además de la incapacidad del organismo para responder al estrés. A este proceso se le ha denominado **envejecimiento intrínseco, fisiológico o cronológico**; pero, además, y a diferencia con los otros órganos, la piel puede sufrir el denominado **envejecimiento extrínseco, fotoenvejecimiento**, concepto establecido por Kligman en 1982, o **dermatoheliosis**, para describir los daños que ocurren en la piel tras la exposición solar crónica. En realidad, corresponde a la superposición de los daños cutáneos provocados por la exposición crónica a las radiaciones ultravioleta, que se suman a los cambios que sufre la piel con el transcurso del tiempo, y que representa un fenómeno patológico

puesto que es más precoz en su presentación y de mayor gravedad al estar íntimamente relacionado con el cáncer cutáneo.

Actualmente, el fotoenvejecimiento cutáneo supone uno de los procesos más frecuentes en patología humana, y el cáncer cutáneo la neoplasia maligna más frecuente (*Matsumara, 2002*), lo que es lógico si tenemos en cuenta que la piel es el órgano más extenso del cuerpo humano (alrededor de dos metros cuadrados) y tiene como función principal actuar como barrera de protección, tanto del medio interno, como frente a la atmósfera externa y muy especialmente a las radiaciones solares (*Avci, 2013*). Además, la prevalencia del cáncer cutáneo en las sociedades occidentales ha aumentado exponencialmente en los últimos años; así en Estados Unidos, en el año 2012, se diagnosticaron más de un millón de casos nuevos de cáncer cutáneo no melanoma y 53.000 melanomas (*Jemal, 2012; Siegel, 2012*).

Es, por tanto, uno de los motivos de consulta médica más frecuentes. Aunque su pronóstico es excelente tras la cirugía, excepto el melanoma, su manejo clínico y terapéutico representa la dedicación de un alto porcentaje del presupuesto sanitario en el mundo occidental (*Yaar, 2007; Jemal, 2012*), por lo que se ha convertido en un tema de enorme interés social y sanitario (muy especialmente en el campo de la dermatología), además de las importantes implicaciones económicas que comporta (*Kawada,*

2011). Por desgracia y en cierto modo, puede ser autoprovocado puesto que es debido a la exposición crónica al sol (Vicente,1999).

En este sentido, la historia parece demostrar el peligro que pueden entrañar algunos modelos de atractivo físico o belleza basados en el color de la piel, como lo demuestra el hecho de que durante los últimos 25 siglos, la piel blanca fue considerada universalmente como un componente esencial de la belleza humana entre la población del hemisferio norte. De este modo, en la Biblia se recogen numerosas referencias en este sentido, mientras que también de forma reiterada, la piel bronceada u oscura era considerada como indeseable, puesto que ocurría en personas de bajo nivel social que pasaban gran parte de su vida expuestas al sol y en los trabajos peor considerados.

Curiosamente, es solo a partir del primer tercio del siglo XX, cuando el bronceado cutáneo comienza a ser considerado como un nuevo factor cosmético y, por tanto, a ser relacionado con la belleza; de una parte, como consecuencia de los conocimientos de los efectos beneficiosos del sol sobre algunos procesos patológicos cutáneos, y por otra, al hecho de que la exposición al sol y la mayor libertad en el vestir, fueran consideradas como un derecho y como expresión de una mayor libertad individual, y por tanto algo socialmente deseable, lo que ha supuesto *un cambio total de estilo de vida* (Vicente, 1999).

No obstante, durante las últimas décadas, la exposición solar ha sufrido un aumento considerable, sobre todo la de tipo recreativo o intermitente, por lo que la **“dermatoheliosis”** se produce también en personas jóvenes que se exponen a la radiación solar sin protección, o a fuentes de luz ultravioleta artificial buscando un bronceado rápido (*Camacho, 2001*), por lo que durante los últimos años se ha ido generando de forma paulatina un nuevo cambio social, gracias al cúmulo progresivo de conocimientos en el sentido de que la exposición solar y por tanto el bronceado, pueden comportar un grave riesgo.

De todo lo anterior, se deduce el enorme interés que presenta el posible desarrollo de modelos experimentales de fotoenvejecimiento. Sin embargo, existen importantes problemas para su implantación en humanos, tanto de tipo metodológico, relacionados con la larga y lenta evolución del desarrollo de los tumores, como sobre todo de tipo ético. Razones que explican el frecuente desarrollo ocurrido durante las últimas décadas de modelos de fotoenvejecimiento en animales de laboratorio. El objetivo fundamental de los mismos ha estado dirigido al conocimiento íntimo de los mecanismos de producción y a la evolución de los cambios que tienen lugar en la piel tras la exposición prolongada a las radiaciones ultravioleta, así como a poder ensayar y determinar los posibles efectos beneficiosos de diversas sustancias como protectores solares (*Yaar, 2007*).

Aunque son numerosas las especies animales que se pueden utilizar como modelos animales en este tipo de estudios, en realidad han sido unas pocas las utilizadas: cerdos miniatura (*Kligman, 1982*), cobayas (*Kreuzmann, 1990*), ratas (*Nakamura, 1968*), ratones e incluso peces (*xiphophorus*, medaka y pez cebra) (*Kurita, 2004*). No obstante, los animales más utilizados corresponden a roedores, tanto con pelo como sin él, y especialmente a los ratones (*Becker, 2010*): C57BL/6J; BALB/C; CBA, (*Benavides, 2009*), Swiss, Hairless: HR-1, SKH1, etc. (*Sharma, 2011*).

Para la realización de nuestro estudio elegimos como modelo animal al ratón sin pelo **SKH1/CRL**, procedente del Skin and Cancer Hospital, Temple University. Philadelphia, 1986 (Charles River Laboratories. New York, USA), que fue aclimatado y criado posteriormente en el servicio de Animales de Laboratorio (SAL) de la Universidad de Murcia. Se considera como modelo de elección para este tipo de estudios, por ser animales albinos y sin pelo, presentando por tanto una piel muy sensible a los efectos de las radiaciones ultravioleta y un menor periodo de latencia de presentación de las lesiones, además de ser animales eutímicos, es decir inmunocompetentes y por su fácil manejo y bajo coste.

En el **primer objetivo** de nuestro trabajo nos planteamos inducir un modelo de fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis

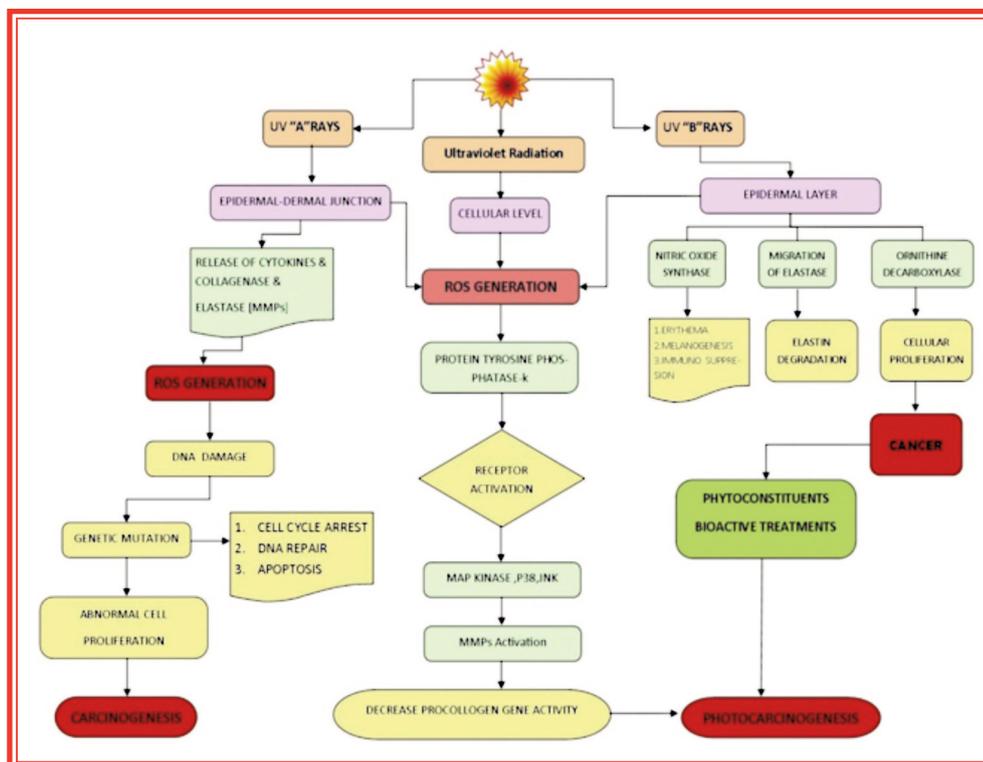
cutáneos en animales de esta cepa animal, para lo que nos basamos en los resultados obtenidos de los estudios previos de nuestro grupo de investigación (Cano, 2010; Gil Ortega, 2014). Para ello, utilizamos 60 ratones SKH1, hembras de cuatro semanas de edad, a las que expusimos a los efectos de una lámpara Philips Type HB 554/01/A, 100 W-R35, que emite un espectro de 220-425 nm y un pico máximo de 364 nm (98,6% UVA y 1,4% UVB).

La exposición se realizó colocando los animales en jaulas de PVC con separadores individuales para cada ratón y cubierta de celosía metálica, situándolas a una distancia foco/piel de 20 cm, durante sesenta minutos por sesión, tres veces a la semana durante ochenta sesiones, por ser este periodo cuando los tumores alcanzaron los criterios de punto final en el citado trabajo. En el grupo II, a los que se administró la Astaxantina, al no ocurrir neoplasias en la mayoría de los animales en esa fecha (80 sesiones), sometimos a diez de los animales a 33 sesiones más de las mismas características, hasta un total de 113. La energía absorbida por sesión fue de 21,1 J/cm², por lo que al final de las 80 sesiones, la energía total absorbida por cada animal fue de 1.688 J/cm² y de 2.384,3 J/cm² en el caso de los de las 113 sesiones.

En el transcurso del experimento, fuimos anotando y fotografiando todas las alteraciones cutáneas que presentaban los animales, que correspondían en general a las que han sido

descritas en humanos tras la exposición crónica a las radiaciones ultravioleta. De modo que en nuestro estudio, todos los animales del Grupo I (Control) que fueron sometidos exclusivamente a la exposición crónica a las radiaciones ultravioleta, presentaron a lo largo del experimento múltiples lesiones neoplásicas lo que no ocurrió en los animales del **grupo II** (RUV + Astaxantina) como comentaremos más adelante.

En la patogenia de estas lesiones, se han implicado varios mecanismos patológicos fundamentales como consecuencia de la acción de las radiaciones a su paso a través de los tejidos hasta llegar a la génesis del cáncer:



Nosotros los hemos agrupado en tres apartados fundamentales:

1.- La alteración del epitelio cutáneo que va a originar degradación del ácido araquidónico de las membranas celulares de los queratinocitos epidérmicos, lo que parece originar diversos productos que actúan como mediadores químicos de la inflamación (prostaglandinas, interleuquinas, cininas, citoquinas, etc.). Éstos, a su vez, 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, mientras que los monocitos y macrófagos tisulares fagocitan el tejido dañado. Por otra parte, las células inflamatorias segregan factores quimiotácticos y factores de crecimiento que promueven mayor reclutamiento de células inflamatorias y la reparación de los tejidos dañados (*Wilgus, 2003*).

2.- La formación de radicales libres o especies reactivas del oxígeno (ROS) que son responsables de la degradación de las proteínas dérmicas (colágeno, elastina, etc.), fundamentales en la producción de la elastosis solar o actínica, con la formación de arrugas cutáneas e incluso

de las lesiones del apartado siguiente, es decir, las mutaciones que pueden abocar en neoplasias (*Scharffetter-Kochanek, 2000; Halliday, 2005*).

3.- La absorción directa de la energía por cromóforos de la epidermis (ADN, ARN, melanina, el ácido urocánico, lípidos, proteínas) que va a dar lugar a la formación de fotoproductos, especialmente dímeros de pirimidina que absorben diferentes longitudes de onda específicas (*Young, 1997*). Éstas, al liberarse posteriormente, originarán reacciones fotoquímicas con producción de daño genético directo y mutaciones así como trastornos del crecimiento neoplásico cutáneo o fotocarcinogénesis, que generalmente son consecuencia de la acción de las longitudes de onda corta de la RUV B y A (*Brash, 1997; Young, 1998*).

También se puede producir daño oxidativo indirecto por efecto de reacciones de fotosensibilización endógena en relación con las longitudes de onda mayores de la RUV A (*Burren, 1998*). Este daño celular va a generar, a su vez, la liberación de diversos mediadores químicos de la inflamación con las acciones descritas en el apartado a), junto a la acción moduladora sobre otros tipos celulares como queratinocitos, células de Langerhans, fibroblastos, etc.

En nuestro estudio, las primeras alteraciones clínicas que se presentaron tras la radiación en los animales del **Grupo I Control** (RUV exclusivamente) correspondían a la presentación de eritema difuso en toda la zona del dorso de los animales, que ocurría desde la primera sesión y era de carácter pasajero, durante las 10-12 primeras sesiones, aunque posteriormente se hacía permanente y de color rojo violáceo presentando aspecto reticular o telangiectásico característico.

El **eritema**, consiste en la respuesta cutánea aguda más evidente y conocida tras la exposición a las radiaciones UV, está justificado por el primer mecanismo descrito en el apartado a) del esquema antes expuesto, consecuencia directa del daño vascular dérmico.

No obstante, el mecanismo interno no está bien establecido; no se conoce con precisión cuáles son los cromóforos responsables, pero la hipótesis del daño directo de los UVB y UVA de onda corta sobre el ADN se sumaría al daño oxidativo indirecto secundario a las reacciones endógenas de fotosensibilidad. Otros estudios también sugieren el papel importante que puede jugar el óxido nítrico como causa de la vasodilatación. Recientemente, se ha demostrado, que el óxido nítrico (NO) es producido por los queratinocitos después de la irradiación UVB (*Suscheck, 2006*).

Asímismo, también se ha demostrado el papel que los leucocitos polinucleares neutrófilos, fundamentalmente sus enzimas, desempeñan tras la exposición a la radiación ultravioleta, en el mantenimiento de la vasodilatación capilar (*Rijken, 2004, 2005; Samanek, 2006*). Además, tras la irradiación cutánea se produce liberación de mediadores químicos del eritema, como son los eicosanoides, la histamina y otros factores quimiotácticos, que regulan la expresión de las moléculas de adhesión en el endotelio vascular y en los queratinocitos, produciendo migración de las células sanguíneas, mononucleares y neutrófilos, encargados de causar vasodilatación e inflamación (*Rijken, 2009*).

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

Por otra parte, el aumento de los niveles cutáneos basales de histamina disminuye dentro de las primeras 24 horas, lo que indica la presencia de otros mediadores, como las prostaglandinas y el ácido araquidónico, que están elevados a las 6 horas y

alcanzan un pico máximo entre las 18 y 24 horas post-exposición a RUV, cuando la reacción se torna más intensa; los valores basales disminuyen en el término de 48 horas. Parecen existir otros mediadores con capacidad vasodilatadora que se han encontrado aumentados en estas situaciones, como la sustancia P, el óxido nítrico, interleucinas, etc. (*Clydesdale, 2001*).

También se ha demostrado que después de la irradiación UV, los inhibidores de las prostaglandinas, como la indometacina, reducen la intensidad de la fase inicial de eritema por RUVB hasta 24 horas; sin embargo, la fase más tardía, se mantiene sin cambios (*Ibbotson, 1996*). Asimismo, el ácido araquidónico y las prostaglandinas E₂ y F₂α muestran niveles elevados a las 6 horas de la exposición, alcanzando un pico máximo entre 18 y 24 horas, cuando la reacción inflamatoria está en su apogeo, y regresan a valores basales a las 48 horas, momento en el que el eritema ha disminuido parcialmente. Por otro lado, se ha comprobado la presencia en la piel irradiada de bradiquinina en las primeras fases de la inflamación (*Black, 1978*).

Además se ha descrito que tanto la UVA como la UVB producen cambios en la dermis, como consecuencia de la degranulación de las células cebadas que ocurre durante las primeras 24 horas tras la radiación, seguido por una rápida

recuperación hasta la normalidad. Además, se observa un infiltrado inflamatorio mixto, alrededor de los vasos superficiales, que aparece en horas y alcanza el máximo a las 24-48 horas (Natan, 2006). Otras citoquinas relacionadas con la vasodilatación y que han sido encontradas en la piel tras la irradiación con RUV son las interleuquinas (IL-1, 6, 8, 10, 12) y el factor de necrosis tumoral α , así como un aumento de las concentraciones de la sustancia P y de calcitonina (Berking, 2005).

Microscópicamente, los cambios más llamativos en esas áreas cutáneas en nuestro estudio, correspondían al aumento y dilatación de la red capilar, que mostraba frecuentes dilataciones y un aspecto tortuoso, así como aumento de la sustancia intercelular que originaban el ensanchamiento de la dermis papilar estos hechos creemos que explican el eritema que presentaban clínicamente los animales. Los infiltrados inflamatorios presentes en los animales de nuestro trabajo, estudiados mediante el marcaje inmunohistoquímico con anti-CD3 (linfocitos T) y anti-CD-20 (linfocitos B) fueron poco intensos y no observamos diferencias significativas entre los grupos.

En patología humana, las alteraciones cutáneas que se presentan tras el eritema corresponden fundamentalmente al aumento de la pigmentación melánica o bronceado, que suele ocurrir en dos etapas: una pigmentación inmediata y otra tardía.

La inmediata, se presenta pocos minutos después de la exposición y tiende a desaparecer en minutos; pero si continúa la exposición y es prolongada, puede durar varios días y se asocia al bronceado tardío. Parece depender de la acción de las longitudes de onda comprendidas entre los 320 y 450 nm, que corresponderían a RUV B de onda larga, RUV A y a la luz visible. Los cambios histológicos se deben a la oxidación de la melanina y a la migración de los melanosomas desde su localización perinuclear hasta las dendritas periféricas, y su transferencia hasta el citoplasma de los queratinocitos y otras células vecinas (*Hönigsmann, 2002*).

En los animales de nuestro estudio, sin embargo no pudimos observar el bronceado ya que son animales albinos en los que no funciona el sistema de la melanogénesis.

Otro efecto observado tras la irradiación correspondió al endurecimiento cutáneo, también denominado "hardening", que consiste en el engrosamiento de la capa córnea y del estrato de Malpighio (acantosis), que se suele acompañar de incremento de la melanina como respuesta a la acción eritematógena o pigmentaria de la RUV. Las exposiciones repetidas provocan un engrosamiento de la capa córnea en forma directa o indirectamente a través de una reacción inflamatoria.

Aunque clásicamente se había considerado que las exposiciones aisladas a RUV A no aumentaban el espesor de la epidermis, exposiciones repetidas y continuas pueden hacerlo, como hemos observado en nuestro estudio, en el que todas las zonas cutáneas expuestas a las radiaciones experimentaron hiperplasia de los queratinocitos, alcanzando gran espesor del epitelio en algunas zonas, sobre todo en los animales del Grupo I (Control UV). Este fenómeno representa un mecanismo de protección frente a las radiaciones UV. Observamos que a partir de 40-42 sesiones, toda la zona cutánea del dorso, mostraba engrosamiento irregular de aspecto granular difuso que se acompañaba con frecuencia de superficie escamosa y un marcado patrón geométrico de la piel.

Las siguientes alteraciones que observamos correspondieron a las arrugas cutáneas. Se presentaban a partir de 32-35 sesiones y en principio eran de disposición longitudinal, en todo el dorso de los animales que 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; además, en las zonas con lesiones neoplásicas, las arrugas se disponían de forma radial a los tumores.

En el estudio de la dermis de los animales de nuestro trabajo, destacaba microscópicamente en estas áreas, el

engrosamiento marcado, tanto de la papilar, por el aumento y la disposición tortuosa de los capilares sanguíneos y de la red capilar subpapilar, como de la reticular, así como la desestructuración del entramado fibrilar. También observamos con frecuencia áreas irregulares de fibrosis, con múltiples focos de infiltrados de linfocitos y células plasmáticas.

La mayor alteración de la piel en el fotoenvejecimiento, según la bibliografía, corresponde al depósito de material elástico anormal, que corresponde a la denominada elastosis solar. La radiación UV provoca en la dermis una reacción molecular en cadena, que origina un trastorno del metabolismo con aumento de metaloproteinasas de la matriz que estimulan la producción de colagenasa, gelatinasa y estromelisin-1 de los fibroblastos y queratinocitos. El resultado es una desorganización del colágeno y de la elastina, así como 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. 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).

Bernstein (1995) demostró con ratones, que la elastosis

solar está acompañada por un aumento de elastina y fibrilina ARNm y la regulación positiva de la actividad del promotor de la elastina. En las alteraciones microscópicas observadas en nuestro estudio, destacaban los fenómenos de desorganización de la estructura general así como la disposición del entramado de las fibras colágenas y elásticas, distinguiéndose tres grados de disposición: uno, en el que predominaban las fibras mal organizadas, dispuestas preferentemente de forma individualizada, que se conoce como elastosis solar grado I; otro, en el que las fibras con estas características alternaban con zonas en que se disponían en acúmulos irregulares y compactos de elastina, ligeramente basófilos o Grado II; y por último, en el que observamos un predominio marcado de los acúmulos compactos de elastina (Grado III).

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

El primer estudio encontrado en la bibliografía sobre la producción de elastosis en un ratón sin pelo (de la cepa albina Ng /) corresponde al de Berger en 1980. También hemos encontrado descrito en la bibliografía, entre los cambios inducidos por la radiación UV en la dermis de ratones SKH1, alteraciones de las fibras elásticas, la degradación del colágeno y glicosaminoglicanos, asociados con la alteración de la actividad de las metaloproteinasas de la matriz. De modo que los ratones expuestos de forma crónica a la radiación UV desarrollaban arrugas, como importantes pliegues longitudinales en el dorso.

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

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

La exposición repetida a la energía solar hace que los mecanismos de la reparación de la matriz dérmica, sean cada vez más deficientes, con un efecto acumulado sobre la estructura y organización de la base de colágeno. Lo que en principio son defectos invisibles en la matriz dérmica reparada, cuando se utilizan ciclos repetidos de exposición, se hacen visibles a simple vista en forma de flacidez de la piel y la formación de arrugas (*Kang, 2003*).

En este sentido, el estudio de Zheng (1993) compara las acciones de la radiación ultravioleta A con la B. Irradiaron ratones albinos sin pelo con luz ultravioleta, un grupo con R-UVA y otro con R-UVB. Los cambios más notables inducidos por R-UVA fueron la hiperplasia de las fibras elásticas sin evidencia de desintegración de las fibras, un gran aumento de microfibrillas depositadas al azar, la duplicación masiva de la membrana basal

vascular, un extenso daño celular endotelial, y las fibras de colágeno con diámetros más pequeños, pero sin daños aparentes.

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

Por otra parte, en nuestro estudio a partir de 45-50 sesiones era muy frecuente la observación de lesiones eritemato-escamosas, que se solían disponer en placas irregulares, con el centro de aspecto erosivo y los bordes sobreelevados y solían estar recubiertas por costras fibrino-hemorrágicas. A partir de 50 sesiones, toda la superficie cutánea del dorso mostraba áreas con engrosamiento cutáneo irregular de aspecto queratósico, firmes al tacto, e incluso con fijación a los tejidos subyacentes. Las lesiones ulceradas eran también muy frecuentes con bordes irregulares y engrosados.

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

A partir de 60 sesiones, eran constantes las lesiones tumorales nodulares, generalmente múltiples. La mayoría de ellas en relación con las zonas de engrosamiento queratósico y muchas estaban ulceradas. Con menos frecuencia las lesiones tumorales adoptaban un aspecto verrucoso con la porción central deprimida recubierta de costra queratósica. Microscópicamente correspondían a múltiples áreas de carcinoma "in situ", así como focos de carcinoma microinvasor o a carcinomas de células escamosas.

En los animales del grupo control, las lesiones epiteliales malignas eran muy frecuentes pues afectaban al 100% de los animales al final del experimento y al contrario que en la patología humana, en este modelo de carcinogénesis cutánea experimental, no se podía discriminar entre el carcinoma de células basales y el epidermoide o espinocelular. Como era lógico, tampoco se desarrollaron melanomas.

Todos los animales del Grupo Control desarrollaron carcinomas de células escamosas, lo que pone de manifiesto la efectividad del modelo experimental desarrollado en nuestro primer objetivo, que consideramos como un modelo idóneo para el estudio del fotoenvejecimiento cutáneo y la fotocarcinogénesis. Pues resulta fácilmente reproducible y de bajo coste, en el que la exposición crónica a las radiaciones provoca el espectro de lesiones propias del fotoenvejecimiento en periodos diferenciados y siempre ocasiona el cáncer cutáneo si la exposición es prolongada (entre 65 y 80 sesiones).

El mecanismo implicado en estos fenómenos, se ha explicado porque la radiación UV actúa indirectamente-el proceso de reparación del ADN y por la interferencia con componentes del sistema inmune (específicamente células T y las células de Langerhans) (*Gilchrest, 1996*). También, más recientemente se ha demostrado que la radiación UV puede actuar alterando el mecanismo de apoptosis en las células expuestas al sol, con lo que podrían promover el desarrollo de neoplasias. En este aspecto, la radiación UV se puede considerar como un carcinógeno completo, ya que puede actuar, tanto como iniciador del cáncer a través de mutación del AND, como promotor del crecimiento neoplásico a través de los procesos inflamatorios secundarios a la exposición a la RUV acumulativa (*Ismail, 2011*). La Agencia de Investigación del cáncer de la OMS, incluyó a las

radiaciones ultravioletas en el grupo 1 de agentes carcinógenos (*Landrigan, 2011*).

Casi todas las mutaciones originadas experimentalmente por RUV B y A se localizan en las pirimidinas adyacentes, y alrededor de dos tercios son mutaciones distintivas (*Brash, 1991*). El tercio restante también son generadas por las radiaciones ultravioleta, pero probablemente surjan a partir de la producción de ROS (*Wondrak, 2001*). Dado que existen diversos carcinógenos que generan esta lesión oxidativa, es difícil conocer si la fuente de las mutaciones fue la RUV B, la A, o la fosforilación oxidativa intracelular. La RUV-A, induce levemente la aparición de mutaciones distintivas por RUV-B a través de la fotosensibilización, pero genera mutaciones similares a las oxidativas en intercambios T→G. Estos intercambios se observan raramente con las UVB u otros carcinógenos, por lo que se considera que sean consecuencia de la RUV A (*Halliday, 2005*).

Está demostrado que la RUVB induce la síntesis de la enzima ornitín-decarboxilasa, que limita la tasa de síntesis de poliaminas que estimulan la proliferación celular. Ello facilita la formación de neoplasias, a lo que se suma a la síntesis de óxido nítrico, que a su vez, induce la producción de eritema, melanogénesis e inmunosupresión lo que favorece la carcinogénesis. Por último, también favorece la angiogénesis dérmica, al disminuir la expresión de los

inhibidores de trombospondina-1 y además, la expresión de dos factores angiogénicos, como el VEGF y el factor de crecimiento endotelial dependiente de plaquetas (Afaq, 2006).

La R-UVA es extremadamente cancerígena, pues penetra más profundamente en el interior de los tejidos cutáneos, causando degradación de la dermis. Esta degradación tiene lugar por la activación de citoquinas y enzimas colagenasas, elastasas, etc. Dichas enzimas aceleran aún más la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que provocan daños en el ADN (de Grujil, 1993; 2000; 2002). Además se ha descrito que puede dar lugar a alteraciones genómicas, que varían desde mutaciones puntuales a dislocaciones cromosómicas. Por otro lado, la R-UVB interactúa con la epidermis, causando la activación de las enzimas que alteran el ADN, lo que conduce a patologías como la inflamación, la degradación de la elastina, la proliferación celular, etc. Es más cancerígena que la radiación UVA en la inducción experimental de carcinoma de células escamosas (SCC). El impacto de la radiación UVB puede deducirse claramente de las mutaciones puntuales características de p53 se encuentran en SCC humano y BCC.

A nivel celular, el efecto combinado de la R-UVA y R-UVB conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno que activan directamente las MMPs, desencadenando reacciones en cascada múltiple que llevan a la transcripción de genes proinfla-

matorios y proapoptóticos. Todo ello conduce a la inflamación, la apoptosis y, finalmente, a la fotocarcinogénesis (*Gupta, 2014*).

Como **segundo objetivo** de nuestro trabajo, nos planteamos conocer los efectos de la **astaxantina**, un potente antioxidante de origen natural, que administramos por vía oral al segundo grupo de animales, a los que sometimos al mismo número de sesiones y dosis de radiaciones ultravioleta, que a los animales del grupo control, con el fin de comprobar su posible papel como agente fotoprotector.

En este sentido, parece que desde muy antiguo la humanidad ha intentado cuidar su piel, y así, la cosmética en los pueblos primitivos tenía un carácter religioso o mágico; precisamente los primeros remedios cosméticos parecen proceder de las dinastías egipcias, que además los asociaban a la medicina, como los ungüentos, aceites, tabletas de arcilla e incluso fórmulas para las arrugas; este hecho alcanzó un gran auge en Grecia y Roma, desarrollándose un auténtico ritual de cuidados pues se perfumaban habitualmente, incorporaron de forma habitual el baño y los masajes, y utilizaban gran cantidad de cosméticos para embellecerse y evitar la desecación cutánea, lo que indica la importancia que siempre ha tenido el mantenimiento de la piel en el canon de belleza a lo largo de la Historia (*Abad,1999*).

Pero de forma curiosa, como hemos comentado al principio de este apartado, esto se mantuvo hasta el primer tercio del siglo

XX, en el que ocurrió un cambio radical respecto a la belleza entre la población occidental, comenzando a ser considerado el bronceado de la piel como un factor estético y por tanto a relacionarse con la belleza (Vicente, 1999).

Sin embargo, con los beneficios del Sol también se conocieron rápidamente sus inconvenientes (Müller, 1997). Por lo que pronto comenzaron a desarrollar métodos para protegerse. Los egipcios se protegían del Sol con un cucurucho colocado sobre la cabeza que contenía sebo y mirra y que, al fundirse por el calor, se derramaba protegiendo la piel. Así, existe una larga lista de remedios frente a las quemaduras solares, basadas en aceites, sebo, mirra, heliotropo, vinagre, etc., que constituirían los primeros filtros solares (Abad, 1999). Por otro lado, durante las últimas décadas, la exposición solar ha sufrido un aumento considerable, sobre todo la de tipo intermitente o recreativo que explica en gran parte el aumento descrito de la incidencia del cáncer cutáneo.

De ahí, el enorme interés de la **fotoprotección** para prevenir los efectos adversos de la exposición crónica al sol así como retrasar las alteraciones del fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis cutáneos. Los filtros solares, de los que existen diferentes tipos según su mecanismo de acción (Montero, 2008), son considerados como la primera línea de defensa frente a las

RUV y actualmente se consideran fundamentalmente: los **orgánicos** que corresponden a los conocidos hasta ahora como químicos, los **inorgánicos**, llamados previamente, físicos y los **biológicos**, que corresponden a sustancias que penetran la superficie cutánea y tienen actividad antioxidante por lo que aplicados tópicamente, disminuyen el estrés oxidativo inducido por la radiación ultravioleta. No obstante su eficacia exacta es todavía desconocida. Además, existen estudios que sugieren que podría obtenerse un beneficio acumulativo o aditivo, cuando se utilizan combinaciones de productos antioxidantes, por vía oral o tópica (Alleman, a, b, c, 2009).

La aplicación tópica de antioxidantes parece un mecanismo fotoprotector prometedor, sin embargo, los ensayos clínicos controlados en humanos sobre el papel de los antioxidantes en la prevención o desaceleración del envejecimiento cutáneo son escasos, por lo que es necesario un mayor número de estudios experimentales. En este sentido, destacan los estudios sobre el efecto antienvjecimiento de extractos de isoflavonas de soja por vía oral en ratones (Kim, 2004) y de los beneficios de los antioxidantes aplicados tópicamente (Alleman, 2009).

En nuestro estudio, hemos utilizado la **ASTAXANTINA**, un agente antioxidante de origen natural perteneciente a la serie fotoquímica de los terpenos. Como muchos carotenoides, es un

pigmento liposoluble coloreado, producido por diversos tipos de **microalgas** que son la base de la alimentación del zooplancton y el krill, se puede encontrar en levaduras y también en los organismos que se alimentan de ellos, por lo que se puede ir acumulando en cierta medida a lo largo de la cadena alimentaria, en especial en los pescados de carne rosada como el salmon, trucha, crustáceos, (*Pandanus borealis*, Krill), camarones, cangrejos (Ranga Rao, 2014). Nosotros, en este trabajo la hemos administrado por vía oral, puesto que la administración por vía tópica presenta problemas de absorción a nivel cutáneo, según ha descrito Hama recientemente (2012).

Entre las funciones biológicas de la **Astaxantina** destaca su alto poder antioxidante (10 veces más potente que otros carotenoides en relación con la captación de radicales libres (Naguib, 2000). En este sentido se ha descrito su capacidad de proteger las membranas celulares y mitocondriales de las agresiones medioambientales, en especial de las radiaciones ultravioleta, evitando la peroxidación de los lípidos de las membranas (RangaRao, 2013) así como sus efectos sobre algunos inhibidores de la inflamación tanto “in Vitro” como “in vivo” (Ohgami, 2003; Park, 2010; Santos, 2012); junto a sus potentes efectos frente al estrés oxidativo en la diabetes (Kim, 2009; Otton, 2010); en la prevención de los trastornos cardiovasculares (Nakao, 2010 b; Fassett, 2011), arterioesclerosis (Ryu, 2012) e hipertensión arterial

(Monroy-Ruiz, 2011) e incluso en el cáncer, tanto en relación con los trastornos de la inmunidad (Chew,2004) como de los efectos del estrés oxidativo sobre el mecanismo de la carcinogénesis (Jyonouchi,2000; Nakao,2010 a; Maoka,2012; Sila,2013).

Aunque hemos encontrado numerosos estudios en la bibliografía sobre los efectos antioxidantes de la astaxantina en distintas patologías, algunos relacionados con los mecanismos implicados en el proceso de envejecimiento como comentamos en el párrafo anterior; no obstante, son escasos los trabajos publicados relacionados con el fotoenvejecimiento tanto “in Vitro”(Lyons, 2002) como “in Vivo” (Hussein, 2006; Watanabe, 2007; Hama, 2012; Huangfu, 2013). Solamente hemos encontrado un trabajo sobre los efectos de la astaxantina en el modelo de fotoenvejecimiento desarrollado en nuestro estudio (Savouré, 1995). Estos autores observaron una inhibición de la carcinogénesis sobre ratones SKH-1 sometidos a radiación ultravioleta A y B y tratados con astaxantina, frente a los animales control y a otros carotenoides. Explicaron su mecanismo de acción por un aumento de la actividad ornitina descarboxilasa.

En nuestro estudio, en los animales del GRUPO II (RUV +Astaxantina) las lesiones cutáneas evolucionaron de forma similar a las del Grupo I (Control), aunque con mayor lentitud, de

modo que se hacían patentes entre 5 y hasta 15 sesiones (es decir 2 y 5 semanas) más tarde que en los del Grupo I. Asimismo, alcanzaban diámetros menores y afectaban a áreas cutáneas menos extensas.

Así, el **eritema**, que corresponde a la primera alteración en presentarse clínicamente, aunque lo hacía también desde las primeras sesiones, solo se hacía permanente y de color rojo-violáceo con aspecto reticulado a partir de la 30-35 sesiones, el doble de tiempo que en los animales del Grupo Control; algo similar ocurría con la presencia del marcado patrón geométrico de la piel, que se manifestaba alrededor de 10 sesiones después, y con las arrugas (entre 12 y 15 sesiones después); el engrosamiento cutáneo-lesiones de tipo queratósico (10-12 sesiones después); las lesiones escamosas-erosivas, (10-11 sesiones después). Las lesiones ulceradas no eran patentes antes de las 70 sesiones. No obstante, las mayores diferencias respecto a las lesiones de los animales controles, correspondían a las **lesiones tumorales** puesto que solo las presentaron 10 **animales** del grupo tratado con Astaxantina. Tras **80 sesiones** solo presentaban tumores **2 animales**; y de los 10 que recibieron **113 sesiones**, los tumores se presentaron en **6 animales** a partir de la sesión 100 y en **2** tras la 113.

Observamos una marcada disminución de las áreas de lesión en los animales tratados con astaxantina respecto al control, que fue estadísticamente significativa. De modo que había una diferencia de 141,63 milímetros cuadrados en la media de las lesiones de ambos grupos. Además, la presentación de dichas lesiones se produjo de forma más tardía en los animales tratados.

Microscópicamente, destacaba en los animales de este grupo la menor incidencia de las lesiones precancerosas, de modo que mientras la incidencia de las áreas de **displasia** era del **100%** en los animales del Grupo **Control**, ésta bajaba al **60%** en los del Grupo II (**Astaxantina**) sacrificados tras la **sesión 80**, y al **80%** en los de la **113 sesión**. De modo similar también lo observamos respecto al **carcinoma "in situ"** con un **25%** (80 sesiones) y **75%** (113 sesiones) respectivamente.

No obstante, las mayores diferencias ocurrieron respecto a las **neoplasias malignas**, como hemos comentado anteriormente que solo afectaron a **10 animales** de este Grupo (33%). Todas las neoplasias correspondían a carcinomas de células escamosas, en los que no podíamos distinguir entre los carcinomas basocelulares y los espinocelulares, ya que todos mostraban queratinización celular y casi todos formaban globos córneos, incluso los que mostraban aspecto clínico de quera-

toacantomas. Como era de esperar no presentaron melanomas puesto que son animales albinos.

Actualmente para la determinación del pronóstico de los tumores, además de las características microscópicas en la que se basan las distintas clasificaciones tumorales, se suele acompañar de la información acerca de la cinética celular (*Almendral, 1987; García, 1989*), con el fin de poder determinar con mayor exactitud la tasa del recambio celular entre los tejidos normales y los tumorales, así como para poder conocer más detalladamente su comportamiento biológico, para ello contamos con distintos métodos de estudio para la evaluación de la proliferación celular (*Carey, 1992*).

Durante mucho tiempo, los estudios de proliferación celular estuvieron dedicados exclusivamente al estudio de la división celular, mediante el recuento de las mitosis. Sin embargo, en los últimos años se han ido desarrollando técnicas inmunohistoquímicas, no sólo para detectar los precursores de la síntesis de ADN incorporados por la células en la fase S, sino para detectar antígenos nucleares. Estos antígenos se engloban bajo el término genérico de antígenos nucleares de proliferación celular (PCNAs), debido a que constituyen estructuras antigénicas que no se pueden observar en las células en reposo. El estudio de estos antígenos se ha desarrollado fundamen-

talmente en el campo de la oncología, pues su expresión es diferente en células normales y en las transformadas (*Busch, 1977; Davies, 1978; Smetana, 1983*).

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína ácida nuclear no histona, molécula de 36-KDa con 261 aminoácidos con alto contenido glutámico y aspartato (*Almendral, 1987*) que funciona como molécula accesoria de la ADN polimerasa y que se requiere en el proceso de la síntesis del ADN en la fase S del ciclo celular. Esta proteína fue descubierta en 1978 mediante el estudio de anticuerpos en pacientes con lupus eritematoso (*Miyachi, 1978*) y funciona como adyuvante de la síntesis de DNA (*Bravo, 1987;1992*). 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. 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 (*Kelman,1997; Ben-Ihzak, 2002*).

El gen que codifica PCNA ha sido clonado en diversas especies y su conversión y evolución en el reino animal y vegetal, sugieren que este antígeno puede desempeñar un papel fundamental en la replicación del DNA en eucariotas, siendo su

presencia necesaria aunque no suficiente para el proceso de proliferación celular (*Mac Cormick, 1992*). El PCNA también está implicado en la escisión-reparación de nucleótidos al comprobarse la asociación de éste con la cromatina en todas las fases del ciclo celular tras irradiación con luz ultravioleta "in vitro" (*Toschi, 1988*).

Por lo que 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*). En nuestro estudio, observamos una mayor expresión de PCNA en los tumores desarrollados por los animales del grupo control que en los del grupo tratado, con diferencias estadísticamente significativas. Por tanto, los tumores del grupo control, tuvieron un índice de proliferación celular más elevado, que en tumores de piel no melanoma, se asocia con mayor agresividad y peor pronóstico (*Ruksha, 2007*). Es decir, que el tratamiento con astaxantina, además de inhibir el proceso de fotocarcinogénesis en los animales de nuestro modelo, ha provocado que los tumores desarrollados en el grupo tratado sean menos agresivos que los del control.

Asímismo, en el proceso patológico del fotoenvejecimiento cutáneo, se le otorga una gran trascendencia a las alteraciones

que ocurren a nivel de la dermis, es decir a la elastosis solar o actínica. En ellas se han implicado la actuación de unas enzimas, las metaloproteinasas cuyas funciones y papel en la progresión del cáncer han sido estudiadas con gran interés en los últimos años. Asimismo, se ha investigado su papel como iniciadores de la angiogénesis, en la inflamación, en distintos aspectos patológicos asociados a la carcinogénesis y en relación con la producción de metástasis. También se ha descrito el papel que podría desempeñar la inhibición de algunas MMPs en la disminución del crecimiento tumoral y por tanto como arma terapéutica en la lucha contra el cáncer por lo que desde hace más de treinta años se han dedicado grandes esfuerzos a la investigación en este campo (Cripta, 2014).

También algunos estudios clínicos han señalado aspectos prometedores respecto a la expresión de inhibidores de MMP, aunque con resultados muy limitados. En este sentido, la utilización de agentes de origen natural como drogas frente a MMP para evitar la proliferación del cáncer cutáneo no melanoma provocado por la exposición crónica a las radiaciones solares ha supuesto una innovación en el tratamiento farmacológico clásico de esta enfermedad. La degradación de la matriz extracelular (MEC) se produce por la actividad de diversas enzimas proteolíticas (proteasas), conocidas como metaloproteinasas (MMPs). La gran familia de las MMPs puede dividirse en 8 clases

atendiendo a su estructura. La característica común a todas ellas es la presencia de un pre-dominio N-terminal al que sigue un pro-dominio que guarda una fuerte asociación con el zinc y el calcio y otros dominios catalíticos. Otro aspecto común en la estructura de las MMPs es el dominio para el enlace de colágeno, implicado en la unión al colágeno, elastina, ácidos grasos, etc. Por otra parte, además de en los mecanismos de progresión del cáncer, las MMPs están relacionadas con un gran número de aspectos patológicos (*Fisher, 1998; 2002; 2008*).

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

Considerando el papel de la ruptura de la membrana basal en la progresión tumoral y en el proceso de metástasis, la

actividad de la MMP-9 ha sido estudiada en diferentes tipos de cáncer. Aunque teóricamente, la degradación de la matriz extracelular es más intensa en tumores de mayor evolución y tamaño, en nuestro estudio, la inmunotinción con MMP-9 fue menos intensa en el grupo control que en el grupo tratado, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Este hecho coincide con los resultados obtenidos por Poswar (2013), en el que se estudiaron 47 piezas quirúrgicas de carcinomas espino celulares humanos de diferente grado de malignidad. Estos autores encontraron una mayor positividad de MMP-9 para los carcinomas microinvasores que en aquellos que invadían en profundidad. Por tanto, concluyeron que la actividad proteolítica de la MMP-9 se da sobre todo en estadios iniciales de la carcinogénesis y que después decrece (Poswar, 2013).

Existen inhibidores naturales y sintéticos de las MMPs, llamados TIMP, como algunos derivados de tetraciclinas o el Marimastat, que se encuentran en la actualidad en ensayos clínicos de fase III. Los TIMP endógenos son proteínas que se secretan en respuesta a una sobreproducción de MMPs. TIMP-1 es más potente que TIMP-2 y TIMP-3 frente a MMP-1, MMP-3 y MMP-9. En este sentido, algunas sustancias naturales como la melatonina o la escualamina del cartílago de tiburón (Novastat®) han demostrado capacidad para inhibir la expresión de MMPs (especialmente la 2 y la 9) y favorecer la actividad de los TIMP en

diversos tipos de cáncer (mama, estómago, vesícula o pulmón). Otros compuestos estudiados con resultados relevantes son la Nobiletina, Myricetina, Curcumina, Resveratrol, Xanthamizol, Anticianidinas o Aloe Vera (Gupta, 2014).

Teniendo en cuenta su papel como inhibidores de las MMPs, los TIMPs son considerados como elementos anti-invasivos y anti-metastásicos en el cáncer. Por este motivo, decidimos realizar el marcaje inmunohistoquímico de TIMP-1 en los tumores desarrollados en los animales de nuestro estudio, donde observamos un marcaje más intenso en los animales tratados que en el control, con diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados sugieren que la inhibición de la carcinogénesis y de la progresión tumoral experimentada por los animales tratados con astaxantina, podría deberse a la estimulación, por parte de ésta, de la producción de TIMP en el estroma tumoral.

Los resultados descritos en los animales tratados con Astaxantina (Grupo II), demuestran un marcado retraso en la presentación de las lesiones características del fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis cutáneos, con una disminución significativa (66%) de los cánceres cutáneos respecto a los del Grupo I (Control), que demuestran el potente efecto Antioxidante de este carotenoide y por tanto su eficacia como agente fotoprotector.

WIN

RESUMEN

El fotoenvejecimiento es un tema de enorme interés socio-sanitario (*Kawada, 2011*) al ser un proceso patológico común. Su manejo clínico y terapéutico implica un alto presupuesto sanitario (*Yaar, 2007; Jemal, 2011; Siegel, 2012*). Los países desarrollados invierten sumas millonarias en la investigación de sustancias que eviten o retrasen sus efectos (*Gil Ortega, 2014*). De ahí el interés del desarrollo de modelos experimentales para su estudio, así como el de nuevas medidas de fotoprotección.

El primer objetivo de nuestro trabajo correspondió al establecimiento de un modelo de fotoenvejecimiento cutáneo en ratones SKH-1 mediante exposición crónica a RUV; el segundo fue evaluar los posibles efectos protectores de la Astaxantina.

Utilizamos 60 ratones SKH1/CRL, expuestos a RUV (98,6% UVA y 1,4% UVB) / 60 minutos / sesión / 3 veces a la semana / 80 sesiones, con un total de 1.688 J/cm² por animal. Los ratones se dividieron en dos grupos (N= 30): El Control sólo recibió RUV y el segundo, RUV más Astaxantina / oral / 0,05 mg / animal / día.

Dado que en la mayoría de los animales de este grupo no se originaron lesiones neoplásicas al final del experimento (80 sesiones), seguimos aplicando hasta un total de 113 sesiones (2.384,3 J/cm²) a 10 ratones,.

Los animales expuestos exclusivamente a RUV Grupo Control presentaron las alteraciones características descritas en el fotoenvejecimiento (100% de carcinomas escamosos), por lo que lo consideramos un modelo experimental idóneo para el estudio de estas patologías.

No obstante, encontramos diferencias entre las lesiones de los animales tratados con Astaxantina, respecto a las del Control: el eritema se hacía fijo con aspecto reticulado, 15-16 sesiones mas tarde que en el Control; la presentación del marcado patrón geométrico de la piel (8-10 sesiones); arrugas (15-16 sesiones); engrosamiento cutáneo-lesiones queratósicas (10-12 sesiones) y de las lesiones eritemato-erosivas (5-6 sesiones).

Las diferencias más destacables fueron en las lesiones tumorales, ya que solo las presentaron 10 animales del grupo tratado. De los 20 que recibieron 80 sesiones, solo 2 presentaron tumores; y de los 10 que recibieron 113 sesiones, se presentaron solo en 6 a partir de la sesión 100 y en 2 tras la 113. Todas las neoplasias correspondían a carcinomas de células escamosas.

Microscópicamente, también encontramos diferencias en las lesiones precancerosas: la displasia en: el 60% de los animales tras la sesión 80 y en el 80% tras la 113; el carcinoma "in situ" en el 25% y el 75% respectivamente, mientras que en los animales del grupo Control se observaban ambos en el 100% de los animales.

En el estudio inmunohistoquímico, constatamos un incremento significativo de la tasa de proliferación celular en los tumores del grupo control respecto a los tratados. La expresión de MMP-9 resultó más alta en los tumores de los animales tratados que en los del control. Sin embargo, el inhibidor de metaloproteinasas TIMP-1, se expresó de forma más intensa en el estroma de los tumores de los animales tratados que en los controles, sugiriendo que el tratamiento con astaxantina podría inhibir la progresión tumoral, mediante la inducción de la síntesis de inhibidores de metaloproteinasas en el estroma tumoral.

WMI

CONCLUSIONES

- 1.- La exposición crónica a la RUV durante más de 60 sesiones originó en todos los animales del Grupo Control, el espectro lesional característico del fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis cutáneos, con el 100% de incidencia de neoplasias malignas.
- 2.- En el grupo II (Astaxantina) ocurrió un retraso en la presentación de las lesiones (5-15 sesiones), con disminución significativa de las premalignas (displasia: 60% tras la 80 sesión y 80% tras la 113; carcinoma "in situ", 25% y 75% respectivamente) así como de las malignas (66%) afectando solo a 2 animales (80 sesiones), a 6 (100 sesiones) y a 2 (113 sesiones).

3.- El estudio inmunohistoquímico relacionó la inhibición de la progresión tumoral en los tumores de los animales tratados con Astaxantina con:

- el aumento en la expresión del inhibidor de metaloproteinasas TIMP-1 y
- la disminución de la tasa de proliferación celular evaluada con PCNA.

XI

BIBLIOGRAFÍA

Abad Martínez, L.: *Discurso de contestación a la recepción pública del Ilmo. Sr. Dr. D. Vicente Vicente Ortega en la Real Academia de Medicina y Cirugía de Murcia.* 1999. Editorial Nogué.

Afaq, F.; Mukhtar, H.: *Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging.* *Exp Dermatol.* 2006;15(9), 678-684.

Ahmad, Z.: *The uses and properties of almond oil.* *Complementary Therapies in Clinical Practice.* 2010;16(1), 10-12.

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

Allemann, I. B.; Baumann, L.: *Botanicals in skin care products.* *Int J Dermatol.* 2009; 48(9), 923-934.

Allemann, I. B.; Baumann, L.: *Educación Médica Continua. Dermatología*, 8. Rev. Chilena Dermatol. 2009; 25(1):8-20.

Almendral, J. M.; Huebsch, D.; Blundell, P. A.; Macdonald-Bravo, H.; Bravo, R.: *Cloning and sequence of the human nuclear protein cyclin: homology with DNA-binding proteins.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Proceed. 1987; 84(6), 1575-1579.

Amano, S.: *Possible involvement of basement membrane damage in skin photoaging.* In Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings. Nature Publishing Group. 2009, August; Vol. 14, No. 1, pp. 2-7.

Ananthaswamy, H.N.; Fourtanier, A.; Evans, R.L.; Tison, S., Medaisko, C.; Ullrich, S.E., Kripke, M.L. *p53 mutations in hairless SKH-hr1 mouse skin tumors induced by a solar simulator.* Photochem Photobiol. 1998; 67: 227-32.

Avci, P.; Sadasivam, M; Gupta, A.; De Melo, W.; Huang, Y.; Yin, R.; Rakkiyappan, C.; Kumar, R.; Otufowora, A; Nyame, T.; Hamblin, M.: *Animal models of skin disease for drug discover.* Expert Opin. Drug Discovery. 2013; 1746, 0441, 1-25.

Becker, J. C.; Houben, R.; Schrama, D. et al.: *Mouse Models for melanoma: a personal perspective.* Exp Dermatol. 2010; 19 (2): 157-64.

Benavides, F.; Oberyszyn, T. M.; VanBuskirk, A. M.; Reeve, V. E.; Kusewitt, D. F.: *The hairless mouse in skin research.* J Dermatol Sci. 2009; 53(1), 10-18.

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

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

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

Bernstein, E. F.; Chen, Y. Q.; Tamai, K.; Shepley, K. J.; Resnik, K. S.; Zhang, H. et al.: Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photo-damaged skin. J Invest Dermatol. 1994; 103:182-6.

Bernstein, E. F.; Brown, D. B.; Urbach, F.; Forbes, D.; Del Monaco, M.; Wu, M.; Uitto, J.: *Ultraviolet radiation activates the human elastin promoter in transgenic mice: a novel in vivo and in vitro*

model of cutaneous photoaging. J Invest Dermatol. 1995; 105(2), 269-273.

Black, A. K.; Greaves, M. W.; Hensby, C. N.; Plummer, N. A.; Warin, A. P.: *The effects of indomethacin on arachidonic acid and prostaglandins e2 and f2alpha levels in human skin 24 h after uvB and uvC irradiation. Br J Clin Pharmacol. 1978; 6(3), 261-266.*

Brash, D. E.; Rudolph, J. A.; Simon, J. A.; Lin, A.; McKenna, G. J.; Baden, H. P.; Ponten, J.: *A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Proceed. 1991; 88(22), 10124-10128.*

Bravo, R.; Frank, R.; Blundell, P. A.; Macdonald-Bravo, H.: *Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- α . Nature. 1987; 326: 515-517.*

Bravo, R.; MacDonal-Bravo, H.: *Existence of two populations of Cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: associated with DNA replication sites. J. Cell. Biol. 1992. 105: 1549-1554.*

Borrego Hernando, L.: *Problema clínico. Rev. Jano 14-20. Marzo 2008 n° 1685. 34-38.*

Brash, D. E.: *Sunlight and the onset of skin cancer. Trends in genetics. 1997; 13(10), 410-414.*

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

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

Camacho, F.: *Antiguos y nuevos aspectos de la fotoprotección.* Rev Int Dermatol Dermocosm Clin. 2001; 4(7), 441-8.

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

Carey, F. A., Fabbroni, G., Lamb, D.: *Expression of proliferating cell nuclear antigen in lung cancer: a systematic study and correlation with DNA ploidy.* Histopathology. 1992; 20(6), 499-504.

Castelo-Branco, C.: *Envejecimiento de la piel y las mucosas: fundamentos clínicos y enfoque integral.* Ed. Médica Panamericana, 2010.

Chew B.P., Park J.S. Carotenoid action on the immune response. J. Nutr. 2004;134:257S-261S.

Chew W., Mathison B.D., Kimble L.L., Mixter P.F., Chew B.P. As-taxanthin decreases inflammatory biomarkers associated with cardiovascular disease in human umbilical vein endothelial cells. *Am. J. Adv. Food Sci. Technol.* 2013;1:1-17.

Choe, T.; Lee, B.; Park, I.: *Inhibition of matrix metalloproteinase-1 and-2 expression using nitric oxide synthase inhibitors in UV-irradiated.* *J. Cosmet. Scio*, 54, 229-238.(2003).

Christiano, A. M., & Uitto, J. (1994). Molecular pathology of the elastic fibers. *The Journal of Investigative Dermatology*, 103(5), 53-57.

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

Clydesdale, G. J.; Dandie, G. W.; Muller, H. K.: *Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects.* *Immunol Cell Biol.* 2001; 79(6), 547-568.

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

de Gruijl, F. R.; Sterenborg, H. J.; Forbes, P. D.; Davies, R. E.; Cole,

C.; Kelfkens, G.; van der Leun, J. C.: *Wavelength dependence of skin cancer induction by ultraviolet irradiation of albino hairless mice.* *Cancer Res.* 1993; 53(1), 53-60.

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

de Gruijl, F. R.: *Photocarcinogenesis: UVA vs UVB radiation.* *Skin Pharmacol Physiol.* 2002; 15(5), 316-320.

EFSA (European Food Safety Authority) Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on the request from the European commission on the safety of use of colouring agents in animal human nutrition. *EFSA J.* 2005;291:1-40.

EFSA (European Food Safety Authority) Safety and efficacy of panaferd-AX (red carotenoid rich bacterium *Paracoccus carotinifaciens* as feed additive for salmon and trout. *EFSA J.* 2007;546:1-30.

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

Fassett R.G., Combes J.S. Astaxanthin: A potential therapeutic agent in cardiovascular disease. *Mar. Drugs.* 2011;9:447-465.

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

Fisher, G.J.; Voorhees, J.J.: *Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce Ap-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo.* In: J Investig Dermatol Symp Proc. 1998, August; Vol. 3, 1, 61-68. Nature Publishing Group.

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

Fitzpatrick TB, Pathak MA, Jimbow K. Role light in human skin color variation. Am J Phys Anthropol. 1975 Nov;43(3):393-408

Gal A.F., Andrei S., Cernea C., Taulescu M., Catoi C. Effects of as-taxanthin supplementation on chemically induced tumorigenesis in Wistar rats. Acta Vet. Scand. 2012;54:1-6.

Garcia, R. L.; Coltrera, M. D.; Gown, A. M.: *Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in*

fixed, embedded tissues. Comparison with flow cytometric analysis. Am J Pathol. 1989; 134(4), 733.

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

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

Gil-Ortega, A. Efectos del extracto de crisálida de la seda sobre el fotoenvejecimiento cutáneo inducido por RUV en ratones SKH1/CRL. 2014. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

Glogau, R. G. (1997). Physiologic and Structural changes associated with aging Skin. *Dermatol Clin*, 15(4).

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

Gupta, A.; Kaur, C. D.; Jangdey, M.; Saraf, S: *Matrix metalloproteinase enzymes and their naturally derived inhibitors: Novel targets in photocarcinoma therapy.* *Ageing Res Rev.* 2014; 13, 65-74.

Halata, Z., Grim, M., & Bauman, K. I. (2003). 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*, 271(1), 225-239.

Halliday, G. M.: *Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis.* Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. Mutat Res-Fund Mol M. 2005; 571(1), 107-120.

Hama S., Takahashi K., Inai Y., Shiota K., Sakamoto R., Yamada A., Tsuchiya H., Kanamura K., Yamashita E., Kogure K. Protective effects of topical application of a poorly soluble antioxidant astaxanthin liposomal formulation on ultraviolet-induced skin damage. *J. Pharm. Sci.* 2012;101:2909–2916.

Hanke, C.W.; Buening, J.: *Sunscreens and sun protection – Update 2000 and sun protection – Update 2000.* The Skin Cancer Foundation Journal. 2000; 18:41-42,86

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

Holst, D., & Grimaldi, P. A. (2002). New factors in the regulation of adipose differentiation and metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 13(3), 241–245.

Holubar, K.: *Historical, anthropological and biological aspects of sun and skin.* Clinics in Dermatol. 1998; 6: 19-22.

Honeyman, J.: *Efectos de las radiaciones ultravioletas en la piel.* Rev Per Dermatol. 2002; 12: 54, 62.

Huangfu J1, Liu J, Sun Z, Wang M, Jiang Y, Chen ZY, Chen F. :Antiaging effects of astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* on fruit flies under oxidative stress. *J Agric Food Chem.* 2013, 14;61(32):7800-7804.

Hussein G, Sankawa U, Goto H, Matsumoto K, Watanabe H (2006) Astaxanthin, a crotenoid with potential human health and nutrition. *J Nat Prod* **69**: 442–449.

Ibbotson, S. H.; Diffey, B. L.; Farr, P. M.: *The effect of topical indomethacin on ultraviolet-radiation-induced erythema.* Brit J Dermatol. 1996; 135(4), 523-527.

Ichihashi, M.; Ueda, M.; Budivanto, A.; Bito, T; Oka, M.; Funkunaga, M.; Tsuru, K. Horikawa, T.: *UV-induced skin damage.* Toxicology. 2003; 89 (1-2): 21-39.

Ismail, F., Ikram, M., Purdie, K., Harwood, C., Leigh, I., & Storey, A. *Cutaneous squamous cell carcinoma (SCC) and the DNA damage response: pATM expression patterns in pre-malignant and malignant keratinocyte skin lesions* (2011).

Jemal, A.; Bray, F.; Center, M. M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D.: *Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians.* 2012; 61(2), 69-90.

Jyonouchi H., Sun S., Iijima K., Gross M.D. Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action. *Nutr. Cancer.* 2000;36:59–65.

Kang, S., Chung, J. H., Lee, J. H., Fisher, G. J., Wa, Y. S., Duell, E. A., & Voorhees, J. J. (2003). Topical N-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet light induced signaling that leads to photoaging in human. *J. Invest. Dermatol.*, 120, 835–841.

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

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

Kielty, C. M., & Shuttleworth, C. A. (1997). Microfibrillar elements of the dermal matrix. *Microscopy Research and Technique*, 38(4), 413-427.

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

Kim Y.J., Kim Y.A., Yokozawa T. Protection against oxidative stress, inflammation, and apoptosis of high glucose- exposed proximal tubular epithelial cells by astaxanthin. J. Agric. Food Chem. 2009;57:8793–8797.

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

Kligman, L. H.: *“Aging and the skin”.* Raven Press, New York. 1989; 331-346.

Kligman, L. H.: *“Photoaging. Manifestations, prevention, and treatment.”* Clinics in geriatric medicine 5.1. 1989; 235.

Kligman L. H.: *The ultraviolet-irradiated hairless mouse: a model for photoaging.* J Am Acad Dermatol. 1989 Sep; 21(3 Pt 2): 623-31.

Kligman, L. H.; Gebre, M.; Alper, R.; Kefalides, N.A.: *Collagen metabolism in ultraviolet irradiated hairless mouse skin and its correlation to histologic observations.* J Invest Dermatol. 1989; 93: 210–214,

Kligman, L. H.: *"Intensification of Ultraviolet-induced Dermal Damage by Infrared Radiation"*. Arch. Dermatol. Res. 1982; 272:229-238. Kligman 1991

Kreuzmann, J.J.; Buchker, E.V.: *A range-finding method for approximating sunscreen efficacy and substantivity using guinea pig*. J Soc Cosmet Chem. 1990; (41): 275-81.

Kurita, K.; Burgess, S.M.; Sakai, N.: *Transgenic zebrafish produced by retroviral infection of in vitro-cultured sperm*. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101(5): 1263-7.

Landrigan, P. J.; Espina, C.; Neira, M.: *Global prevention of environmental and occupational cancer*. Environmen Health Perspect. 2011; 119(7), a280.

Lyons,NM,Obrien,NM.Modulatory effects of an algal extract containing astaxnthin on A-irradiated cells in culture.J.Dermatol Sci.2002; 30:73-84.

Maoka T., Tokuda H., Suzuki N., Kato H., Etoh H. Anti-oxidative, anti-tumor-promoting, and anti-carcinogenesis activities of nitroastaxanthin and nitrolutein, the reaction products of astaxanthin and lutein with peroxyxynitrite. Mar. Drugs. 2012;10:1391–1399.

Matsumura, Y.; Ananthaswamy, H. N.: *Short-term and long-term*

cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine. Expert Rev Mol Med. 2002; 1

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

Mittal, A.; Elmetts, C. A.; Katiyar, S. K.: *Dietary feeding of proanthocyanidins from grape seeds prevents photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice: relationship to decreased fat and lipid peroxidation.* Carcinogenesis. 2003; 24(8), 1379-1388.

Miyachi, K.; Fritzler, M. J.; Tan, E. M.: *Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells.* The Journal of Immunology. 1978; 121(6), 2228-2234.

Monroy-Ruiz J., Sevilla M.Á., Carrón R., Montero M.J. *Astaxanthin-enriched-diet reduces blood pressure and improves cardiovascular parameters in spontaneously hypertensive rats.* Pharmacol. Res. 2011;63:44-50.

Montero, J.: *Radiación Solar y Fotoprotección.* Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, editor. Dermofarmacia. 2004.

Montero, J.: *Radiación Solar y Fotoprotección.* Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, editor. Atención Farma-

céutica en Dermofarmacia. 2008.

Moore, L. Embriología Clínica. En Ed. Servier . New York. Buenos Aires , Argentina. 2004.

Muller I.: *Sun and Men: An Ambivalent Relationship.* In Altmeyer P. Hioffmann K. Stücker M. (edts): Skin Cancer and UV Radiation. In Springer. Verlag. Berlin – Hidelberg. 1997; 3-12.

Muto, J.; Kuroda, K.; Wachi, H.; Hirose, S.; Tajima, S.: Accumulation of elafin in actinic elastosis of sun-damaged skin: elafin binds to elastin and prevents elastolytic degradation. J Invest Dermatol. 2007; 43: 38-43.

Naguib Y.M.A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. J. Agric. Food Chem. 2000;48:1150-1154.

Nakamura, K.; Johnson, W. C.: *Ultraviolet Light Induced Connective Tissue Changes in Rat Skin: A Histopathologic and Histochemical Study.* J Invest Dermatol. 1968; 51(4), 253-258.

Nakao R., Nelson O.L., Park J.S., Mathison B.D., Thompson P.A., Chew B.P. Effect of dietary astaxanthin at different stages of mammary tumor initiation in BALB/c mice. Anticancer Res. 2010;30:2171-2175.

Nakao R., Nelson O.L., Park J.S., Mathison B.D., Thompson P.A.,

Chew B.P. Effect of astaxanthin supplementation on inflammation and cardiac function in BALB/c mice. *Anticancer Res.* 2010;30:2721–2725.

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

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

Nishigori, C.; Hattori, Y.; Toyokuni, S.: *Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis.* *Antioxid Redox Signal.* 2004; 6: 561-70

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

Ohgami K., Shiratori K., Kotake S., Nishida T., Mizuki N., Yazawa K., Ohno S. Effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003;44:2694–2701.

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

Otton R., Marin D.P., Bolin A.P., Santos R.C., Polotow T.G., Sampaio S.C., De Barros M.P. Astaxanthin ameliorates the redox imbalance in lymphocytes of experimental diabetic rats. *Chem. Biol. Interact.* 2010;186:306–315.

Park J.S., Mathison B.D., Hayek M.G., Massimino S., Reinhart G.A., Chew B.P. Astaxanthin stimulates cell-mediated and humoral immune responses in cats. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2011;144:455–461.

Park J.S., Chyun J.H., Kim Y.K., Line L.L., Chew B.P. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutr. Metab.* 2010;7:1–10.

Park J.S., Mathison B.D., Hayek M.G., Zhang J., Reinhart G.A., Chew B.P. Astaxanthin modulates age-associated mitochondrial dysfunction in healthy dogs. *J. Animal Sci.* 2013;91:268–275.

Pons Gimier, L.; Parra Juez, J. L.: *Ciencia Cosmética. Bases fisiológicas y criterios prácticos.* 1995 ed. Madrid. 2004; 36.

Pons Gimier, L.; Parra Juez, J. L.: La piel y sus anejos como sustrato vivo de la Cosmetología. In: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. 2004.

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

Potten, C. S. (1981). Cell replacement in epidermis (keratopoiesis) via discrete units of proliferation. *International Review of Cytology*, 69, 271-318.

Poswar, F. O.; Fraga, C. A.; Farias, L. C.; Feltenberger, J. D.; Cruz, V. P.; Santos, S. H.; Guimarães, A. L.: *Immunohistochemical analysis of TIMP-3 and MMP-9 in actinic keratosis, squamous cell carcinoma of the skin, and basal cell carcinoma.* Pathol Res Pract. 2013; 209(11), 705-709.

Prabhu P.N., Ashokkumar P., Sudhandiran G. Antioxidative and anti-proliferative effects of astaxanthin during the initiation stages of 1,2-dimethyl hydrazine-induced experimental colon carcinogenesis. *Fund. Clin. Pharmacol.* 2009;23:225-234.

Proksch, E., Brandner, J. M., & Jensen, J-M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 17(12), 1063-1072.

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

Ranga Rao A., Sindhuja H.N., Dharmesh S.M., Sankar K.U., Sarada R., Ravishankar G.A. Effective inhibition of skin cancer, tyrosinase, and antioxidative properties by astaxanthin and astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. J. Agric. Food Chem. 2013;61:3842–3851.

Ranga Rao A, Phang SM, Ravi S, Aswathanarayana RG: Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—a review. Mar Drugs. 2014; 7;12(1):128-152.

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

Reelfs, O.; Tyrrell, R. M.; Pourzand, C.: *Ultraviolet a radiation-induced immediate iron release is a key modulator of the activation of NF- B in human skin fibroblasts.* J Invest Dermatol. 2004; 122(6), 1440-1447.

Rijken, F.; Bruijnzeel, P. L.; van Weelden, H.; Kiekens, R. C.: *Responses of black and white skin to solar-simulating radiation: differences in DNA photodamage, infiltrating neutrophils, proteolytic enzymes induced, keratinocyte activation, and IL-10 expression.* J Invest Dermatol. 2004; 122(6), 1448-1455.

Rijken, F.; Kiekens, R.C.; Bruijnzeel, P.L.: *Skin infiltrating neutrophils following exposure to solar simulated radiation could play an important role in photoageing of human skin.* Brit J Dermatol. 2005; 152(2), 321-328.

Rijken, F.; Bruijnzeel, P.L.: *The pathogenesis of photoaging: the role of neutrophils and neutrophil-derived enzymes.* In Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings. 2009, August; (Vol. 14, No. 1, pp. 67-72). Nature Publishing Group.

Roche F. Astaxanthin As a Pigmenter in Salmon Feed, Color Additive Petition 7C0211, United States Food and Drug Administration. Hoffman-La Roche Ltd.; Basel, Switzerland: 1987. Astaxanthin: Human food safety summary; p. 43.

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

Ryu S.K., King T.J., Fujioka K., Pattison J., Pashkow F.J., Tsimikas S. Effect of an oral astaxanthin prodrug (CDX-085) on lipoprotein levels and progression of atherosclerosis in LDLR and ApoE mice. *Atherosclerosis*. 2012;222:99–105.

Saldler, TW .Lagman Embriologia Medica con orientación Clínica, Ed. Medica Panamericana, Madrid. 2004.

Samanek, A. J.; Croager, E. J.; Gies, P.; Milne, E.; Prince, R.; McMichael, A. J.; Slevin, T.: *Estimates of beneficial and harmful sun exposure times during the year for major Australian population centres.* *Med J Aust*. 2006; 184(7), 338.

Sams, W. M.; Smith, J. G.; Burk, P. G.: *The Experimental Production of Elastosis with Ultraviolet Light.* *J Invest Dermatol*. 1964; 43(6), 467-471.

Sánchez-Saldaña, L.; Lanchipa, P.; Pancorbo, J.; Regis, A.; Sánchez, E.: *Fotoprotectores tópicos.* *Rev Per Dermatol*. 2002; Vol, 12(2).

Santos S.D., Cahú T.B., Firmino G.O., de Castro C.C., Carvalho L.B.J., Bezerra R.S., Filho J.L. Shrimp waste extract and astaxanthin: Rat alveolar macrophage, oxidative stress and inflammation. *J. Food Sci*. 2012;77:141–146.

Savouré N1, Briand G, Amory-Touz MC, Combre A, Maudet M, Nicol M Vitamin A status and metabolism of cutaneous polyamines in the hairless mouse after UV irradiation: action of beta-carotene and astaxanthin. *Int J Vitam Nutr Res.* 1995;65(2):79-86.

Segre, J. A. (2006). Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(5), 1150-1158.

Scharffetter-Kochanek, K.; Brenneisen, P.; Wenk, J.; Herrmann, G.; Ma, W.; Kuhr, L.; Wlaschek, M.: *Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms.* *Exp Gerontol.* 2000; 35(3), 307-316.

Shapiro, M.; Rook, A. H.; Lehrer, M. S.; Junkins-Hopkins, J. M.; French, L. E.; Vittorio, C. C.: *Novel multimodality biologic response modifier therapy, including bexarotene and long-wave ultraviolet A for a patient with refractory stage IVa cutaneous T-cell lymphoma.* *J Am Acad Dermatol.* 2002; 47(6), 956-961.

Sharma, M. R., Werth, B., & Werth, V. P. (2011). Animal Models of Acute Photodamage: Comparisons of Anatomic, Cellular and Molecular Responses in C57BL/6J, SKH1 and Balb/c Mice. *Photochemistry and Photobiology*, 87, 690-698.

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

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

Sila A., Ayed-Ajmi Y., Sayari N., Nasri M., Martinez-Alvarez O., Bougatef A. Antioxidant and anti-proliferative activities of astaxanthin extracted from the shell waste of deep-water pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) Nat. Prod. J. 2013;3:82-89.

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

Sjerobabski Masnec, I.; Poduje, S.: *Photoaging.* Coll Antropol. 2008 Oct; 32 Suppl 2:177-80.

Smetana, K.; Gyorkey, F.; Chan, P. K.; Tan, E.; Busch, H.: *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and human malignant tumor nucleolar antigens (HMTNA) in nucleoli of human hematological malignancies.* Blut. 1983; 46(3), 133-141.

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

Svobodova, A.; Walterova, D.; Vostalova, J.: *Ultraviolet light in-*

duced alteration to the skin. BIOMEDICAL PAPERS-PALACKY UNIVERSITY IN OLOMOUC. 2006;150(1), 25-31.

Toschi, L.; Bravo, R.: *Changes in Cyclin/proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. J. Cell Biol. 988; 107:1623-1628.*

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

Vicente, V. (1999). El peligroso encanto de la belleza (Una aproximación a la patología de la pigmentación cutánea). *Discurso de Recepción Pública del Académico Electo en la Real Academia de Medicina y Cirugía de Murcia. Anales de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Murcia. 2000. 7- 41. y libro V. Vicente Ortega, Eds.) Murcia, España.*

Wang, Z. Y.; Agarwal, R.; Bickers, D. R.; Mukhtar, H.: *Protection against ultraviolet B radiation-induced photocarcinogenesis in hairless mice by green tea polyphenols. Carcinogenesis. 1991; 12(8), 1527-1530*

Watanabe H, Hussein G, Goto H, Nakagawa T, Oda S, Matsumoto K, Sankawa U (2007) Astaxanthin improves metabolic syndrome in the rat model. *Carotenoid Sci* **11**: 84–89.

Wibrand K., Berge K., Messaoudi M., Duffaud A., Panja D., Bramham C.R., Burri L. Enhanced cognitive function and antidepressant-like effects after krill oil supplementation in rats. *Lipids Health Dis.* 2013;12:1–13.

Wilgus, T. A.; Koki, A. T.; Zweifel, B. S.; Kusewitt, D. F.; Rubal, P. A.; Oberyszyn, T. M.: *Inhibition of cutaneous ultraviolet light B-mediated inflammation and tumor formation with topical celecoxib treatment.* *Molecular carcinogenesis.* 2003; 38(2), 49-58.

Winkelmann, R. K.; Baldes, E. J.; Zollman, P. E.: *Squamous Cell Tumors Induced in Hairless Mice with Ultraviolet Light.* *J Invest Dermatol.* 1960; 34(2), 131-138.

Wondrak, G. T.; Jacobson, M. K.; Jacobson, E. L.: *Antimelanoma activity of apoptogenic carbonyl scavengers.* *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 316(2), 805-814.

Yamashita E. Astaxanthin as a medical food. *Funct. Foods Health Dis.* 2013;3:254–258.

Yaar, M.; Gilchrist, B. A.: *Photoageing: mechanism, prevention and therapy.* *Br J Dermatol,* 2007; 157(5), 874-887.

Yang Y., Kim B., Lee J.Y. Astaxanthin structure, metabolism, and health benefits. *J. Hum. Nutr. Food Sci.* 2013;1:1003:1–1003:11.

Yin, T., & Green, K. J. (2004). Regulation of desmosome assembly

and adhesion. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 15(6), 665-677.

Young, A. R.: *Chromophores in human skin.* *Phys Med Bio.* 1997; 42(5), 789-797.

Young, A. R.; Chadwick, C. A.; Harrison, G. I.; Nikaido, O.; Ramsden, J.; Potten, C. S.: *The similarity of action spectra for thymine dimers in human epidermis and erythema suggests that DNA is the chromophore for erythema.* *J Invest Dermatol.* 1998; 111(6), 982-988.

Zhaorigetu, S.; Yanaka, N.; Sasaki, M.; Watanabe, H.; Kato, N.: *Silk protein, sericin, suppresses DMBA-TPA-induced mouse skin tumorigenesis by reducing oxidative stress, inflammatory responses and endogenous tumor promoter TNF- α .* *Oncology reports.* 2003; 10(3), 537-543.

Zheng, P.; Kligman, L. H.: *UVA-induced ultrastructural changes in hairless mouse skin: a comparison to UVB-induced damage.* *J Invest Dermatol.* 1993; 100(2), 194-199.

