

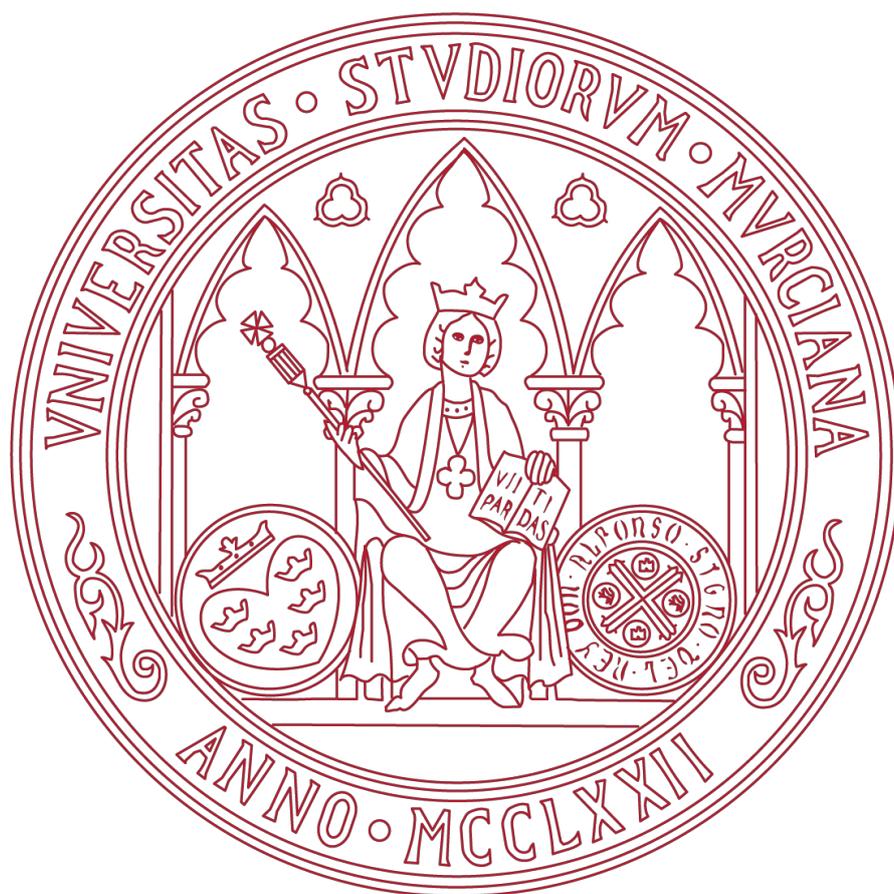


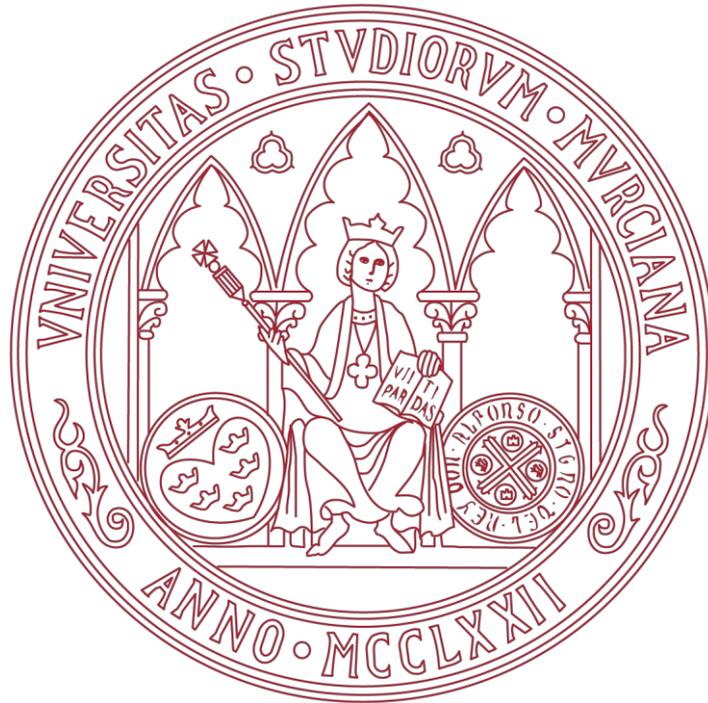
UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Estudio del Efecto de Polifenoles Vegetales sobre un
Modelo de Fotoenvejecimiento en Ratones SKH1

Dña. María José Belmar Ruiz
2014





Facultad de Medicina

**Estudio del efecto de polifenoles vegetales sobre un
modelo de fotoenvejecimiento en ratones SKH1**

D^a María José Belmar Ruiz

2014



**Instituto
Universitario
Investigación
Envejecimiento**

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN EN ENVEJECIMIENTO

Estudio del efecto de polifenoles vegetales sobre un modelo de
fotoenvejecimiento en ratones SKH1

María José Belmar Ruiz

2014



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

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

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Estudio del efecto de polifenoles vegetales sobre un modelo de fotoenvejecimiento cutáneo en ratones SKH-1", realizada por D^a. María José Belmar Ruiz, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 2 de Junio de 2014



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. Nuria García Carrillo, Doctora de Universidad del Área de Anatomía Patológica en el Departamento de Oftalmología y Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Estudio del efecto de polifenoles vegetales sobre un modelo de fotoenvejecimiento cutáneo en ratones SKH-1", realizada por D^a. María José Belmar Ruiz, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 2 de Junio de 2014

A handwritten signature in blue ink, reading 'Nuria Garcia', enclosed within a blue oval.

A mis padres

Agradecimientos

Esta tesis doctoral ha supuesto para mí un reto, ha habido buenos momentos y otros no tan buenos, pero con toda la gente que he tenido a mi alrededor y he podido contar con su ayuda inestimable, todo ha salido para adelante.

A Vicente, por brindarme la oportunidad de hacer la tesis en el departamento y ser partícipe de conocer un poco qué es el “mundo” de la investigación. Gracias.

A Paco, mi director de tesis, por su paciencia conmigo, por todas sus explicaciones y toda la ayuda que recibido siempre con una sonrisa, mil gracias.

A Nuria, mi directora de tesis, a quien le debo gran parte de esta tesis; el tesón, entusiasmo que ha puesto siempre en ella y en mí. Confiando siempre en que podía, pasándose tardes conmigo en el animalario echándome una mano, “o las dos”, no tengo palabras para agradeceréte.....siempre me tendrás para lo que me necesites. GRACIAS.

A la doctora Asunción Cremades, por ayudarme en mis comienzos en esto de la investigación en mi tesis de master, a enseñarme un poco el manejo de los animales de experimentación y quitarme el miedo tan grande que tenía a los ratones, gracias por aportar tu granito de arena.

A los doctores Anna Serafín y Xavier Cañas, del parque científico de Barcelona, por su colaboración en la realización del PCNA.

A mis compañeros del departamento Victor, Manolo, Alberto, Olga, Violeta, por el apoyo, en la parte experimental, las risas y los ánimos en todos los momentos.

A todos los compañeros del animalario, Fran, Antonio, Enrique, Carmen, Yolanda por todos los momentos que hemos tenido de psicología, charlas científicas y de todo tipo, y muy especialmente a Antonio Cano, por ayudarme con todos sus conocimientos previos del tema de la tesis que ambos compartimos, y en la última parte de maquetación, gracias.

A la doctora Fara Saez, por sus conocimientos y colaboración en la parte de imagen de esta tesis.

Al doctor Manuel Canteras, por su ayuda en la parte de análisis estadístico e interpretación de datos de este estudio. Siempre me has recibido en tu despacho con una sonrisa y me has atendido aunque no te hubiera pedido cita, gracias.

A todos mis amigos que me han soportado en estos años de tesis, mis bajones, mis “subidones”, penas, alegrías, los que estáis aquí cerca, otros que tengo más lejos en mi querida Andalucía. Porque con vuestra presencia o no, pero he sabido que os he tenido para todo, y si en algún momento os he necesitado SIEMPRE os he tenido ahí, gracias os quiero.

Y por último, y no menos importante, a mi madre, quien me ha apoyado más que nadie, en mi sufrimiento, mis alegrías, por no dudar de mí y confiar en mí y que podía llevar a buen puerto esto que empezó ya hace unos años. Gracias por hacerme y enseñarme a ser como soy. Y darme toda la fuerza que he necesitado.

A los que se me olvidan...

I. Índice

I. ÍNDICE	1
II. ANTECEDENTES	1
PIEL.....	1
<i>Estructura.....</i>	<i>1</i>
<i>Funciones.....</i>	<i>4</i>
RADIACIÓN ULTRAVIOLETA	5
<i>Efectos de la RUV.....</i>	<i>6</i>
<i>Fototipos cutáneos.....</i>	<i>8</i>
PATOLOGÍA CUTÁNEA POR EXPOSICIÓN A RUV	11
<i>Fotoenvejecimiento.....</i>	<i>11</i>
FOTOCARCINOGÉNESIS	15
INFLUENCIA DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN LA FOTOCARCINOGÉNESIS	16
TIPOS DE CÁNCER CUTÁNEO	17
<i>Melanoma.....</i>	<i>18</i>
MECANISMOS DE DEFENSA DE LA PIEL ANTE EL DAÑO INDUCIDO POR LA RUV	25
<i>Cambios en la epidermis.....</i>	<i>26</i>
SISTEMA ANTIOXIDANTE DEL ORGANISMO	30
POLIFENOLES Y DIETA.....	37
<i>Flavonoides.....</i>	<i>39</i>
<i>Flavonoides en fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis.....</i>	<i>41</i>
ESPECIES VEGETALES A ESTUDIO	48
<i>Extracto de granada.....</i>	<i>48</i>
<i>Extracto de fresno.....</i>	<i>53</i>
<i>Extracto de uva.....</i>	<i>55</i>
MODELOS ANIMALES	59
III. OBJETIVOS.....	65
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.	69
<i>Animales.....</i>	<i>69</i>
<i>Equipos.....</i>	<i>70</i>
<i>Agentes: compuestos fenólicos.....</i>	<i>71</i>
<i>Reactivos.....</i>	<i>75</i>
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	76

<i>Estudio macroscópico</i>	78
<i>Método anatomopatológico</i>	79
<i>Método inmunohistoquímico</i>	82
<i>Método estadístico</i>	84
V. RESULTADOS	89
ESTUDIO MACROSCÓPICO	89
ESTUDIO MICROSCÓPICO	99
<i>Incidencia de tumores e histopatología</i>	99
ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.....	107
VI. DISCUSIÓN	115
VII. RESUMEN	137
VIII. CONCLUSIONES	143
IX. BIBLIOGRAFIA	147
X. ANEXOS	185
<i>Tablas</i>	185
<i>Figuras</i>	185
<i>Gráficos</i>	187
<i>Abreviaturas</i>	188

Antecedentes.

II. Antecedentes

Piel

La piel se considera 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 2m² y pesa unos 10 kg.

Estructura.

El estudio histológico de la piel permite la distinción, del exterior al interior, de las siguientes tres capas: epidermis, dermis e hipodermis, que se diferencian tanto en su estructura como en su función (Costin, 2007).

Epidermis. Es la capa más externa de la piel, esencialmente celular y carente de circulación sanguínea, por lo que depende de la dermis para la aportación de nutrientes. Su principal función es la de barrera entre los dos medios, el externo y el interno; además es relativamente impermeable al agua, lo que previene la evaporación de líquidos, permitiendo la vida fuera del medio acuático. Es un epitelio escamoso pluriestratificado de origen ectodérmico. Las distintas capas se diferencian en función de la morfología de los queratinocitos, los cuales, en el estrato más interno son prismáticos, con actividad mitótica y poca actividad bioquímica. A medida que avanzan hacia estratos más externos, los queratinocitos se van haciendo más cúbicos y luego aplanados, perdiendo la capacidad de división y aumentando la tasa de síntesis de queratohialina.

✓ El **estrato basal o germinativo** es el más interno, consta de una única capa de células basófilas ancladas en la membrana basal acelular que conecta la epidermis con la dermis. El 95% de las células son queratinocitos, de forma prismática y alta actividad mitótica; por lo que este estrato es responsable de la renovación de la epidermis. Otras células que se

encuentran a este nivel son las células de Merkel y los somas de los melanocitos.

✓ A continuación encontramos el **estrato espinoso**, formado por varias capas de células, generalmente unas ocho, principalmente queratinocitos de forma cúbica y limitada capacidad de división. Además de los queratinocitos, en esta capa se pueden observar dendritas de los melanocitos y células presentadoras de antígeno aún inmaduras; son las denominadas células de Langerhans.

✓ Por encima se encuentra el **estrato granuloso** compuesto de células cada vez más planas e irregulares, sin capacidad de división y con alta actividad productora de queratohialina. Ésta es acumulada en gránulos cuyo tamaño y número aumenta según las células se van acercando a las zonas más superficiales. Por el contrario los núcleos de estos queratinocitos van degenerando por apoptosis, encontrándose en las capas más externas queratinocitos en proceso de muerte celular.

✓ La siguiente capa es el **estrato lúcido** formado por células aplanadas. Éstas están engrosadas en pies y manos para aportar elasticidad a la piel de estas zonas tan sometidas a estrés mecánico.

✓ Por último, la capa más externa, el **estrato córneo**, es un epitelio estratificado formado por células muertas y láminas de queratina. Aporta protección mecánica y química a la piel.

Como hemos comentado, los queratinocitos son el pilar celular de esta capa, su función es la de generar una protección física contra las agresiones del medio. Esta protección no sólo se ejerce por generación de una barrera física de queratohialina entre el medio y los estratos de células vivas, sino que, además, los queratinocitos poseen melanina, pigmento capaz de absorber la radiación ultravioleta (RUV). Sin embargo, este tipo celular no es capaz de sintetizar este pigmento; esto es realizado por los melanocitos. Estos se los transfieren a los queratinocitos de su entorno mediante secreción citocrina. Se define a la unidad epidérmica de la melanina como el

conjunto formado por un melanocito y los queratinocitos que de él reciben la melanina.

Dermis: es una capa de tejido conjuntivo denso de origen mesodérmico. Entre las fibras y las células que la forman, se localizan glándulas excretoras y secretoras, folículos pilosos, uñas, órganos de los sentidos, nervios sensitivos de receptores mecánicos de la piel, vasos sanguíneos y vasos linfáticos. El tipo celular predominante en la dermis son los fibroblastos, cuya principal función es la síntesis y degradación de las fibras de la matriz extracelular. Asimismo, también se encuentran células de defensa, como son los mastocitos y los macrófagos, y las células presentadoras de antígeno inmaduras, que en esta capa se conocen por el nombre genérico de células dendríticas.

La matriz extracelular está compuesta principalmente por fibras, entre las que se encuentran el colágeno, la elastina y fibras reticulares. El colágeno confiere resistencia a la piel; la elastina elasticidad y resiliencia, y las fibras reticulares mantienen la estructura de la dermis. Además de las fibras, en la matriz extracelular hay otras sustancias que, en conjunto, reciben el nombre de matriz extrafibrilar, compuesta por proteoglicanos, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, agua y ácido hialurónico. Las funciones de estas sustancias son variadas. Entre otras, destacan el mantenimiento de la tensión, el reconocimiento necesario para la adhesión celular y la comunicación durante la migración celular.

La dermis es mucho más gruesa que la epidermis, por lo que ejerce una mayor protección frente a agresiones mecánicas del medio. En ella se distinguen dos estratos principales, la dermis superior o papilar, más superficial, y la dermis profunda o reticular, más profunda. La dermis superior está formada por tejido conectivo más laxo y, al estar en contacto con la epidermis, le suministra nutrientes. La dermis profunda es de tejido conectivo denso, en el cual las fibras se disponen en todas las direcciones.

Hipodermis: o tejido subcutáneo es la capa más interna de la piel y está formada por tejido conjuntivo laxo en la que se localizan células adiposas. El

grosor de esta capa difiere en función de la localización. Conecta la dermis con los tejidos subyacentes actuando a modo de aislante.

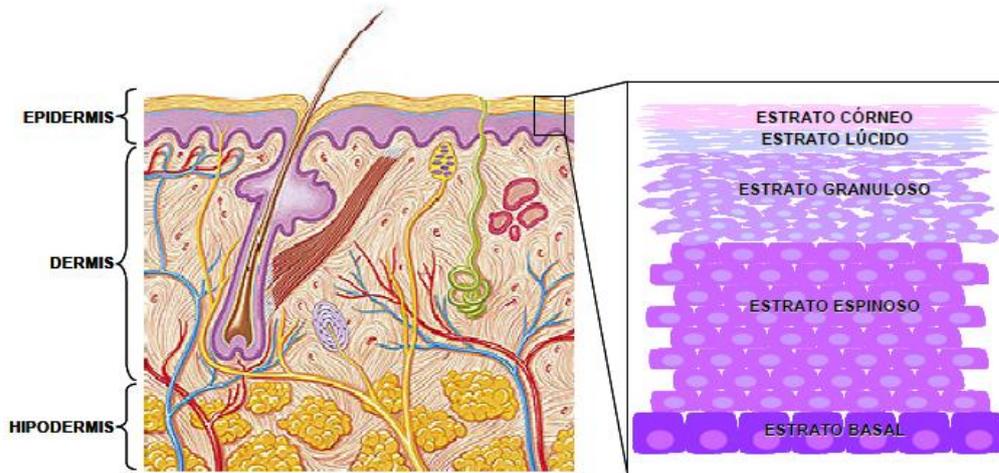


Fig. 1. Estructura de la piel.

En la figura 1 puede observarse gráficamente la estructura de la piel y la morfología de los queratinocitos en las distintas capas de la epidermis.

Funciones.

La piel juega un papel vital como barrera de regulación del medio interno. Sus funciones son la de ejercer de barrera protectora frente a factores externos (físicos, químicos y biológicos), la de captación de información del medio externo, el mantenimiento de la homeostasis del medio interno, las funciones excretora y secretora y la de defensa inmune activa frente a antígenos exógenos.

Radiación ultravioleta

La radiación UV se divide en tres categorías: ultravioleta C (UVC) de onda corta (200-280 nm), ultravioleta B (UVB) onda media (280 a 320 nm) y ultravioleta A (UVA) de onda larga (320-400 nm). La UVC es extremadamente perjudicial para la piel debido a que estas ondas de luz tienen una enorme energía y pueden penetrar la piel hasta una profundidad de aproximadamente 60 a 80 micrómetros (μm). Sin embargo, esta radiación es completamente absorbida por la capa de ozono, impidiendo que llegue a la Tierra (Lautenschlager, 2007). La radiación UVB constituye alrededor del 5% de la radiación UV (Kullavanijaya, 2005), y se piensa que es el componente más activo de la radiación solar responsable de una gran variedad de enfermedades de la piel, incluyendo el cáncer de piel no melanoma y melanoma. La UVB penetra en la piel a una profundidad de aproximadamente 160-180 μm , y actúa principalmente en la capa basal de la epidermis. La radiación UVB puede inducir daño en el ADN, estrés oxidativo, agotamiento del sistema de defensa cutánea, inflamación, inmunosupresión, envejecimiento prematuro de la piel, y puede actuar como un iniciador de tumor, promotor de tumor y co-carcinógeno (Ichihashi, 2003). Por otro lado, los rayos UVA constituyen aproximadamente el 90-95% de la radiación solar que llega a la superficie de la tierra, y debido a su longitud de onda más larga tienen alta capacidad de penetración en la de piel (1000 μm). La exposición a UVA conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), que pueden causar daño a nivel de las proteínas celulares, lípidos y ADN (Afaq, 2011).

Ambas, las radiaciones UVA y UVB, son las causantes de hasta el 90% de los cambios comúnmente atribuibles al envejecimiento y además, se vinculan con la génesis del melanoma y el cáncer de piel no melanoma, siendo consideradas en la actualidad como el carcinógeno ambiental más importante (Tanaka, 2009).

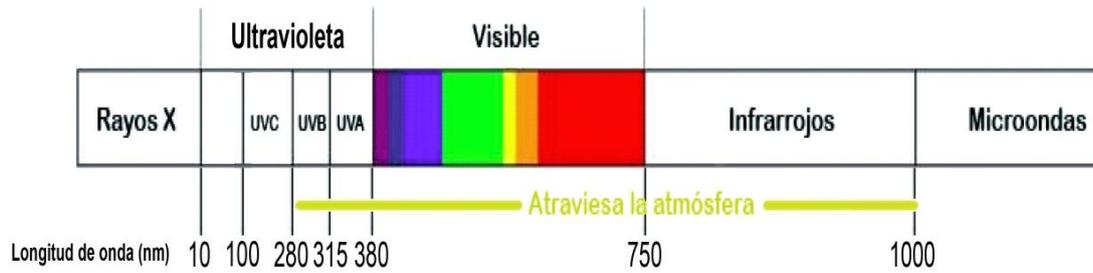


Fig 2. Espectro de la radiación.

Efectos de la RUV.

Cuando hablamos de la RUV, no sólo podemos pensar en sus efectos perjudiciales, también debemos tener en cuenta sus propiedades beneficiosas para el organismo:

Efectos Beneficiosos	Efectos Perjudiciales
Modulación de reacciones enzimáticas	Incremento de la carcinogénesis
Activación de mecanismos antiinflamatorios	Alteraciones de la respuesta inmune
Destrucción de agentes patógenos	Trastornos pigmentarios
Síntesis de Vitamina D	Fotodaño
Acción troficorregenerativa	Fotoenvejecimiento
	Fotosensibilización y daño celular

Tabla 1. Efectos de las RUV sobre la piel.

Las consecuencias para la piel de la exposición excesiva al sol y por tanto del bronceado, son complejas, destacando fundamentalmente las secuelas agudas, subagudas y crónicas (Diffey, 1998), resumidas en la Tabla 1.

RUV	Efectos Agudos	Efectos Crónicos
UVC 190-280 nm	Filtrada por la capa de ozono	
	Eritema (pico después de 8-24h)	
	Edema	
	Pigmentación oscura	Fotocarcinogénesis
UVB 280-320 nm	Bronceado tardío	Inmunosupresión
	Engrosamiento de la epidermis y dermis	Fotoenvejecimiento
	Síntesis de vitamina D	
		Fotoenvejecimiento
UVA 320-400 nm	Bronceado inmediato (2h de duración)	Inmunosupresión
		Fotocarcinogénesis

Tabla 2. Efectos perjudiciales sobre la piel de la radiación ultravioleta (Gilaberte, 2003).

Fototipos cutáneos.

El fototipo es una forma de clasificar a los individuos según sea su sensibilidad a la radiación ultravioleta. Existen 6 variedades de fototipo, atendiendo a características como color de piel, color del pelo y de los ojos. La tabla 3 resume las características fundamentales de los fototipos (Fitzpatrick, 1975). La reactividad de las personas al sol es muy distinta. En la piel de los albinos no hay pigmentación debido a un defecto en el metabolismo de la melanina, tampoco en las zonas de vitíligo a causa de la ausencia de melanocitos. Los individuos de raza negra y de pieles distintas a la blanca son menos sensibles a la exposición solar que los de piel clara, pero no son inmunes a los efectos del Sol, pues pueden sufrir quemaduras solares cuando se exponen de forma prolongada. Las personas rubias y pelirrojas tienen un riesgo especial; en las de pelo claro la melanina se deposita de forma irregular y ocasiona las pecas.

FOTOTIPO	TIPO DE PIEL	REACCIÓN SOLAR	DEM (Minutos)
Fototipo I	Piel muy clara. Ojos azules. Pecas.	Eritema Intenso. Gran descamación. No se pigmentan.	15-30
Fototipo II	Piel clara. Ojos azules. Pelo rubio o pelirrojo.	Reacción eritematosa. Descamación. Ligera pigmentación.	25-40
Fototipo III	Piel blanca (caucásica). Ojos y pelo castaño.	Eritema moderado. Pigmentación suave.	30-50
Fototipo IV	Piel mediterránea. Pelo y ojos oscuros.	Ligero eritema. Pigmentación fácil.	40-60
Fototipo IV	Morena. Latinos, mestizos, gitanos.	Eritema Imperceptible. Pigmentación fácil e intensa.	60-90
Fototipo VI	Piel Negra	No eritema, pero si bronceado.	90-150

Tabla 3. Clasificación de fototipos cutáneos y factores recomendados según el tipo de piel (Medunad, 2002).

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.) y ésta a su vez, de un fenómeno de adaptación a las diferentes intensidades de las radiaciones UV 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. Otros muchos componentes de los alimentos, y numerosas sustancias exógenas como conservantes, colorantes e incluso medicamentos, pueden alterar la pigmentación cutánea.

Patología cutánea por exposición a RUV.

Numerosas evidencias han demostrado los efectos nocivos de la RUV en la piel. Muchos estudios han tratado de dilucidar los mecanismos de acción por los que dicha radiación actúa en los tejidos vivos, demostrando la implicación de varios mecanismos de acción. La energía de la RUV puede dañar estructuras celulares directamente o a través de la acción de moléculas fotosensibles (Svobodova, 2006). Esta energía en el ambiente tisular provoca una sucesión de reacciones, que conducen a la generación de especies reactivas que amplifican el daño que causa la RUV a las estructuras celulares. De todas las estructuras celulares que pueden ser dañadas por estos mecanismos, la de mayor trascendencia es el ADN. Las lesiones que éste sufra y no sean reparadas pueden perpetuarse, implicando pérdida de función de genes y pudiendo comprometer el ciclo celular y la homeostasis tisular.

Hay que tener en cuenta que el resultado observable del efecto nocivo de la RUV en la piel es consecuencia de la acumulación de lesiones inducidas por todas las exposiciones a las que la piel ha sido sometida a lo largo del tiempo, considerándose más peligrosas aquellas que han tenido lugar durante la infancia y, sobre todo, los episodios de inflamación de la piel o “quemaduras solares” inducidas por la RUV durante esa etapa de la vida.

Fotoenvejecimiento

El envejecimiento de la piel es el proceso por el cual se dan cambios fisiológicos y morfológicos que derivan en la disminución de la funcionalidad del tejido y el aumento de la susceptibilidad al daño. Los cambios son progresivos y acumulativos, por lo que el proceso se acelera con el tiempo (Jenkins, 2002). El envejecimiento está influenciado por dos tipos de factores: los intrínsecos (genéticos) y los extrínsecos, cuyos efectos se suman a pesar de que actúan de manera independiente.

Los factores intrínsecos, son los propios del sujeto y del tejido, como son la información genética, el tipo celular y el número de ciclos replicativos.

Esto conduce al denominado envejecimiento intrínseco o innato, propio de las zonas no expuestas al exterior. Microscópicamente se caracteriza por la reducción de los niveles de colágeno, la degradación de la red elástica y la pérdida de hidratación. A nivel macroscópico se observan arrugas muy finas y adelgazamiento de la piel debido a la atrofia de la dermis y la pérdida del tejido adiposo subcutáneo.

Por su parte, los factores extrínsecos modelan el microambiente celular y tisular. Entre ellos destacan los productos del metabolismo celular, inducido principalmente por compuestos exógenos, y la radiación ultravioleta. Dada la importancia de esta radiación en el envejecimiento debido a causas extrínsecas, este es denominado en general fotoenvejecimiento. A nivel microscópico se puede observar el descenso de los niveles de colágeno, la degradación de la red de fibras elásticas y pérdida de hidratación de la piel (Uitto, 2008). Macroscópicamente las principales características de la piel fotoenvejecida son la presencia de arrugas profundas, sequedad y engrosamiento, pérdida de elasticidad y pigmentación irregular de la piel (Leyden, 2001). La principal característica del fotoenvejecimiento es la presencia de acúmulos de material elástico en la dermis, pero a diferencia de las fibras elásticas funcionales, estos acúmulos no se disponen en fibras ni redes que doten a la piel de elasticidad y resiliencia, que le permitan ejercer su función. La acción de los factores extrínsecos conduce a un aumento de los radicales libres de oxígeno (RLO) en las células, afectando a su estabilidad y funcionalidad, acelerando el proceso intrínseco de envejecimiento y modificando su patrón de evolución.

En el envejecimiento extrínseco o fotoenvejecimiento, se producen diversos cambios celulares, como la disminución de las tasas de proliferación de los distintos tipos celulares cutáneos y la menor eficacia en la respuesta ante estímulos intra y extracelulares (Rabe, 2006). Estos hechos conllevan a la pérdida de las funciones de barrera de los queratinocitos y a irregularidades en la respuesta inmune de la piel. En la matriz extracelular disminuye la actividad de las metaloproteinasas, inhibiéndose la degradación de las fibras de elastina y colágeno. Esto

provoca un aumento del grosor y una pérdida de la estructura de la piel. Asimismo, aumenta la vascularización mediada por cambios en la síntesis de factores de crecimiento y sus inhibidores en respuesta a la UVB. Otra característica del fotoenvejecimiento es una disminución de los niveles de antioxidantes, enzimáticos o no, en la piel.

La entrada de las células en senescencia proliferativa está determinada principalmente por el acortamiento de los telómeros. Se ha comprobado que dicho acortamiento, a pesar de depender de factores genéticos y del número de ciclos reproductivos de la célula, se acelera por causas exógenas. Entre éstas, por la oxidación de las guaninas teloméricas mediada por la acción de RLO (Oikawa, 2001), cuya presencia, como ya se ha descrito, aumenta por efecto de la RUV, principalmente de tipo A.

La siguiente tabla resume las características de la piel expuesta a radiaciones solares según Benedetto (1998):

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS	
<ul style="list-style-type: none"> ○ Piel rugosa, engrosada, multinodular ○ Telangiectasias y equimosis ○ Pigmentación moteada y léntigos múltiples ○ Pérdida de elasticidad ○ Comedones 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Engrosamiento reactivo con áreas de atrofia ○ Alargamiento de las crestas epidérmicas ○ Pérdida de polaridad celular con hiperplasia de células basales ○ Pleomorfismo celular y nuclear (atipias) ○ Disminución marcada del número y función de las células de Langerhans 	EPIDERMIS
<ul style="list-style-type: none"> ○ Disminución de la sudoración ○ Producción de escamas ○ Aumento incidencia queratosis y cánceres 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 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 ○ Regresión y desorganización marcada de vasos capilares ○ Aumento de grosor de venas post-capilares ○ Disminución marcada en número y función de glándulas sudoríparas ○ Aumento marcado del tamaño de glándulas sebáceas con disminución de la función 	DERMIS

Tabla 4. Características de la piel expuesta a RUV (Benedetto, 1998).

Fotocarcinogénesis

La carcinogénesis es un proceso que consta de tres etapas principales: iniciación, promoción y progresión, con cambios celulares y moleculares característicos de cada una de ellas (Valko, 2006). En la iniciación, tiene lugar la transformación de células sanas en células cancerosas, caracterizadas por presentar fallos en los mecanismos de regulación del ciclo celular y en la señalización intercelular. Para que esto ocurra es necesario que lesiones sufridas en el ADN se hayan fijado y que ocurra un fallo en los procesos que desencadenan la muerte de las células dañadas. Si se dan estas dos condiciones, la célula portadora de mutaciones puede proliferar transmitiendo los daños a las células hijas que, a su vez, podrán acumular nuevos daños. Las mutaciones clave son aquellas que ocurren en protooncogenes, dando lugar a oncogenes, y en genes supresores de tumores. Debido a estas mutaciones las células se hacen resistentes a las señales de inhibición del crecimiento y de diferenciación. En este punto se puede hablar de células transformadas, iniciadas o cancerosas.

La segunda etapa del desarrollo del tumor es la promoción. Ésta se caracteriza por la expansión clonal de células transformadas y por la inducción de la proliferación y/o inhibición de la apoptosis. Estos hechos conducen a la formación de una masa local que requiere la presencia continua de estímulos promotores de la proliferación para su mantenimiento. En este punto, el correcto funcionamiento del sistema inmune es de vital importancia; tanto en el reconocimiento de las células transformadas, como en la generación de una respuesta citotóxica frente a dichas células. En el tercer estadio del desarrollo tumoral, la progresión, se da la conversión de las lesiones premalignas o malignas en tumores con capacidad invasiva y metastática (Klaunig, 2004). Junto con el acúmulo de un mayor número de daños en el genoma, tiene lugar la aparición de vasos sanguíneos de nueva formación (angiogénesis) para la irrigación de las células neoplásicas.

Un punto crítico en la iniciación de células tumorales en la piel es la mutación del gen supresor de tumor p53 en los queratinocitos epidérmicos, lo que favorece la aparición, y por tanto el acúmulo de más mutaciones al no inducirse los mecanismos de reparación del ADN y al continuar la proliferación celular por la inhibición de la apoptosis. Además, hay que recordar que, debido a la inmunosupresión inducida por la RUV, se produce una situación de tolerancia inmunológica que evita el reconocimiento de las células transformadas por el sistema inmune y, por tanto, que dicho sistema no desencadene la respuesta apropiada, lo que favorece no sólo la supervivencia de las células sino también la propagación de las mismas.

Influencia de las especies reactivas del oxígeno en la fotocarcinogénesis

Las especies reactivas de oxígeno (ERO), están implicadas en la potenciación de la carcinogénesis, actuando en cada uno de los estadios del desarrollo del tumor. Esto se ha observado tanto en la piel como en otros tejidos (Bickers, 2006). Los mecanismos por los cuales las ERO llevan a cabo esta acción se resumen en los siguientes tres puntos: favoreciendo la aparición de mutaciones y aberración cromosómicas, potenciando la proliferación celular de células transformadas y ejerciendo una selección negativa sobre el resto de células del tejido. Estas especies son capaces de reaccionar con el ADN, causando lesiones tanto en las bases nitrogenadas como en el esqueleto carbonado de la célula. Además, reducen la eficacia de los mecanismos de reparación de estas lesiones, favoreciendo la fijación de mutaciones que, en función de los genes afectados, pueden inducir transformación celular, por lo que la relación de las ERO con la iniciación del tumor es clara.

La segunda vía por la que las ERO fomentan la carcinogénesis es favoreciendo la proliferación celular. Esto tiene lugar mediante la activación de factores de transcripción, como el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), como ocurre en la aplicación de promotores tumorales químicos, como el tetradecanoil forbol-

13 acetato (TPA), ampliamente utilizado en modelos animales de cáncer de piel inducidos por sustancias químicas. Estos mecanismos no sólo actúan en la promoción, sino también en la progresión tumoral.

Por último, las células transformadas son más resistentes a ambientes oxidativos. Esto les confiere una ventaja sobre el resto de células del tejido, cuyo crecimiento e incluso supervivencia, se ven condicionadas a los niveles de ERO. La resistencia de las células transformadas, sumada a la mayor tasa de crecimiento celular, determina un mayor éxito de las células tumorales. Esto es importante tanto en la promoción como en la progresión del tumor. Un modelo evolutivo neodarwiniano podría explicar este hecho, ya que la aparición de una nueva combinación genética, con una ventaja reproductiva y mayor resistencia a la muerte celular, conduce al mayor desarrollo de estas células respecto a las demás presentes en el tejido (Kemp, 2005) e incluso favorece la invasión del tejido adyacente (Klaunig, 2004).

Tipos de cáncer cutáneo

En la piel se pueden diferenciar tres tipos de tumores en función de la estirpe celular implicada. El primero de ellos son los linfomas de células T cutáneas. En segundo lugar, los melanomas, cuando las células transformadas son melanocitos y, el tercer tipo, los cánceres de piel no melanómicos, en los que el tumor se origina en los queratinocitos. A excepción de los linfomas de células T cutáneas, los datos epidemiológicos relacionan la exposición a la RUV como la principal causa de la aparición de cánceres de piel (Gallagher, 2006). Éstos son más frecuentes en personas residentes en áreas de alta irradiación solar, en personas con características de piel sensibles al sol, en áreas de la piel expuestas al sol, en personas expuestas mucho tiempo y/o con tendencia al desarrollo de este tipo de enfermedades y se reduce mediante la protección de la piel frente al Sol (English, 1997).

Melanoma

Entre 79.000 hombres y 81.000 mujeres fueron diagnosticados de melanoma en 2002 en el mundo, de los que aproximadamente el 80% ocurrieron en población blanca de Norteamérica, Australia, Nueva Zelanda y Europa. En una escala global, el melanoma ocupa la posición 16 y 15 de los cánceres más frecuentes en hombres y mujeres respectivamente (Ferlay, 2000).

La exposición intermitente a la RUV es el factor de riesgo ambiental más importante para el melanoma, especialmente en combinación con factores endógenos (fototipo cutáneo I y II, inmunodeficiencia, predisposición genética) (Armstrong, 1993). La asociación entre la RUV y el melanoma es ambigua, con diferencias en riesgos asociados a la dosis, la forma en la que se produce (intermitente vs. crónica) y en los periodos críticos (infancia vs. exposición acumulada durante la vida). La exposición intermitente a las RUV de la población blanca especialmente durante la infancia, se considera como el principal factor de riesgo para el desarrollo del melanoma.

Aunque la alta exposición solar en la infancia, es el factor más determinante (Whiteman, 2001), múltiples quemaduras solares (Elwood, 1997) y una alta exposición a lo largo de toda la vida (Autier, 1998), incrementan el riesgo de padecer esta enfermedad significativamente.

Debido a que las lámparas de bronceado cosmético emiten RUV, su uso debe ser considerado como un factor de riesgo para el desarrollo del melanoma, como ha sido recientemente confirmado en un estudio prospectivo (Veierod, 2003).

El melanoma cutáneo, parece surgir por diferentes vías patogénicas, aquellos que surgen en cabeza y cuello. Están relacionados directamente con la exposición solar, mientras que los que se desarrollan en el tronco se dan principalmente en personas con múltiples nevus melanocíticos (Whiteman, 2003). Un número elevado de nevus reflejan una susceptibilidad innata a la proliferación melanocítica (Siskind, 2002a; Siskind, 2002b) y su

estimulación mediante la exposición solar (Darlington, 2002). El riesgo de melanoma acral, también aumenta con la dosis acumulada de RUV y con la exposición a sustancias químicas agrícolas (Green, 1999).

La exposición al Sol de tipo ocupacional, especialmente trabajadores del campo, está asociada con el riesgo de padecer melanoma ocular (Vajdic, 2002).

Mutaciones innatas de genes supresores de tumores, por ejemplo; CDKN2A, están fuertemente asociados con el melanoma familiar que representa probablemente menos del 1% de todos los melanomas cutáneos (Aitken, 1999).

La aparición más frecuente de los melanomas por unidad de superficie cutánea en ambos sexos son: cara, oreja y cuello (Franceschi, 1996; Green, 1999), junto con la espalda y los hombros en hombres y los miembros inferiores en las mujeres.

Los melanomas se catalogan principalmente en 4 tipos:

1. *Léntigo maligno melanoma*. Este tipo de melanoma se desarrolla cuando el tumor invasivo procede de un léntigo maligno preexistente. Es frecuente en la región de cabeza y cuello y en personas mayores, y tiene un pronóstico relativamente favorable.
2. *Melanoma de extensión superficial*. Este tipo de melanoma crece de forma horizontal antes del crecimiento vertical (invasivo). Es el melanoma más común en población caucásica y su incidencia sigue en aumento, observándose frecuentemente en pacientes jóvenes y en zonas que están expuestas a las radiaciones solares de forma intermitente. Tiene un pronóstico relativamente favorable.
3. *Melanoma nodular*. Normalmente se presenta como un nódulo pigmentado de crecimiento rápido (aunque existe el melanoma nodular amelanótico), que puede estar ulcerado. Es el tipo de melanoma más agresivo, suele presentarse en zonas del cuerpo expuestas de forma intermitente a la radiación solar.

4. *Melanoma lentiginoso acral*. Esta lesión pigmentada se presenta en la palma de la mano, planta del pie o bajo las uñas. Es típico en personas de edad avanzada y constituye el tipo más común de melanoma en la población fuertemente pigmentada.

Los cánceres de piel no melanocíticos se pueden clasificar en dos tipos principales: carcinoma de células basales y de células escamosas. Ambos tipos presentan bajas tasas de mortalidad y de metástasis, pero pueden dar lugar a la destrucción del tejido adyacente.

El carcinoma de células basales es más frecuente que el de células escamosas, alcanzando una tasa de hasta el 75% de todos los cánceres de piel en algunas series. Existen cuatro subtipos principales de carcinoma de células basales: nodular (60%), superficial (25%), micronodular (15%) y morfeaforme (2%). Los dos últimos subtipos son considerados más agresivos y con un mayor riesgo de recurrencia local que los carcinomas nodulares y superficiales. Es más frecuente en los fototipos claros que en los fototipos oscuros y aparece en lugares del cuerpo expuestos a la radiación solar. Su incidencia aumenta en los lugares cercanos al ecuador.

Este tipo de cáncer se relaciona con una exposición ligada al tiempo de ocio y al periodo vacacional, así como a los episodios de inflamación inducida por la irradiación UV sufrida principalmente en la infancia. También se ha relacionado este tipo de cáncer con infección por papiloma virus. No hay que olvidar el factor genético, ya que la deficiencia de enzimas reparadores, como en el caso del *Xeroderma pigmentosum*, aumentan la propensión a padecer esta enfermedad (Till, 2005). Por otra parte, su padecimiento también se asocia a queratosis actínica y, en menor medida, a telangiectasia facial.

El carcinoma de células escamosas es el segundo cáncer de la piel más común (después del carcinoma basocelular). Esta forma de cáncer de la piel aparece en las células escamosas que conforman las capas suprabasales de la epidermis. Los carcinomas de células escamosas pueden producirse en cualquier parte del cuerpo, inclusive las membranas

mucosas y las áreas genitales, pero son más comunes en áreas expuestas frecuentemente al Sol, como el borde de la oreja, el labio inferior, la cara, el cuero cabelludo calvo, el cuello, las manos, los brazos y las piernas.

La incidencia de carcinoma de células escamosas se asocia a personas de fototipos claros, residentes en áreas de altas irradiaciones solares y/o cercanas al ecuador. Éste aparece en áreas del cuerpo expuestas a la RUV y, a diferencia del otros dos tipos de tumores descritos, no se observa en localizaciones no expuestas a la radiación. Se asocia a una exposición continua y acumulativa, con gran importancia de los episodios de “quemadura solar”; por lo que su incidencia aumenta con la edad. Esta enfermedad está asociada a elastosis solar y, sobre todo, a queratosis actínica.

Clínicamente, el carcinoma espinocelular o de células escamosas se presenta como úlceras superficiales, a menudo con una corteza queratósica elevada y endurecida, o en forma de placas o nódulos. La piel de alrededor por lo general suele mostrar cambios de daño actínico, se presenta como una lesión tumoral, exofítica, de crecimiento moderado en un período de unos meses. Suele ser de un tamaño variable desde unos milímetros hasta varios centímetros dependiendo del tiempo de evolución. El 50-60% de los casos está localizado en cabeza y cuello y el resto se divide en otras zonas expuestas a la luz solar.

Las formas invasivas localizadas, normalmente se inician como una pequeña zona hiperqueratósica y sobreelevada que evoluciona tornándose verrucoso o papilomatoso. A veces, se ulceran y sangran pudiendo invadir estructuras profundas o metastatizar preferentemente a ganglios linfáticos y posteriormente a otros órganos.

Presentan un peor pronóstico aquellos carcinomas espinocelulares mayores de 2 cm, con más de 4 mm de profundidad, gran atíпия celular, invasión perineural, o bien son secundarios a lesiones crónicas o cuando se localizan en ciertas áreas de la cabeza como los párpados, labios, cuero cabelludo y especialmente en pabellón auricular.

Microscópicamente, en el carcinoma espinocelular se advierten varios *subtipos* histológicos:

1) **Convencional**; que se caracteriza por la proliferación de células epiteliales escamosas con núcleos alargados y pleomórficos y mitosis (a veces atípicas) en cantidad variable. Se inicia en la epidermis con crecimiento hacia la dermis, con frecuentes globos córneos y ocasionales imágenes de invasión perineural.

2) **Fusocelular**; que está constituido por células atípicas, fusiformes, eosinofílicas, con núcleos pleomórficos y vesiculares, y con mayor actividad mitótica que el tipo convencional; se desarrolla a partir de la epidermis y tiene un crecimiento dérmico, entre los haces de colágeno, rodeándose de un estroma mixoide. Este subtipo suele asociarse a traumas previos y/o radioterapia. Frecuentemente existe ulceración.

3) **Acantolítico o adenoacantoma o pseudoglandular**, en el que se advierten estructuras tubulares y alveolares formadas por células poligonales, con frecuentes células disqueratósicas y ocasionales células en anillo de sello. Suelen aparecer en cabeza y cuello, como un nódulo ulcerado.

4) **Verruciforme**; que se caracteriza por marcada papilomatosis y acantosis, siendo la porción superficial semejante a la de una verruga vulgar. Presenta escasa atipia citológica, poca disqueratosis y actividad mitótica baja; la reacción fibrosa y la inflamación es menos marcada que en las otras formas, siendo inusual la invasión vascular y/o perineural.

5) **Productor de mucina**; en el que las células neoplásicas son idénticas a las del tipo convencional, pero de mayor tamaño y citoplasma más pálido, con positividad al PAS y al mucicarmín. Ocasionalmente forman estructuras glandulares, remedando a ductos ecrinos. Representa una variante anatomoclínica, por su mayor agresividad.

Según Broders, podemos realizar una gradación histológica atendiendo al porcentaje de células indiferenciadas presentes en el tumor:

Grado I: <25% de células indiferenciadas,

Grado II <50% de células indiferenciadas,

Grado III <75% de células indiferenciadas, y

Grado IV >75% de células indiferenciadas.

Pero esta gradación es de escaso valor pronóstico y se deben incluir también otros criterios histológicos que son importantes de cara al pronóstico incluyen además del grado de diferenciación, el nivel de invasión (mayor riesgo sí invade por debajo de la dermis reticular), el tamaño del tumor (los tumores de más de 2 cm tienen mayor riesgo de metástasis), el neurotropismo, la infiltración linfática y vascular y la presencia de recidivas tumorales.

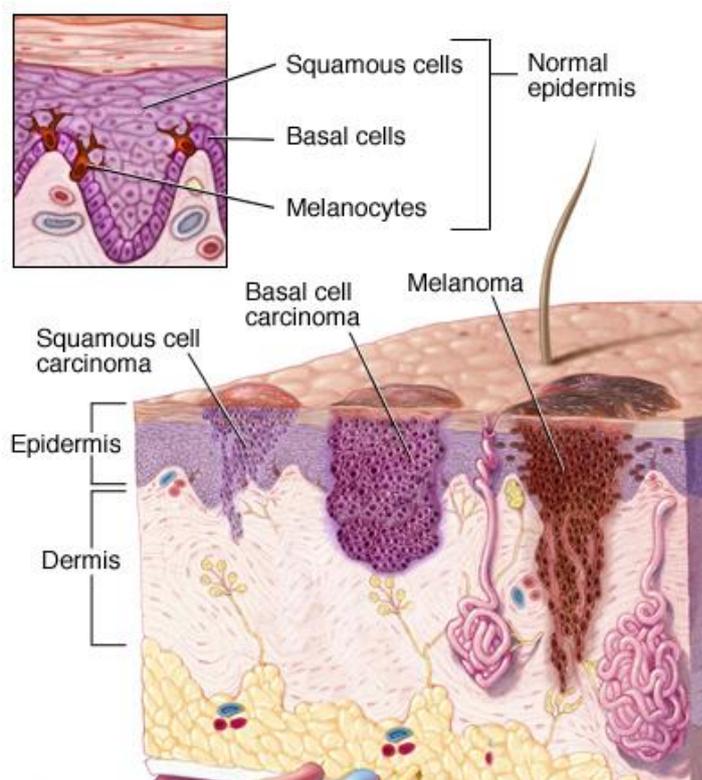


Fig. 3 . Esquema tipos de tumores cutáneos. Corte histológico de la piel

La información acerca de la cinética celular supone una valiosa aportación a las distintas clasificaciones tumorales, basadas

fundamentalmente en la apariencia microscópica (Almendral, 1987; García, 1989). Los distintos métodos de estudio para la evaluación de la proliferación celular permiten determinar con mejor exactitud la tasa de recambio celular en tejidos normales o conocer el porvenir biológico de los tumores (Carey, 1992).

Los estudios de proliferación celular estuvieron durante mucho tiempo restringidos al estudio de la división celular, con el conteo de mitosis celulares. En los últimos años se han utilizado técnicas inmunocitoquímicas, no ya para detectar precursores de la síntesis de ADN incorporados por las células en fase S, sino para detectar antígenos nucleares que se engloban bajo el término genérico de antígenos nucleares de proliferación celular (PCNAs) dado que son estructuras antigénicas que no son observables en células en reposo. El estudio de estos antígenos se ha desarrollado fundamentalmente en el campo de la oncología, dado que su expresión es diferente, tanto cuantitativa como cualitativamente, en células normales y malignas (Busch, 1977; Davies, 1978; Smetana, 1983).

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

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

Mecanismos de defensa de la piel ante el daño inducido por la RUV

En respuesta al daño inducido por la RUV, las células activan mecanismos para el mantenimiento de la homeostasis tisular, siendo de primordial importancia la función de los sistemas de prevención, reversión o anulación de las lesiones en el ADN. Dos características determinan la capacidad de la RUV de penetrar en la piel, éstas son el grosor de la epidermis y la pigmentación de la piel (Costin, 2007). Si la epidermis está engrosada o pigmentada, la RUV en la piel se ve reducida. En respuesta a la RUV, la piel estimula la división de los queratinocitos, lo que conduce al aumento del grosor de la epidermis, y los procesos de melanogénesis y transferencia de melanina a los queratinocitos, favoreciendo la pigmentación de la piel. Estos dos procesos se consideran mecanismos de defensa por su efectividad en la prevención del daño inducido por la RUV.

Por otra parte, la piel también tiene mecanismos que responden al daño, por un lado el sistema antioxidante que reduce el daño oxidativo y por otro los mecanismos de reparación del ADN. El sistema o red antioxidante es un conjunto de moléculas funcionalmente interrelacionadas con el fin de anular, neutralizar o eliminar sustancias capaces de inducir daño oxidativo en las distintas estructuras celulares; por lo que su acción es fundamental para reducir las ERO inducidas por la RUV y prevenir el daño oxidativo derivado de las mismas.

Una vez lesionado el ADN, para evitar que éste se extienda en el tejido, se induce la detención del ciclo celular para la actuación de los sistemas de reparación del ADN, capaces de restablecer el orden con la consecuente supervivencia de las células libres de mutaciones. El fracaso de estos mecanismos reparadores del ADN implica la fijación de la lesión en el material hereditario, por lo que sólo cabe esperar que se induzca la apoptosis de las células transformadas, sacrificio celular en favor de la estabilidad tisular. En algunas situaciones, la inducción de los sistemas de

reparación de ADN o la apoptosis depende del tipo de daño recibido o de la intensidad del mismo.

La acción de los mecanismos de defensa está regulada por la acción de mediadores celulares, como citocinas y factores de crecimiento, y por factores de transcripción, como el p53, NF- κ B y el factor de transcripción Nrf2 regulan la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes, que estimulados por cambios celulares, modifican la transcripción de genes en función de las necesidades celulares.

Cambios en la epidermis

Engrosamiento de la piel. La principal función de la capa córnea es la protección de las capas inferiores, mientras que la melanina ejerce una función parcial (Morales-Molina, 2006). La penetración de la RUV se ve reducida por el engrosamiento de la epidermis siendo menor no sólo la cantidad de radiación, sino también la energía de la misma que alcanza las células de la capa basal (Bruls, 1984). La queratina y otras proteínas del estrato córneo de la epidermis, actúan absorbiendo y dispersando la RUV, así, las palmas de las manos y la planta de los pies son más resistentes a los efectos nocivos de la RUV debido a que son regiones en las que el estrato córneo se halla engrosado (Costin, 2007).

La piel reacciona ante la RUV promoviendo la división de los queratinocitos, alcanzándose el máximo de la tasa mitótica a las 48 horas de la irradiación. Los niveles de queratinocitos por unidad de superficie se mantienen aumentados durante una semana, recuperándose los niveles basales uno o dos meses después de la irradiación (Lee, 2002).

Tras la irradiación de la piel con UV, no sólo se estimula la proliferación de los queratinocitos, sino también su diferenciación (Lee, 2002), lo que favorece que el engrosamiento de la epidermis no se deba principalmente al aumento de la capa basal, sino de cada una de las capas que la forman.

A pesar de que la transmisión de la RUV no se ve afectada por una mayor presencia de agua en la piel, puesto que el agua no absorbe esta radiación (Bruls, 1984), el contenido hídrico sería otro factor a tener en cuenta en la valoración del grosor de la piel. El daño inducido por la RUV puede reducir la cantidad de agua presente en la misma, lo cual, entre otras consecuencias, aceleraría el envejecimiento tisular.

Pigmentación. Está determinada por factores genéticos que condicionan el número de melanocitos, el número y tamaño de melanosomas, la tasa de producción del pigmento y la transferencia de éste a los queratinocitos (Costin, 2007; Parra, 2007). A pesar de la predisposición genética, la pigmentación de la piel puede modificarse por la acción de factores internos, como pueden ser el estrés y los cambios hormonales, o externos como la RUV (Costin, 2007; Brenner, 2008) o algunas sustancias químicas (Costin, 2007).

De las reacciones defensivas de la piel frente a la RUV, la que mejor se observa es la pigmentación, que se debe a la acción de los rangos A y B de la radiación: la radiación UVA es responsable de la oxidación de la melanina, lo que implica un cambio de coloración a corto plazo pero poco duradero; mientras que la acción de la radiación UVB se caracteriza por aparecer más tardíamente y ser más duradera (Morales-Molina, 2006).

La melanina es el principal pigmento de la piel, su función es actuar de filtro frente a la RUV para evitar el daño en el ADN y que dicha radiación alcance zonas profundas de la piel. Su presencia está relacionada con una menor incidencia de cánceres y otras patologías de la piel asociadas a la exposición a la RUV.

En los melanocitos, el pigmento es sintetizado a partir de la tirosina en los melanosomas, vesículas derivadas del aparato del Golgi. Una vez sintetizado el pigmento, los melanocitos transfieren los melanosomas a los queratinocitos, donde se acumulan alrededor de los núcleos celulares, protegiendo el material hereditario del efecto nocivo de la RUV (Costin, 2007).

Pigmentación inducida por la RUV.

La RUV induce el aumento de los niveles de pigmentación actuando, bien sobre los melanocitos directamente, o bien indirectamente a través de los queratinocitos. Además, estímulos nocivos o estresantes pueden estimular la melanogénesis. Así, tras la incidencia de la RUV en la piel, el daño sufrido por el ADN y el aumento de ERO, en especial los peróxidos lipídicos, induce la melanogénesis. Por otra parte, la melanina, principalmente la eumelanina, es capaz de neutralizar ERO, lo cual aumenta su actividad fotoprotectora (Costin, 2007). Además de evitar que la RUV penetre a capas más profundas y favorecer la eliminación de las ERO, la melanina actúa como fotoprotector estimulando la apoptosis de las células dañadas por la radiación (Yamaguchi, 2008).

En los melanocitos, la RUV activa los sistemas enzimáticos implicados en la síntesis de melanina y la tasa de transferencia de melanosomas a los queratinocitos. La RUV actúa sobre los queratinocitos induciendo la síntesis y secreción de sustancias de acción paracrina que estimulan la síntesis de melanina, la transferencia de melanosomas a los queratinocitos y la inducción de cambios en los melanocitos aumentando su número y la ramificación de las dendritas. Además, promueve el cambio de expresión de moléculas de adhesión a la matriz extracelular, facilitando la movilidad de estas células, lo que favorece el aumento del número de melanocitos (Costin, 2007). Además, el aumento del número de queratinocitos inducido por acción de la RUV, conlleva una mayor demanda de melanina, potenciando la estimulación de los queratinocitos sobre los melanocitos.

Fases del aumento de la pigmentación inducida por la RUV

Al igual que ocurre con el proceso de inflamación, en la pigmentación de la piel inducida por la RUV también se pueden distinguir dos fases (Sturm, 1998). En primer lugar se produce una pigmentación temprana o inmediata, de rápida aparición pero poco duradera; comienza a observarse inmediatamente tras la exposición, alcanzándose el máximo 1-2 horas más tarde y recuperándose el nivel basal de pigmentación entre 3 y 24 horas

después. En la pigmentación inmediata se observa la redistribución de los melanosomas en los melanocitos, dirigiéndose principalmente a las dendritas; pero sin acompañarse de aumento del tamaño o del número de melanosomas.

Si el estímulo ha sido fuerte o repetitivo, se induce la pigmentación tardía de la piel que, aunque tarda más en observarse, es más oscura, evidente y duradera que la pigmentación temprana. Se empieza a observar 48-72 horas tras el estímulo, el máximo es a las 3 semanas y no se recupera la pigmentación normal en ausencia de estímulo hasta 8-10 meses más tarde. La pigmentación tardía es debida a que los melanocitos sufren cambios que favorecen su actividad celular, sobre todo de la enzima tirosinasa; aumenta la superficie de los melanocitos, por prolongación de las dendritas, y aumenta el número de melanosomas y de melanocitos (Costin, 2007).

Sistema antioxidante del organismo

Los sistemas antioxidantes o mecanismos de defensa que ha desarrollado el organismo para protegerse de los diversos “ataques” oxidativos, pueden clasificarse en función de su origen en sistemas antioxidantes endógenos, enzimáticos y no enzimáticos, y sistemas antioxidantes exógenos, que se adquieren a través de la dieta.

Estos mecanismos incluyen modos de actuación tanto directos (interacción directa con los EROS) como indirectos (control de la producción endógena de ERO, reparación de moléculas dañadas, defensa física de las dianas biológicas como las membranas, etc...).

Sistemas de defensa de antioxidantes endógenos

Sistemas enzimáticos

Los antioxidantes enzimáticos constituyen la primera línea de defensa antioxidante y previenen el daño oxidativo interaccionando directamente con los EROS. Reaccionan con las diversas especies reactivas, actúan como catalizadores, sólo se necesita que estén presentes en pequeñas cantidades para que ejerzan su protección y son reciclados eficientemente después de su actuación (Kohen, 2002; Lozano, 2005; Halliwell, 2006):

***Superóxidodismutasa (SOD):** es una metaloenzima presente en todos los organismos aerobios que cataliza la conversión del radical superóxido en peróxido de hidrógeno, que posteriormente será convertido en agua por la catalasa (Figura 4).

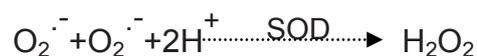


Fig .4. Reacción catalizada por la superóxidodismutasa (SOD).

***Catalasa (CAT)**: es una enzima ampliamente distribuida en bacterias aerobias, plantas y animales, localizada en los peroxisomas y que reacciona con el peróxido de hidrógeno para formar agua y oxígeno molecular; con donadores de hidrógeno como metanos, etanol y fenoles presenta actividad peroxidasa (Figura 5).

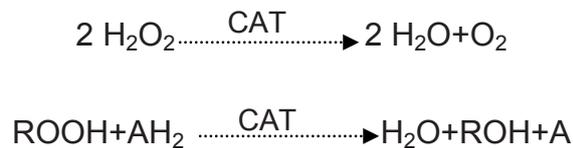


Fig. 5. Reacciones catalizadas por la enzima Catalasa (CAT).

***Glutationperoxidasa (GPx)**: es una enzima dependiente de selenio que cataliza la reducción de hidroperóxidos (ROOH y H_2O_2), utilizando el glutatión (GSH) como donador de electrones (Figura 6). El glutatión oxidativo que se genera (GSSG) puede ser reducido a GSH por acción de una glutatión-reductasa (GRed) dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH).



Fig. 6. Reacción catalizada por la glutatiónperoxidasa (GPx) y la glutatiónreductasa (GRed).

Sistemas no enzimáticos

El sistema antioxidante no enzimático constituye la segunda línea de defensa y está constituido básicamente por antioxidantes de bajo peso molecular (del inglés, low-molecular-weight-antioxidants, LMWA) que forman un conjunto numeroso de compuestos capaces de prevenir el daño oxidativo por interacción directa o indirecta con las ERO (Kohen, 1999).

El mecanismo de acción indirecto implica principalmente la quelación de metales de transición para evitar su participación en reacciones tipo Fenton

o Haber-Weiss (Figura 7). Entre los compuestos que actúan por esta vía encontramos proteínas como la ceruloplastina, la transferrina y la lactoferrina, la haptoglobina y la albúmina (Haber, 1934; Kehrer, 2000; Vertuani, 2004).



Fig. 7. Reacción de Haber-Weiss.

Las moléculas que actúan de forma directa sobre las especies reactivas lo hacen por medio de la transferencia de electrones o por medio del secuestro de radicales evitando así que ataquen las moléculas diana. Además, suelen poseer también capacidad de quelación de metales (actividad indirecta). Por su pequeño tamaño, pueden atravesar las membranas celulares y localizarse cerca de las posibles dianas biológicas; además, la propia célula puede regenerarlas y regular sus concentraciones. Estas moléculas, aunque normalmente actúan como antioxidantes, desarrollan otras funciones biológicas en la célula. Entre estas moléculas destacan:

- El tripéptido glutatión (GSH) en su forma reducida, es el antioxidante que se encuentra en mayor concentración dentro de la célula. Actúa como cofactor de la PGx para detoxificar H_2O_2 y es capaz de interaccionar directamente con EROS como $\cdot\text{OH}$, $\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, HClO y $\text{O}_2^{\cdot-}$. También actúa como agente quelante, y en diversos procesos metabólicos como la comunicación celular o la degradación de proteínas (Ghezzi, 2005).
- La bilirrubina y el ácido úrico se han propuesto como antioxidantes al unirse a metales e impedir reacciones tipo Fenton. El ácido úrico también es eficiente protegiendo contra el ozono (O_3), el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) y RNS (especies reactivas del nitrógeno) (Becker, 1993).

- La histidina y otros compuestos de la misma familia (carnosina, anserina...) que eliminan EROS por secuestro directo de radicales $\cdot\text{OH}$, $\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, uniéndose al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), eliminando $\text{O}_2^{\cdot-}$ o uniendo metales de transición (Kohen, 1988).
- La hormona melatonina, que atrapa gran variedad de ROS además de estimular la síntesis de importantes enzimas antioxidantes (SOD, GPx y GRed) (Reiter, 2001).

Efecto sinérgico de los antioxidantes

Los antioxidantes no enzimáticos que interaccionan directamente con los RL ceden un electrón o un protón al radical, obteniéndose así una molécula relativamente estable derivada del radical. El antioxidante en este proceso queda oxidado y, dado que sólo su forma reducida puede ejercer actividad antirradicalaria, la forma oxidada deberá ser reconvertida a su estado reducido. Además, en su estado oxidado el antioxidante se convierte en una especie radical que puede presentar actividad residual inerte o reactiva; en este segundo caso, podría causar daños en diversas dianas celulares vitales (Cadenas, 1997).

Afortunadamente, el organismo dispone de diversos sistemas antioxidantes que actúan de manera sinérgica, es decir, colaboran entre ellos, reduciéndose químicamente los unos a los otros con el objetivo de disminuir la reactividad del radical antioxidante formado y recuperar el antioxidante reducido para la defensa contra las especies radioactivas (Figura 8) (Vertuani, 2004). Este proceso de regeneración puede ser puramente químico o pueden estar implicadas diversas enzimas. Esta interacción entre antioxidantes es importante, ya que cada antioxidante ejerce preferentemente su actividad secuestradora hacia radicales libres o especies reactivas específicos en compartimentos concretos.

La interacción entre todos los antioxidantes permite que un antioxidante concreto ejerza una defensa óptima contra una especie reactiva

particular y en cualquier parte del cuerpo (Chaudiere, 1999). Además, este “reciclaje” de los antioxidantes oxidados incrementa su eficacia biológica al hacer disminuir la necesidad de sintetizarlos de nuevo o de tener que adquirirlos en mayor cantidad de fuentes externas (nutrientes). Pero se debe tener presente que el hecho de poseer un sistema antioxidante tan complejo e interactivo hace que la deficiencia en uno de sus componentes pueda afectar la eficacia de los otros, y que el déficit de un solo antioxidante suponga una pérdida de protección frente a EROS muy superior a la esperada.

Por último, sólo indicar que el estudio de la interacción entre diferentes tipos de antioxidantes es uno de los puntos básicos del desarrollo de las llamadas “terapias antioxidantes”, que examinan los posibles efectos beneficiosos sobre la salud de la suplementación con diversos antioxidantes (Kohen, 2002; Boots, 2008).

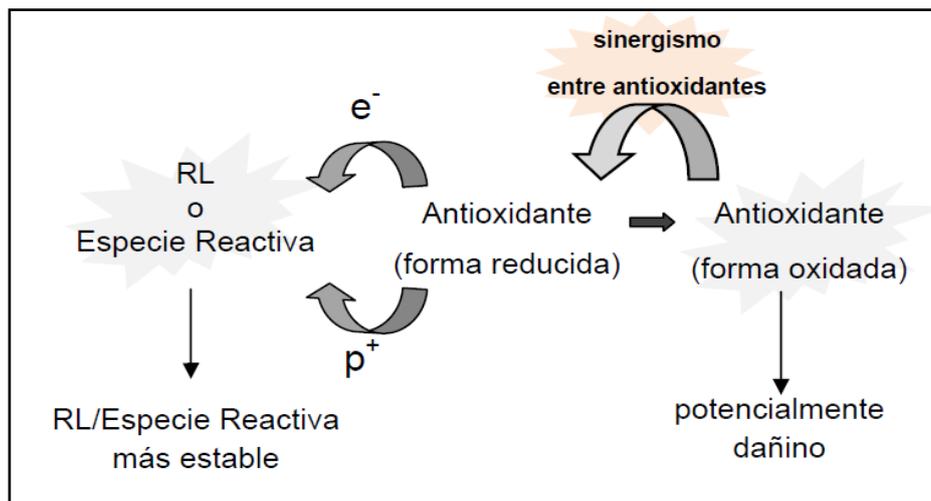


Fig 8. Cuadro, efecto sinérgico de las moléculas antioxidantes

Sistemas de defensa antioxidantes exógenos

La capacidad de nuestro organismo para “luchar” contra las agresiones producidas por las moléculas oxidantes es limitada, por lo que necesita cierta ayuda externa. Los nutrientes básicos que ingerimos a través de la dieta (proteínas, lípidos, vitaminas y minerales) ayudan a los mecanismos de defensa internos contra todas las oxidaciones no deseadas,

ya sea actuando como antioxidantes por si solos o haciendo de cofactores de los sistemas antioxidantes endógenos (Diplock, 1998; Lozano, 2005). Por este motivo, llevar una dieta equilibrada y variada es de vital importancia para mantener el equilibrio redox del organismo.

Nutrientes básicos que adquirimos a través de la dieta:

-Proteínas: un déficit de proteínas en la dieta provocaría una disminución en el aporte de aminoácidos como glutamina, cisteína y arginina, constituyentes de las enzimas, lo que causaría una sobreproducción de radicales libres por disminución de estas enzimas.

-Lípidos: la ingesta de ácidos grasos ω -3 disminuye el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, ya que parecen actuar como inhibidores de la producción de radicales libres aumentando la expresión de genes antioxidantes (Vertuani, 2004).

-Vitaminas: ciertas vitaminas inhiben la producción de NO y otras actúan como sequestradoras de ERO y reguladoras de la actividad de las enzimas antioxidantes. Destacan la vitamina E (α tocoferol), que inhibe la formación de ERO inducida por radicales lipídicos y protege a la célula de la peroxidación lipídica y la vitamina C (ácido ascórbico), una eficaz sequestradora de ERO.

-Minerales: actúan como cofactores de muchas enzimas que participan en la eliminación de radicales libres. Como ejemplos, un déficit en cobre o zinc disminuye la actividad de la superóxido dismutasa y aumenta la actividad del citocromo P-450 estimulando la producción de ERO (Powell, 2000), un aumento de hierro intra o extracelular, estimula la producción de ERO, aumenta la peroxidación lipídica y aumenta la síntesis de NO.

Polifenoles y dieta

Además de nutrientes básicos, a través de la dieta obtenemos también una de las principales fuentes de antioxidantes exógenos, las llamadas sustancias fitoquímicas, que son compuestos procedentes del reino vegetal de estructura química y propiedades muy variadas, que juegan un papel importante en el mantenimiento del equilibrio redox y en disminuir la incidencia del daño producido por los radicales libres, por lo que actualmente se consideran altamente beneficiosos para la salud. Aunque el interés científico por estos compuestos es relativamente reciente (las últimas cuatro décadas), durante siglos han constituido el único remedio natural existente para el tratamiento de enfermedades (Steinmetz, 1996). Multitud de alimentos de origen vegetal contienen extractos con compuestos con actividad antioxidante, por ejemplo, el té verde, el vino tinto o el chocolate.

En la Tabla 5 se recogen las principales sustancias fitoquímicas y su fuente de origen. Cada vez es más probable que los fitoquímicos jueguen un verdadero papel nutricional, ya que cada día la investigación está descubriendo más acerca de sus beneficios. Tal vez algún día estos compuestos se clasifiquen como nutrientes esenciales. De momento, mientras la ciencia sigue avanzando en la caracterización de las propiedades de estos compuestos, la recomendación es seguir una dieta variada que incluya sobre todo la abundancia de fruta y verdura (Ames, 1993; Van Duyn, 2000).

Desde hace miles de años las plantas tienen un uso terapéutico. Una tercera parte de los fármacos más vendidos en el mercado son derivados de plantas, y cada semana se descubre una nueva molécula que puede ser beneficiosa para la salud. La economía global y la salud humana dependen en parte de la capacidad para descubrir medicinas nuevas y efectivas. Sorprendentemente, no son muchos los esfuerzos destinados al hecho de

que las plantas sintetizan moléculas beneficiosas para la salud de otros organismos.

La señal química del estrés ambiental en plantas son los polifenoles, los cuales otorgan protección frente al estrés en los humanos o animales que los ingieren. Esto sugiere la existencia de mecanismos que detecten ese contenido polifenólico inducido por estrés. Así pues, el estrés sucede en las plantas, y los beneficiarios son los animales sensibles a estas señales químicas tras ingerirlas.

Un hecho a tener en cuenta es, contrariamente a lo que se creía hasta hace poco, que muchos de los efectos de los polifenoles pueden no estar ligados a las propiedades antioxidantes intrínsecas, sino a cambios adaptativos que involucren a estas moléculas en la regulación de mecanismos de respuesta al estrés metabólico. Es decir, algunos mecanismos son químicamente simples (por ejemplo, actividad antioxidante), pero otros compuestos parecen actuar como moléculas de señalización o mensajeros químicos (Taylor, 2005; Oliveras-Ferracos, 2011).

Los polifenoles están presentes en las plantas como una mezcla y no como componentes aislados. Varios miles de estos fitoquímicos ya han sido identificados. Los compuestos fenólicos pueden clasificarse de diversas formas, por ejemplo, respecto a su unidad base o a la naturaleza de los grupos funcionales ligados a esta unidad base. La más utilizada es la clasificación que los divide en ácidos fenólicos, flavonoides y, los menos abundantes, estilbenos y lignanos, aunque existen muchos más tipos y estructuras.

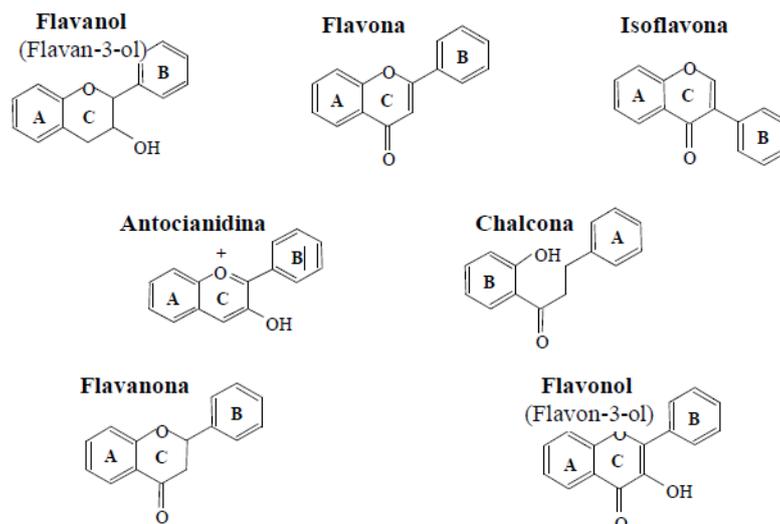


Figura 9. Clasificación de los flavonoides.

Desde un punto de vista estructural, los compuestos fenólicos pueden clasificarse en fenoles simples y polifenoles. Estos últimos se caracterizan por tener uno o más de un grupo fenol, y se dividen a su vez en xantonas, estilbenos, antraquinonas, lignanos (y polímeros de estos) y, los más abundantes, los flavonoides (Figura 9).

Flavonoides

Flavo proviene del latín flavus y significa de color entre amarillo y rojo, como el de la miel o el oro (RAE, 2001). Los flavonoides son los compuestos fenólicos más abundantes en las plantas y pueden ser clasificados como flavonas, isoflavonas, antocianinas y flavanoles (catequinas y proantocianidinas). Estos compuestos están caracterizados por una estructura benzo- γ -pirona (C6 C3 C6). Esta estructura permite la sustitución en diversas posiciones de diferentes grupos funcionales como hidroxilos, metoxilos u O-glucósidos, lo que explica las más de 8000 estructuras caracterizadas hasta la fecha (Benavente- Garcia, 2008).

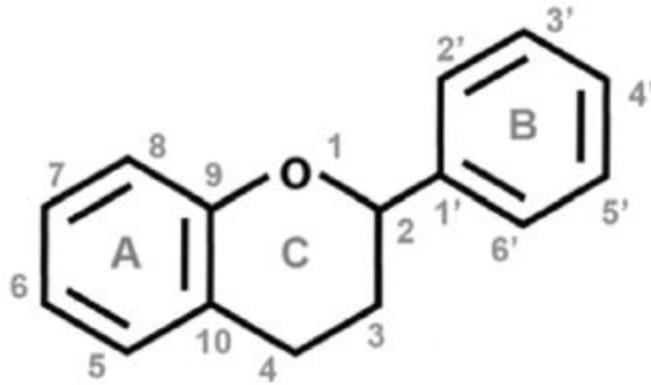


Figura10. Estructura básica de los flavonoides

Los flavonoides son productos del metabolismo secundario de las plantas sintetizados a partir de fenilalanina y desempeñan numerosas funciones. Casi todos son pigmentos que cubren todo el espectro de la luz visible y la ultravioleta. Una de las funciones principales es la atracción de insectos, animales y aves polinizadoras, y la regulación de genes fotosensibles, aunque no participan en la fotosíntesis (Havsteen, 2002). Los flavonoides inhiben o matan muchas cepas bacterianas, inhiben enzimas virales claves como la transcriptasa inversa y la proteasa, y destruyen algunos protozoos patogénicos. Por otro lado, su toxicidad frente a células animales es baja.

Actualmente se acepta que los polifenoles se sintetizan principalmente en respuesta a un gran estrés como periodos prolongados de sequía, la radiación ultravioleta o la infección por patógenos. Por lo tanto, en las frutas y verduras que se cultivan y consumen en las sociedades occidentales, donde las condiciones climáticas no son extremas y se controlan los agentes patógenos con el fin de aumentar la producción, la cantidad de polifenoles es baja o muy baja (algunas excepciones son las cebollas, el ajo y las verduras crucíferas). Simplemente no parece factible poder comer frutas y verduras suficientes para ingerir una cantidad efectiva de polifenoles, aun suponiendo que estos sean muy activos y fácilmente biodisponibles.

De este hecho se infiere que, por un lado, si los polifenoles se asocian con una serie de beneficios para la salud en los humanos, y por otro, el

consumo mayor, la dosis necesaria no puede conseguirse mediante simples cambios en la dieta.

Para aumentar la ingesta de polifenoles, una estrategia complementaria sería la de cambiar ciertas prácticas agrícolas y la fabricación de suplementos dietéticos concentrados. Sin embargo, no sólo deben ser considerados factores cuantitativos, sino también cualitativos. Ciertos polifenoles se encuentran ampliamente distribuidos, mientras que otros son específicos de determinados alimentos, y a menudo, asociados a una mezcla mal caracterizada. Además, el conocimiento de su composición se limita a unas pocas variedades para las que existe un grado aceptable de disponibilidad, precio y aceptación.

Flavonoides en fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis

Recientes avances a nivel celular y molecular de carcinogénesis han conducido al desarrollo de prometedoras estrategias para la prevención del cáncer, lo que llamamos quimioprotección o quimioprevención; que significa un control del cáncer usando sustancias químicas específicas naturales o sintéticas que puedan suprimir, retardar o revertir el proceso de la carcinogénesis. A este respecto, la quimioprevención ofrece una estrategia realista para controlar el riesgo de cáncer. Además, la quimioprevención parece tener implicaciones prácticas en reducir el riesgo de cáncer de piel, porque a diferencia de los factores ambientales cancerígenos que son difíciles de controlar, las personas pueden modificar su estilo de vida, y unos hábitos dietéticos adecuados en combinación con el correcto uso de productos para el cuidado de la piel, pueden ayudar a prevenir el fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis.

Muchos estudios han mostrado la eficacia de los antioxidantes botánicos naturales, como los polifenoles del té verde, silimarina y las proantocianidinas de la semilla de uva sobre la RUV en la inducción de

inflamación, estrés oxidativo, y fotocarcinogénesis (Surh, 1999; Katiyar, 2001; Pinnell, 2003; Nichols, 2010).

La **apigenina** (5, 7,4'-trihidroxi-flavona), es un flavonoide presente en muchas plantas en la naturaleza (endivias, clavo), frutas (manzanas, cerezas, uvas), hortalizas (Lepley, 1996) (habichuelas, brócoli, apio, puerro, cebolla, perejil, tomates), y en algunas bebidas (Janssen, 1998) (té, vino). Tiene propiedades antimutagénicas, antioxidantes, neutralizador de radicales libres, antiinflamatorias y anticarcinogénico (Lepley, 1996; Mc Vean, 2001; Romanova, 2001). Birt y cols (Birt, 1997) publicaron que la aplicación tópica de apigenina, previa a la irradiación con UV, prevenía la tumorigénesis en ratones. En este estudio también se observó que el tratamiento con apigenina inhibía la actividad de la ornitina descarboxilasa, que es considerada como un biomarcador de la promoción tumoral, y reducía la incidencia del tumor, aumentando la supervivencia de los ratones libres de tumor. La regulación del ciclo celular y de las quinasas dependientes de ciclinas (cdk) provocada por la apigenina, también ha sido considerada como un posible mecanismo antitumoral (Mc Vean, 2002).

El tratamiento con apigenina en los queratinocitos de ratones induce la detención del ciclo celular de G2/M, la acumulación de la proteína supresora de tumor p53, y la expresión de cdk (inhibidor de la proteína p21/WAF1), provocando el efecto en cascada de la proteína supresor de tumores p53 (Mc Vean, 2001; Mc Vean, 2002). La detención del ciclo celular también fue acompañado de la inhibición de la actividad a nivel de la proteína quinasa p34/cdk2, que fue independiente de la proteína p21/WAF1 (Mc Vean, 2002).

El **resveratrol** es un polifenol natural, químicamente conocido como *trans*-3, 5, 4'-trihidroxi-*trans*-estilbeno. Es una fitoalexina y ha sido identificada en más de 70 especies de plantas incluyendo uvas, cacahuetes, vino tinto y moras.

Algunos estudios han demostrado que el resveratrol es un potente antimutagénico, antioxidante, antiinflamatorio, antiproliferativo, inductor de la fase II de las enzimas metabolizadoras de fármacos, e inhibidor de la ciclooxigenasas e hidroperoxidasas en diversos sistemas experimentales (Jang, 1997; Aziz, 2003). El resveratrol inhibe diversas fases de la división celular asociadas con la iniciación, promoción y progresión del tumor del cáncer de piel y de cánceres de otros órganos (Jang, 1997; Aziz, 2003; Cal, 2003).

La aplicación tópica del resveratrol antes de la irradiación con UVB provoca una reducción significativa del espesor de los pliegues cutáneos (marca del edema) por la exposición a RUV, así como menor respuesta hiperplásica, infiltración de leucocitos, la generación de peróxido de hidrógeno, peroxidación lipídica y reducción de las actividades de la COX-2 y la ornitina descarboxilasa en ratones SKH-1 (Afaq, 2003 a; Aziz, 2005).

La **silimarina** es un flavonoide extraído de las semillas de cardo de leche o cardo mariano (*Silybum marianum* L.Gaertn), está compuesto mayoritariamente por silibilina ($\approx 90\%$) con pequeñas cantidades de otros esteroisómeros de sibilina (es decir, silidianina, isosilibina y silicritina) (Wagner, 1968). La silimarina posee propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas en modelos animales *in vivo*. Katiyar y cols (Katiyar, 1997) mostraron que la aplicación tópica de silimarina a ratones SKH-1 inhibía la carcinogénesis en la piel inducida por radiación UV en términos de incidencia (75%), multiplicidad de tumores (90%) y tumor volumen/ratón de un 97%. Parece que la aplicación tópica de silimarina también proporciona una protección importante frente al daño del DNA en la piel del ratón inducido por la RUV (Chatterjee, 1996). Así en experimentos a corto plazo, el tratamiento con silimarina inhibió la quemadura solar inducida por RUV, el edema, la apoptosis celular, y la actividad de la COX y la ornitina descarboxilasa en la expresión de ARNm (Chatterjee, 1996; Katiyar, 1997).

Se realizaron y repitieron diversos estudios quimiopreventivos con la silibilina como componente principal, tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro*, y se encontraron efectos fotoprotectores similares a los descritos anteriormente en cuanto al uso de silimarina y silibina (Katiyar, 2005). En estudios *in vivo* con SKH-1 se ha comprobado, que la aplicación tópica de silibilina antes o inmediatamente después de la exposición a RUV, así como el tratamiento oral, ofrece efectos protectores frente a la carcinogénesis en términos de multiplicidad del tumor y volumen del tumor por ratón.

La **silibilina** inhibe la formación de los dímeros de timina en la inducción por RUV en la piel del ratón, siendo un marcador la RUV del daño al ADN y la iniciación de fotocarcinogénesis, e inhibe la apoptosis y los niveles del antígeno en la proliferación nuclear celular por la inducción con UV (Dhanalakshmi, 2004)

El **té verde** (*Camellia sinensis*) es una bebida consumida mundialmente por su olor característico, sabor, y sus beneficios para la salud (Hara, 2001).

Los efectos del té verde, y del té negro también han sido estudiados con detalle en la carcinogénesis cutánea inducida por la RUV (Wang, 1994; Lou, 1999; Lu, 2000; Lu, 2002). Aunque algunas evidencias experimentales, han constatado que los polifenoles presentes en el té verde ((-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-epicatequina-3-galato y (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG)) (Katiyar, 1996; Katiyar, 2001 a) son mejores agentes quimiopreventivos que los presentes en el té negro (Baliga, 2005).

Baliga y cols. 2006, observaron que la administración de té verde, resultaba en un decrecimiento del número de papilomas ($\geq 80\%$),

queratoacantomas (53%), y carcinoma de células escamosas (32%) inducidos con RUVB (60 mJcm²) durante 30 semanas.

Varios modelos animales *in vivo* e *in vitro* han sido usados para examinar los efectos anticarcinogénicos del té verde. Katiyar (1996, 2000, 2001) demostró que la administración oral en el agua de bebida de fracciones polifenólicas aisladas de té verde o polifenoles de té verde (PTVs) a animales de laboratorio resultan en una protección significativa de la carcinogénesis cutánea inducida por RUV en términos de incidencia del tumor, multiplicidad del tumor y tamaño del tumor respecto a los animales que no habían sido alimentados con PTVs (Katiyar, 1996; Katiyar, 2000, Katiyar, 2001 b).

Por consiguiente, tanto la administración oral del té verde en el agua de bebida como la aplicación tópica del mismo, indujo la regresión parcial o la inhibición del crecimiento del tumor de papilomas de piel establecidos en ratones (Wang, 1992).

La aplicación tópica de una pomada hidrófila rica en polifenoles de té verde sobre ratones sin pelo SKH-1 provocó una alta inhibición de la fotocarcinogénesis que no se había observado antes con otros métodos de aplicación.

La protección fue determinada en términos de incidencia de tumor (60% inhibición), multiplicidad de tumor (86% inhibición) y crecimiento de tumor en términos de volumen total de tumor por grupo (95% de inhibición) (Mittal, 2003). Estudios realizados en humanos, también se ha visto reducción de eritema (Katiyar, 1999; Elmetts, 2001).

En cuanto al mecanismo de acción propuesto, algunos autores han descrito una disminución de la actividad de la mieloperoxidasa producida por

las radiaciones, así como la reducción del infiltrado inflamatorio provocado por éstos. Diversos estudios, han verificado que los polifenoles del té verde reparan los daños provocados en el ADN cuando han sido originados por la RUV en la piel. Meeran y colaboradores han postulado que los polifenoles del té verde tienen un importante papel en este proceso: en el mecanismo de la escisión de nucleótidos (NER) involucrado en la reparación del ADN después del fotodaño y la interleuquina-12 (IL-12) (Meeran, 2006 a; Meeran, 2006 b).

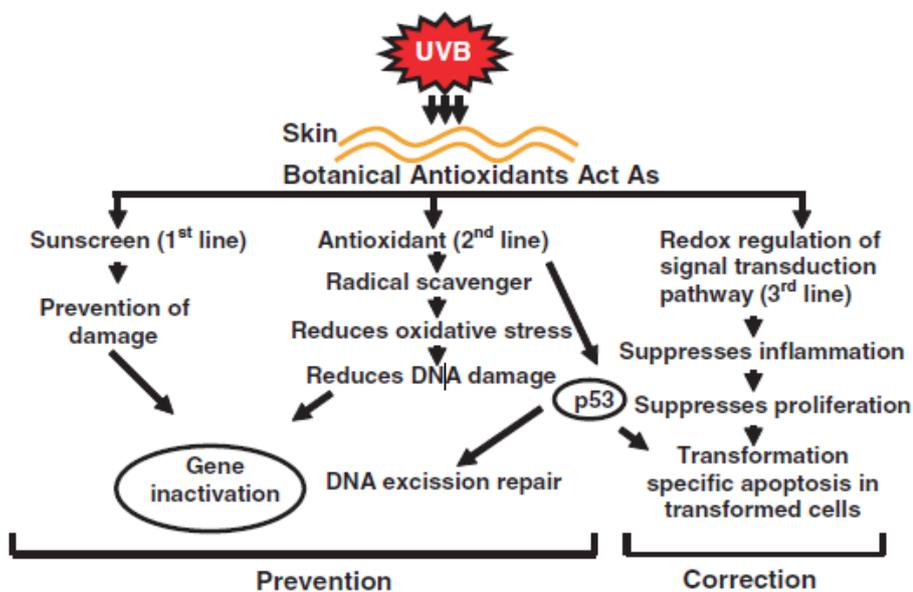


Fig. 11. Mecanismos de acción de los fitoantioxidantes.

ANTIOXIDANTES BOTÁNICOS	MECANISMO DE ACCIÓN	REFERENCIAS
TÉ NEGRO, VERDE O AZUL	Inhibe la carcinogénesis cutánea inducida por UV-B.	F`guyer, 2003; Afaq, 2005; Afaq, 2002; Wang, 1992
	Inhibe el eritema, el edema, el agotamiento del sistema enzimático antioxidante, y la actividad OCD y COX-2, inducidos por UV-B.	F`Guyer,2003; Afaq,2005;Afaq, 2002;Elments,2001.
	Mejora los aumentos inducidos por UV-B en el número de p53 y p21 de células positivas en la epidermis.	F`Guyer,2003;
	Reduce el tamaño de la almohadilla de grasa parametrial y el espesor de la capa de grasa dérmica.	Lu, 2000.
	Inhibe la expresión inducida por la radiación UV-B de las MMPs.	Vayalil, 2004.
	Reduce la radiación UV-B inducida por entrecruzamiento de colágeno.	Rutter, 2003.
	Reduce la producción de IL-10 e IL-12.	F`Guyer, 2003; Afaq, 2002.
	Inhibe la UV-B induce la liberación de H ₂ O ₂ intracelular y la fosforilación de MAPK y las vías de NF-kB.	Katiyar, 2001; Afaq, 2003; Afaq, 2003 a
EXTRACTO DE GRANADA	Mejora la velocidad y el grado de desaparición de la expresión de células p53 mutadas positivas.	Kramata, 2005; Lu, 2005.
	Inhibe la UV-B induce la fosforilación de MAPK y la activación de las vías de NF-kB.	Afaq, 2005
	Inhibe la fosforilación de STAT3, AKT, y ERK1/2.	Syed, 2006.
	Inhibe el edema inducido por UV-B, la hiperplasia, la infiltración de leucocitos, generación de peróxido de hidrógeno y el daño en el ADN en la forma de CPDs y 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina.	Afaq, 2006.
RESVERATROL	Mejora e incrementa la expresión de proteína p53 y p21 expresión de la proteína inducida por UV-B	Afaq, 2006.
	Inhibe la inflamación de la piel UV-B inducida y edema.	Afaq, 2003.
	Inhibe la activación UV-B inducida por NF-Kb.	Adhami, 2003.
	Modula la red cki.cyclin-cdk y la vía MAPK.	Reagan-Shaw, 2004.
	Inhibe la incidencia del tumor y retrasa la aparición de la tumorigénesis.	Aziz, 2005.
GENISTEINA	Inhibe la proliferación celular y la fosforilación de survivina..	Aziz, 2005 a
	Inhibe la unión al ADN de STAT1 inducida por UV-A, actuando como un inhibidor de la TPK.	Maziere, 2000.
	Reduce la expresión de c-fos y c-jus.	Wang, 1998.
	Reduce el edema y la hipersensibilidad por contacto.	Widyarini, 2001.
	Inhibe la carcinogénesis cutánea y el fotoenvejecimiento.	Wei, 2003.

Tabla 5. Fitoantioxidantes en la prevención de la fotocarcinogénesis y fotoenvejecimiento.

Descripción botánica. Se trata de un atractivo arbusto o árbol pequeño, de 20 ó 30 pies (6 ó 10 metros) de alto, el árbol de granada es muy ramificado, más o menos espinosos y con una vida muy larga, algunos especímenes en Versalles se sabe que han sobrevivido por dos siglos.

Las hojas son caducas, opuestas o en verticilos de 5 o 6, de tallo corto, oblongo-lanceoladas, de unos 10 cm de largo. En la punta de las ramas se encuentran flores vistosas, solas o en racimos de hasta 5 flores. Las flores son de unos 3 cm de ancho y se caracterizan por el espesor, cáliz tubular, de 5-8 sépalos carnosos y puntiagudos formando un jarrón del que emergen los 3 a 7 plisados, pétalos de color rojo, blanco o jaspeado que encierran numerosos estambres. La fruta tiene una piel dura en forma de cáscara, con el fondo de color más o menos amarillo y rojo intenso. El interior está separado por paredes membranosas y el tejido blanco esponjoso en compartimentos llenos de bolsas transparentes llenas de una pulpa carnosa, sabrosa y jugosa. En cada saco, hay una semilla de color blanco o rojo, angular, blanda o dura. Las semillas representan aproximadamente 52% del peso de la fruta entera.

***Punica granatum* y la medicina tradicional.** Antes de que sus propiedades medicinales fueran descritas, el E. granada era considerado sagrado por muchas de las principales religiones del mundo. El E. granada representa la vida, la regeneración y el matrimonio en la mitología griega, la invencibilidad de la mitología persa, y la esencia de la influencia favorable en el arte budista. El E. granada simboliza la fertilidad, la abundancia y la prosperidad en Japón y el arte chino, así como entre los beduinos de Oriente Medio, la resurrección y la vida eterna en el arte cristiano.

En España, las granadas proliferaron sobre todo en el sur de la Península, donde finalmente la ciudad de Granada tomó nombre. Con la conquista de América, los colonos españoles llevaron esta fruta al continente. No se sabe si este árbol se cultivó con éxito en Nuevo México en la época colonial, pero actualmente, su cultivo sí que está generalizado en las zonas de Sudamérica y el sur de Estados Unidos. Ha sido una fruta con

un gran simbolismo religioso, mítico y metafórico a lo largo del tiempo, y su historia, se remonta varios siglos antes de Cristo. Se la considera un símbolo de fertilidad, de nacimiento y de vida eterna por su gran número de semillas en su interior. Una de las primeras referencias a la granada se encuentra en el mito griego de Deméter y Perséfone. Según este mito, el primer granado fue plantado por Afrodita, la diosa griega del amor, mientras que el dios del infierno, Hades, le ofreció su fruto a la bella Perséfone para seducirla. En el Corán, las granadas son mencionadas como uno de los dones de Dios. En el judaísmo, se decía que en la granada había 613 semillas que representaban los 613 mandamientos de la Torá, y fue utilizada a menudo para decorarla.

La granada posee un bajo valor energético, 100 g de porción comestible aportan unas 60 - 70 kcal. Este bajo nivel calórico es debido a que los componentes mayoritarios son el agua (aprox. 80%) y los azúcares (12%-17%), que son principalmente glucosa y fructosa. La cantidad de grasa y proteína es casi despreciable. En cuanto a las vitaminas destacan la vitamina C, vitamina A, vitamina B1, vitamina K y beta carotenos. Sobre los minerales: el hierro, el calcio, el zinc y sobre todo el potasio.

En la granada, a parte de los azúcares, vitaminas y minerales, se han identificado más de 100 compuestos diferentes, entre los que destacan: ácidos orgánicos, flavonas, flavonoles, antocianos, alcaloides, esteroides, glucósidos, taninos, polifenoles varios y punicalaginas; todas estas sustancias, típicas del metabolismo secundario del árbol, tienen la función de protegerlo frente a agresiones y enfermedades externas como las parasitarias y microbianas, y aportar el color y el aroma característicos a sus frutos. Según algunos estudios comparativos realizados con esta fruta, la granada tiene un poder antioxidante tres veces superior al del té verde y del vino tinto. Esto es debido sobre todo a la acción de los polifenoles, el ácido elálgico y los taninos hidrolizables.

Según la parte del árbol, raíz, corteza, flor, fruto o semillas, la concentración de estas sustancias puede variar. Determinadas partes de la planta son más ricas en taninos, como la corteza, raíz y las hojas, y otras

son más ricas en antocianos, ácidos orgánicos y polifenoles, como la fruta. La medicina tradicional, sin tener los datos que se poseen ahora, ya utilizaba las diferentes partes del árbol para paliar una u otra enfermedad. Las decocciones de la raíz y la corteza, ricas en taninos y en un alcaloide llamado peleiterina, son usadas para tratar diarreas y problemas de parasitismo intestinal. Sin embargo, el zumo de la granada, gracias a su composición nutricional, es usado para problemas pulmonares, inflamación de encías y pieles agrietadas.

Farmacología *in vitro* e *in vivo*. *In vivo*, los extractos y los fenoles del Extracto de granada han demostrado actividad antioxidante. El óxido nítrico protege de la destrucción oxidativa y reducción de estrés oxidativo de los macrófagos (Gil, 2000; Ignarro, 2006; Li, 2006; Rozenberg, 2006; Aviram, 2008). Otros estudios demostraron que el extracto de granada puede retardar la proliferación de células de cáncer de próstata (Malik, 2005; Malik, 2006; Pantuck, 2006) a través de la inhibición del enzima citocromo P450, o como gen que regula la síntesis de la misma (CYP1B1) (Kasimsetty, 2009) así como células de cáncer de colon (Kasimsetty, 2010). Se ha sugerido que los efectos antioxidantes / antiaterogénicos ejercidos por el jugo de granada podría ser debido a la presencia de azúcares complejos únicos y / o azúcares fenólicos (Rozenberg, 2006). Las punicalaginas fueron propuestas como los activos de los elagitaninos anoméricos responsables de más del 50% del potencial antioxidante del jugo (Cerdeira, 2003 a).

Los estudios en animales se han centrado en el efecto de la granada en la hipertensión y la función arterial. En ratas Wistar diabéticas, una administración crónica del extracto de granada (100 mg/kg y 300 mg/kg; durante 4 semanas) redujo la presión sanguínea arterial media y revirtió los cambios bioquímicos inducidos por la diabetes y Angiotensina II, probablemente por la inhibición de la actividad de enzima convertidora de angiotensina (IECA) (Mohan, 2010). En ratas Zucker obesas, la suplementación con extracto de granada disminuyó significativamente la expresión de marcadores de inflamación vascular, trombospondina y citoquinas, factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFbeta1) ($p < 0,05$)

y el aumento de la expresión de la oxido nítrico (NO) sintasa endotelial. El nitrato del plasma y los niveles de nitrito se incrementaron de manera significativa por los extractos de fruta de la granada ($p < 0,05$). Este estudio concluyó que los extractos de granada pueden ejercer efectos beneficiosos sobre la función arterial en ratas Zucker obesas (de, 2007).

Farmacología clínica. Los extractos de granada han demostrado potencial quimiopreventivo en varios estudios *in vivo* e *in vitro*: Sobre el cáncer de colon (Kasimsetty, 2010), el cáncer de mama (Khan, 2009), el cáncer de próstata (Lansky, 2005; Malik, 2005; Malik, 2006; Pantuck, 2006; Kasimsetty, 2009) y el cáncer de piel (Afaq, 2005 a; Afaq, 2006 a; Syed, 2006).

Extracto de fresno

El Extracto de fresno usado en nuestro estudio proviene del polvo de la semilla de la planta *Fraxinus excelsior* L. Pertenece a la familia de las Olanaceas, también conocida como fresno común o fresno europeo. Los ingredientes activos contenidos en el E. fresno son los secoiridoides, nuzhenida y GI3. El E. fresno fue notificado con éxito como un ingrediente alimentario para su uso en complementos dietéticos en la Unión Europea.



Descripción botánica y usos en la medicina herbal tradicional.

Tradicionalmente, las semillas de *Fraxinus excelsior* L. se han consumido como frutos encurtidos y como condimentos en la Unión Europea. Extractos de las semillas y las hojas de *Fraxinus excelsior* también han sido usadas en la medicina popular en Marruecos por sus propiedades antihiper glucémicas (Eddouks, 2004; Eddouks, 2007). Los extractos de las semillas son caracterizados por diferentes clases de compuestos incluyendo glucósidos secoiridoides, cumarinas, flavonoides, feniletanoides, benzoquinonas, derivados del indol y compuestos fenólicos simples (Bai, 2010).

Farmacología *in vitro* e *in vivo*. El E. fresno se estudia para su uso en el manejo de los factores de riesgo asociados con el síndrome metabólico, como la obesidad, hiperglucemia y la hipertensión. También para aumentar la pérdida de peso en personas con sobrepeso por la inhibición de la diferenciación de adipocitos y por la inhibición del metabolismo de los lípidos a través del aumento de la modulación de la vía de señalización de los receptores activados de proliferación de los peroxisomas alfa (PPAR α), la cual está involucrada en la regulación del metabolismo de lípidos y la homeostasis energética (Bai, 2010). Se ha propuesto que el E. fresno posee un efecto de disminución de los niveles de

glucosa en sangre en individuos hiperglucémicos; el mecanismo de acción actualmente se desconoce, pero puede estar implicado en la reabsorción renal de la glucosa (Ibarra, 2011). Según el estudio de Eddouks, podemos observar que el E. fresno tiene un efecto de disminución de los niveles de glucosa en sangre, particularmente en pacientes con hipertensión. Este resultado puede surgir, al menos, en parte como consecuencia del efecto diurético que posee dicho producto (Eddouks, 2005).

Además de los efectos comentados anteriormente, los extractos de estas semillas se sabe que tienen propiedades antioxidantes (Meyer, 1995; Schempp, 2000; Middleton, 2005), antiinflamatorias (El-Ghazaly, 1992; Von Kruedener, 1995), antireumáticas (Von Kruedener, 1995; Gundermann, 2007), analgésicas (Okpanyi, 1989) y antipiréticas (Sthehl, 1995).

En la bibliografía consultada, no hemos encontrado estudios sobre el posible efecto protector del fresno frente al fotoenvejecimiento o la fotocarcinogénesis. Solamente, en el trabajo de Sardari (2009), se habla de posibles efectos sobre el cáncer, pero desde un punto de vista bioinformático, donde, usando algoritmos matemáticos y ensayando con líneas celulares cancerígenas se llega a la conclusión de que ciertos extractos herbales; entre ellos el *Fraxinus excelsior*, inducen a la citotoxicidad en líneas de células cancerosas.

Extracto de uva

El Extracto de uva de nuestro estudio es un extracto seco, natural, obtenido a partir de un proceso tradicional con las uvas enteras. *Vitis vinifera*, es una planta perenne, enredadera, leñosa, trepadora, de tallos que pueden llegar a superar los 35 m de largo, pero que por la acción del ser humano para el cultivo se reduce generalmente por la poda anual a 1-3 m; hojas delgadas, de circular a circular-ovaladas, zarcillos ramificados, normalmente frente a dos de cada tres hojas, numerosas flores en panículas densas o tirso de hojas opuestas; racimos de flores y zarcillos ausentes en cada nodo tercero; cáliz muy breve con 5 lóbulos, pétalos alrededor de 5 mm, de color verde pálido, con olor dulce, una fruta blanda, carnosa, baya pulposa, piel adherida a la pulpa, ovales u oblongas, elipsoide a globosa, piel verde, amarillo, rojo o púrpura-negro, en grupos grandes, largas, semillas 2-3, a veces ninguna, piriforme, con el pico más bien largo, cuyo diámetro medio es de 1,6 centímetros y su peso 200-350 gramos. Las uvas son ricas en polifenoles y el 60-70% de ellos se encuentran en las semillas. Entre éstos se incluyen derivados flavan-3-ol - catequinas, epicatequinas y oligómeros de proantocianidinas (Zhao, 1999).



Las uvas son originarias de Asia Menor, donde aún crecen las uvas silvestres. Su cultivo se limita principalmente al hemisferio Norte, siendo la uva uno de los primeros cultivos realizados por el ser humano para su consumo. Se conocen muestras de semillas cultivadas durante el período Neolítico en yacimientos arqueológicos de Suiza, Italia y tumbas faraónicas del antiguo Egipto. Los expertos localizan el origen del cultivo de la uva en

las orillas del Mar Caspio, dispersándose hacia el resto de Europa a través del comercio del Mediterráneo. El desarrollo de las plantaciones de uva fue extendido por las civilizaciones romana, y griega; ambas desarrollaron en gran medida la vinicultura, e incluso la introdujeron en países fríos del norte de Europa, donde protegían los frutos con cristal y llegaron a construir invernaderos con calefacción para proteger las uvas, aumentando así extraordinariamente la calidad. La historia de la uva, siempre se ha visto ligada a la elaboración del vino. Hay un gran simbolismo con esta fruta en religiones como la judía y la cristiana.

El Extracto de uva, uso en la medicina tradicional. La savia de las ramas jóvenes se utiliza como remedio para enfermedades de la piel. Las hojas tienen propiedades astringentes, utilizadas en la curación de la diarrea. El zumo de la fruta inmadura también es astringente, y se usa en afecciones de garganta. Se consume como demulcente en fruta seca, como refrescante, como endulzante, laxante estomacal, utilizada para saciar la sed, la fiebre, tos, ronquera, y en enfermedades debilitantes. Una cataplasma hecha de las semillas. Se dice que es un remedio popular para los condilomas de las articulaciones. La fruta, preparada de diversas formas, se dice que es un remedio para los tumores uterinos, dureza del hígado, tumores y cáncer. El zumo, preparado de varias maneras es un remedio para los tumores de amígdala, hemorroides tumores bucales, induraciones, tumores del cuello, y tumores crónicos. ([Http: //www.hort. purdue.edu / newcrop / duke_energy / Vitis_vinifera.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Vitis_vinifera.html)). 1998.

Farmacología *in vitro* e *in vivo*. Los efectos antioxidantes de los polifenoles de uva, observados *in vivo*, se puede explicar por diversos mecanismos:

- El aumento de la capacidad de antioxidantes endógenos mediante la conservación de otros antioxidantes tales como la vitamina E (Frank, 2002; Lafay, 2005).

- La quelación de metales diferentes (principalmente Fe y Cu), que están implicados en la producción de iones superóxido y la peroxidación

lipídica (Marmolle, 1998; Korkina, 1997; Fernández, 2002; Mira, 2002; Hynes, 2004).

- Los efectos mediados alrededor de las células, tales como efectos anti-inflamatorios o anti-proliferativos (Middleton, 2000).

Aparte de sus efectos antioxidantes no específicos, los polifenoles de los extractos de semillas de uva también puede mostrar efectos beneficiosos a través de la interacción con la membrana celular, así como con enzimas específicas, factores de transcripción y receptores (Fraga, 2010).

Farmacología clínica. Los polifenoles presentes en la semilla de la uva presentan actividad anti-inflamatoria, anti-apoptótica, anti-necrótica y anticancerígena, y tienen efectos beneficiosos en varias enfermedades, incluyendo el envejecimiento de la piel y cáncer (Fazekas, 2003). Se ha demostrado que ejercen un efecto de barrido de radicales libres del oxígeno mucho más fuerte que la vitamina C y E y evitan que los rayos UVB produzcan peroxidación lipídica (Zhao, 1999; Mittal, 2003). Se demostró que la alimentación con extractos de semillas de uva a ratones SKH-1 conseguía la prevención de la fotocarcinogénesis inducida por UVB en términos de reducción de la incidencia de tumores, número de tumores y el tamaño del tumor. También dio lugar a la reducción de la transformación maligna de papilomas a carcinomas (Mittal, 2003).

Existen numerosos estudios que demuestran una gran actividad antioxidante y de reducción de radicales libres de las proantocianidinas (da Silva, 1991; Maffei-Facino, 1994; Koga, 1999). Se ha demostrado que los extractos de semillas de uva son más eficaces para eliminar radicales libres que las vitaminas C y E (Bagchi, 2000).

Estudios *in vitro* muestran que los queratinocitos epidérmicos humanos (NHEK) tratados con estas semillas frenan el estrés oxidativo inducido por la RUV, lo cual se debe a una inhibición de la liberación de metabolitos originados por la UVB. Entre ellos figura peróxido de hidrógeno

(H₂O₂), peroxidación lipídica, oxidación proteica, daño del ADN. Por otra parte, capturan radicales libres y aniones superóxido.

El tratamiento con las semillas de la uva también produce con posterioridad una depleción de los componentes de la defensa antioxidativa, inducida por la UVB, tales como glutatión, peroxidasas, catalasas y superóxidodismutasa (Mantena, 2006). Las vías moleculares responsables del efecto fotoprotector de las semillas parecen ser las que modulan las señales de activación de la proteinquinasa (MAPK) y del factor nuclear kappaB (NFkapaB) (Sharma, 2007).

En ratas, la ingesta de proacantocianidinas de las semillas de uva inhibe la inducción de cáncer de piel inducida por la RUV. El protocolo para evaluar la carcinogénesis inducida por UVB en las ratas demostró una menor incidencia, así como en el número y tamaño de los tumores (Mittal, 2003). La ingesta de semillas modularía la inmunosupresión por UVB al reducir la interleuquina IL-10, una citoquina supresora, así como también estimula la citoquina inmunoestimuladora IL-12, siendo probablemente este mecanismo el que explica el efecto del extracto de semillas de uva en la prevención de la carcinogénesis en ratas (Sharma, 2006).

No existen estudios similares en humanos. Sólo se sabe que la aplicación tópica de extractos de semilla potencia el factor de protección solar. Diversas formulaciones cosméticas contienen este extracto, el cual también es un ingrediente popular en los productos “orgánicos”. Se requieren nuevos estudios para evaluar los efectos en la piel humana de estos extractos en forma tópica.

Modelos animales

Un modelo animal puede definirse como el uso de un animal de experimentación que reproduce una enfermedad (o proceso de una enfermedad) de manera más o menos parecida al humano para permitir su conocimiento o abordaje mediante diferentes técnicas terapéuticas. Mediante el modelo animal se quiere estudiar la biología o la conducta, investigar un proceso patológico inducido o espontáneo y que el fenómeno se parezca al menos en un aspecto a ese mismo fenómeno en el hombre o en otra especie animal.

Para comprender los mecanismos moleculares responsables del fotoenvejecimiento, ampliamente estudiados, se han utilizado células cultivadas (modelos *in vitro*), animales de experimentación y seres humanos (modelos *in vivo*) (Benavides, 2009; Hachiya, 2009). Los modelos *in vivo* en el estudio del fotoenvejecimiento o carcinogénesis, se clasifican en: espontáneos, inducidos, negativos y huérfanos (Zúñiga, 2006).

El estudio del fotoenvejecimiento con modelos animales se remonta a tiempo atrás. Al principio se usaban diferentes especies animales con pelo, ratones (Sams, 1964), ratas (Nakamura, 1968) y cobayas (Kligman, 1982). En el caso de los ratones, los que se utilizaron en un principio fueron los Balb/c ó Swiss (Gomez, 2007).

El uso de estos modelos obligaba a depilar o rasurar los lomos, o partes del animal que iban a estar expuestas a las radiaciones. A parte del inconveniente y el estrés que ocasionaba el afeitado o depilación, los animales con pelo requerían dosis superiores para desarrollar lesiones y sus respuestas no solían imitar a lo que ocurre en la piel humana.

Con el objetivo de hacer más cómoda la irradiación y poder observar las lesiones desarrolladas más fácilmente, empezaron a buscarse modelos animales sin pelo. En este sentido el ratón hairless o ratón desnudo, es un modelo mutante natural, empleado en estudios inmunológicos, oncológicos y enfermedades infecciosas, debido a que no presentan timo y por lo tanto

carecen de linfocitos T o timocitos, y el modelo animal más usado en estudios de fotoenvejecimiento y fotocarcinogéneis.

El primer estudio diseñado específicamente para inducir fotoenvejecimiento en un modelo de ratón sin pelo fue llevado a cabo por Berger y sus colaboradores en 1980. Emplearon ratones desnudos albinos (NGI), un animal que normalmente tiene bien desarrollada la red de fibra elástica. En este ratón también se forman por completo folículos activos que producen un pelo defectuoso que no persiste cuando llega a la superficie de la piel. Los animales fueron irradiados con UV-A filtrada (longitud de onda: de pico 365 nm), todos los días 16 horas. Se necesitaron exposiciones durante 8,5 meses para producir elastosis.

En 1984 Poulsen y cols. utilizaron una cepa de ratón sin pelo ligeramente pigmentado (Oslo / BOM cepa endogámica). Tras someterla a diferentes combinaciones de UV-B (Tubos Westinghouse FS y UV-A (tubos con y sin filtro, pico 365 nm), observaron la elastosis producida. Vieron que esta no era significativa tras 3-6 meses de exposición exclusiva a UV-A, mientras que tras 3 meses de exposición a UV-B, se producía una elastosis moderada. La exposición secuencial a radiación UV-B y una gran dosis de UV-A, produjo elastosis severa. Una irradiación moderada de UV-A, junto con UV-B, produjo una ligera reducción del grado de elastosis frente a la exposición a rayos UV-B solos.

Por este motivo, en la actualidad los ratones sin pelo más utilizados para el estudio del fotoenvejecimiento y la carcinogénesis son el Skh-hairless-1(albino) y el Skh-hairless -2) (lightly pigmented), criados originariamente en el hospital oncológico y de la piel de la Universidad de ciencias de la salud de Temple en Filadelfia, pero hay que señalar, que a diferencia de los modelos sin pelo habituales, estos no desarrollan inmunosupresión (Kligman, 1991).

En casi todos los modelos animales de fotoenvejecimiento se repite el mismo patrón o las mismas lesiones, las más frecuentes causadas por el fotoenvejecimiento, similares a las producidas por el fotodaño humano, como

pueden ser: engrosamiento epidérmico, la infiltración de la dermis con las células inflamatorias, la inducción de tumor, el factor de necrosis α (TNF-) ARNm, la acumulación de glicosamionoglicanos, particularmente hialuronato en la epidermis y la pérdida de colágeno, en la patogénesis del fotoenvejecimiento, tanto a nivel celular como molecular (Meena, 2011).

El modelo de ratón SKH-1 es un modelo espontáneo, donde la variable a investigar aparece de forma natural, a partir de la variabilidad genética. Habitualmente, se obtienen por selección de entre los animales consanguíneos o genéticamente uniformes que expresan esa variable o de entre poblaciones en que el número de individuos expresan la variable en cuestión. En numerosos trabajos se muestra como válido y efectivo el modelo animal de fotocarcinogénesis con SKH-1 (Wang, 2002; Cho, 2007; Kundoor, 2007; Cano, 2010; Cherng, 2011; Sharma, 2011).

Objetivos

III. Objetivos

Objetivos generales:

1. Estudiar el efecto de la exposición crónica a la radiación ultravioleta en un modelo de fotoenvejecimiento cutáneo animal.
2. Comprobar el efecto del tratamiento con los extractos de granada, fresno y uva frente al daño provocado por las radiaciones.

Objetivos específicos:

1. Estudiar macro y microscópicamente las lesiones desarrolladas por los animales.
2. Determinar la tasa de proliferación celular en los tumores desarrollados mediante la inmunotinción con el anticuerpo anti-PCNA.

Material y métodos

IV. Material y métodos.

Animales

Hemos utilizado 48 ratones hembras SKH-1/CRL, procedentes del Servicio de Animales de Laboratorio (SAI; nº. REGA ES300305440012) de la Universidad de Murcia. Fueron mantenidos en jaulas (40x30 cm) y recibieron comida y agua "ad libitum". La habitación donde fueron alojados tenía un ciclo controlado de 12/12h luz/oscuridad y a una temperatura de 22°C, de conformidad con las normas de la Unión Europea.

Todos los animales usados en este estudio han sido mantenidos siguiendo las directrices sobre protección de animales utilizados en experimentación (Directiva 2010 /63/ UE). Este experimento fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia.

El modelo de ratón SKH-1 es un modelo espontáneo, donde la variable a investigar aparece de forma natural, a partir de la variabilidad genética. Habitualmente, se obtienen por selección de entre los animales consanguíneos o genéticamente uniformes que expresan esa variable o de entre poblaciones en que el número de individuos expresan la variable en cuestión.



Fig.12 Ratón SKH-1.

Equipos

- ✓ Lámpara: el modelo de lámpara utilizado para la irradiación fue el Philips Tipo HB 554/O1/A con 8 tubos Philips Performance S100W, que emite en un espectro de 220 a 425nm y un pico máximo de 364nm (98,6% UVA y 1,45 UVB).



Fig.13 Lámpara Philips empleada en el estudio.

- ✓ Microscopio óptico: Leica DM 4000 B, Laboratorio: Leica Microsystems AG., Solms, Alemania.
- ✓ Microscopio óptico (Servicio Universitario de Microscopía, SAI, Universidad de Murcia): Leica DM 6000B, Laboratorio: Leica Microsystems AG., Solms, Alemania.
- ✓ Microscopio: Leica SCN400F
- ✓ Cámara Canon EOS 500D
- ✓ Papel milimetrado (morfometría).

Agentes: compuestos fenólicos

Para los ensayos, hemos utilizado los siguientes extractos fenólicos:

- ✓ Extracto de granada: *Punica granatum L.*, Laboratorio Naturex S.L, Avignon, Francia.
- ✓ Extracto de fresno: Corteza de la semilla del *Fraxinus excelsior L.*, Laboratorio Naturex S.L, Avignon, Francia.
- ✓ Extracto de uva: *Vitis vinifera L.*, Laboratorio Naturex S.L, Avignon, Francia

Extracto de granada

El extracto de granada de Naturex se obtiene a partir de la corteza de *Púnica granatum L.* La relación planta-extracto está comprendida entre 5:1 y 7:1. La extracción del disolvente contiene 70% de etanol / 30% de agua. Los polifenoles del E. granada, en particular elagitaninos, taninos hidrolizables que liberan ácido elágico en el tracto gastrointestinal, pueden estar implicados en los beneficios cardiovasculares de estos extractos (Espin, 2007).

Las punicalaginas son elagitaninos específicos del E. de granada. El zumo de E. de granada puede contener 2020-2660 mg/L de elagitaninos y ácido elágico, y 1500-1900 mg/L de punicalaginas (Gil, 2000; Larrosa, 2010). La punicalagina es exclusiva de la fruta de la granada y puede ser utilizada como un marcador de control de calidad del jugo o extracto (Zhang, 2009).

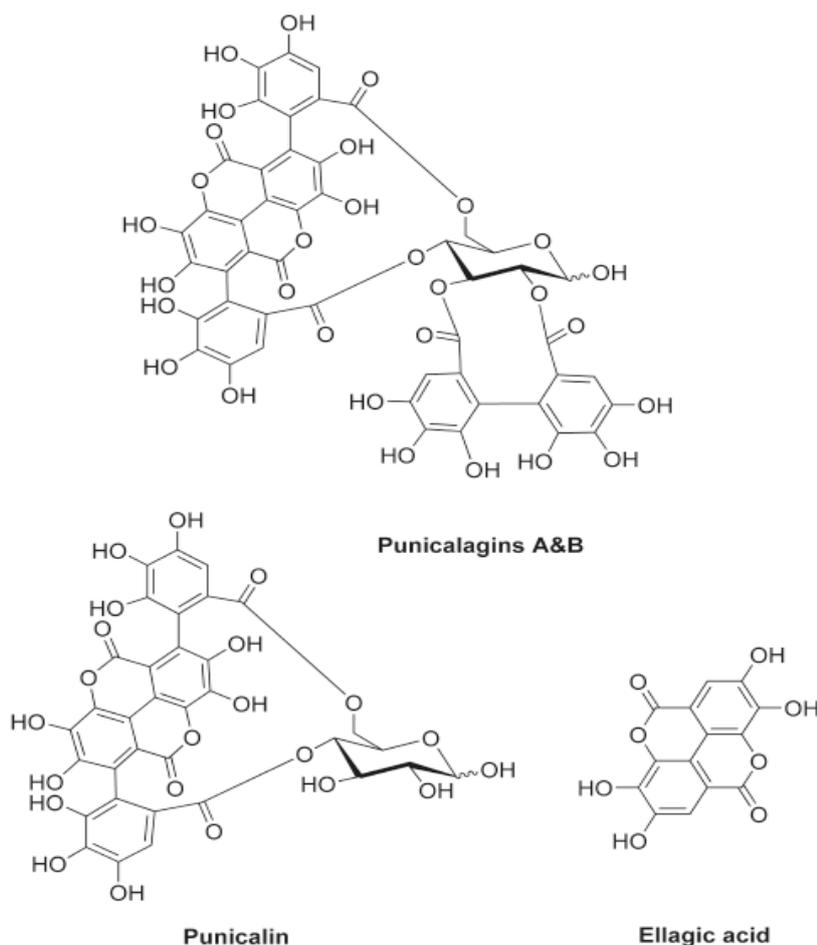


Figura. 14. Estructura química de los compuestos del Extracto de granada.

Extracto de fresno

El Extracto de fresno es un extracto acuoso natural producido por las semillas de *Fraxinus excelsior L.* (fresno europeo) de Marruecos. La relación planta-extractos está comprendida entre 5:1 y 7:1. Es un polvo de color entre beige y marrón claro y con un sabor característico. El extracto de fresno se compone de secoiridoides, principalmente nuzhenida (>7%) y GI3 (>4%), que son los ingredientes activos. La estructura química de los dos principales componentes se presenta a continuación:

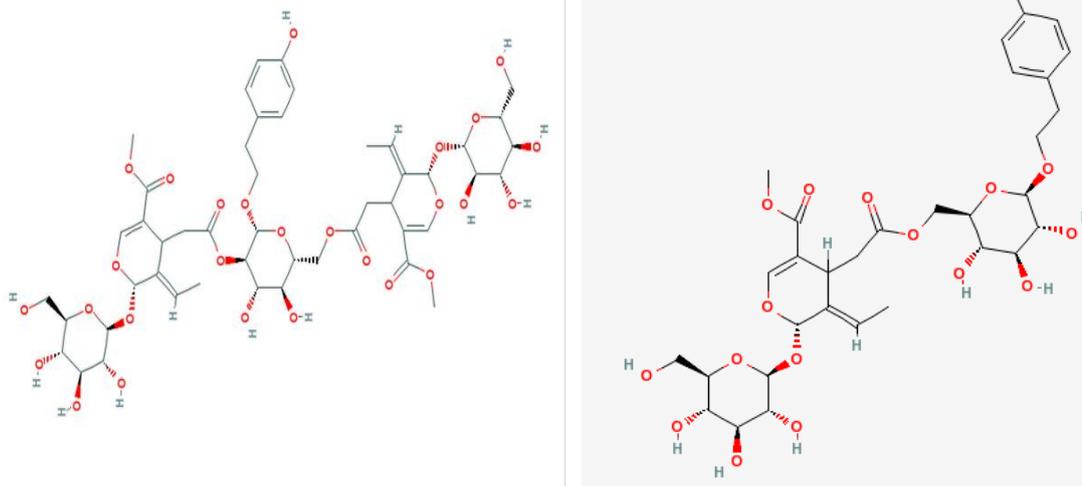


Figura. 15. Estructura química: Nuzhenida y GI3.

Extracto de uva

El Extracto de uva se obtuvo a partir de las uvas enteras, *Vitis vinifera* L. (Familia Vitaceae), usando un hidrodisolvente alcohólico (30% etanol /70% agua). La relación planta-extracto está comprendida entre 10:01-15:01, calculado sobre la base seca. Este extracto se seca por pulverización con maltodextrina (0 a 8% w / w) y sílice (0 a 2% w/w). El contenido total de polifenoles está estandarizado, siendo > 90%, por el método de Folin (Folin y cols., 1915); el contenido de flavanoles es > 40% (Broadhurst y cols., 1978), y los monómeros de flavanoles y ácido gálico son > 12%, según determinaciones realizadas por HPLC-DAD.

Pérdida por desecación	3-5 g
Cenizas totales	1-2 g
Polifenoles totales	> 90 g
Proteínas	1-2 g
Lípidos	0-1 g
Carbohidratos	0-3 g
Valor promedio de calorías	16.5 kcal

Tabla 6. Composición nutricional del Extracto de uva por 100 g.

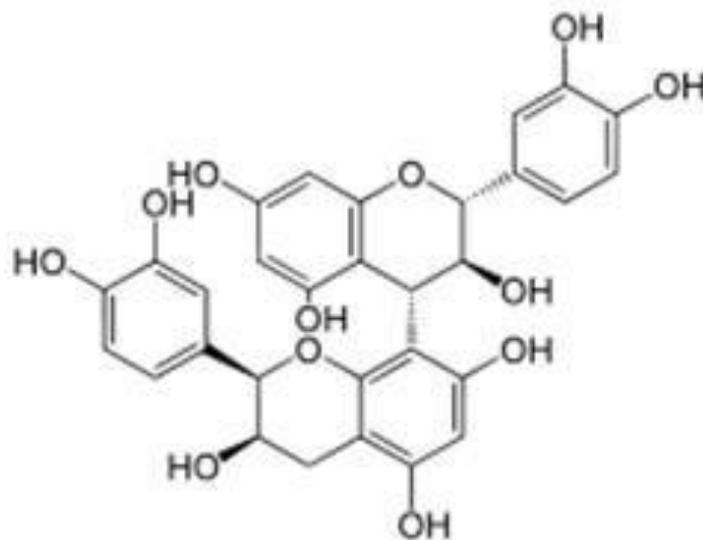


Fig. 16. Estructura química de la proantocianidina.

Reactivos

En este estudio hemos utilizado los siguientes reactivos:

- ✓ Pienso de mantenimiento para ratón 2014 (Harlan Laboratorios; España).
- ✓ PCNA (PC10, Dako Diagnósticos, S.A; España).
- ✓ Hematoxilina y eosina (Sigma Co; España).
- ✓ Formol neutro tamponado al 10% y Tampón Citrato (Panreac; España).

Procedimiento experimental.

Para la realización de este estudio se utilizaron 48 ratones SKH-1/CRL hembras de 33 días de vida y un peso medio de $19,19 \pm 0,88$ g al comienzo de los experimentos.

Los animales fueron separados en 4 grupos experimentales de 12 animales cada uno:

- ✓ Grupo I: Control; Animales expuestos a radiación UV. Recibieron el pienso de mantenimiento estándar.
- ✓ Grupo II: Animales irradiados con UV y tratados con Extracto de granada. La dosis fue de 0,52 g de producto/Kg de pienso preparado para ratón.
- ✓ Grupo III: Animales irradiados con UV y tratados con Extracto de fresno. La dosis fue de 0,572 g de producto/Kg de pienso preparado para ratón.
- ✓ Grupo IV: Animales irradiados con UV y tratados con Extracto de uva. La dosis fue de 0,228 g de producto/Kg de pienso preparado de ratón.

Los animales tratados recibieron el compuesto en la comida (pienso de mantenimiento para ratón triturado), desde 10 días antes de comenzar con la aplicación de radiación UV. La dosis se ajustó en función de la cantidad: ingesta media de los ratones, estimada en 5 g/día de pienso.

Para la irradiación UV, utilizamos el modelo de lámpara original Home Solaria de Philips (Fig. 17). Los animales, previamente separados individualmente en jaulas de PVC y una cubierta de celosía metálica (Fig.18), fueron colocados bajo la lámpara de luz a una distancia de 20 cm entre el foco y la piel. La energía absorbida en cada sesión fue medida con un detector de frecuencia; siendo de $21,1 \text{ J/cm}^2$ /sesión, por lo que la energía total absorbida por animal, fue de 1.688 J/cm^2 . Los animales recibieron 3

sesiones semanales de 1 hora de duración en días alternos, realizando un total de 75 sesiones.



Fig. 17. Lámpara de irradiación UV con jaulas de PVC.



Fig. 18. Sistema de individualización de los animales expuestos a la RUV

Los animales se supervisaban diariamente, y de forma programada, atendiendo al protocolo establecido en el procedimiento experimental, a la 25, 50 y 75 sesión de radiación UV. Se tomaron fotografías de las zonas dorsales expuestas a las radiaciones.

Teniendo en cuenta que podía haber animales que tuviesen que ser sacrificados por motivos distintos al previsto (presencia de tumor que no cumplierse los criterios), se estableció un criterio de punto final de tal manera que cualquier animal que sufriese un descenso del 10% de su peso en una semana o mostrase un comportamiento anómalo de estrés fuese sacrificado.

Estudio macroscópico

Se valoraron dos aspectos, el relacionado con el estado general de la zona tratada o irradiada, que era observado durante cada sesión de RUV administrada, llevando un control de este estado. Y por otro lado, tras la última sesión de radiación UV, se realizaron fotografías digitales en color a todos los animales. Valorando la morfometría, con el objeto de medir el área de la piel del lomo ocupada por lesiones macroscópicas (sin hacer distinción de su morfología), utilizamos una aplicación del programa de análisis de imagen LeicaQwin, dibujando una máscara binaria de las áreas de lesión, que posteriormente se midieron individualmente. (Fig. 19).

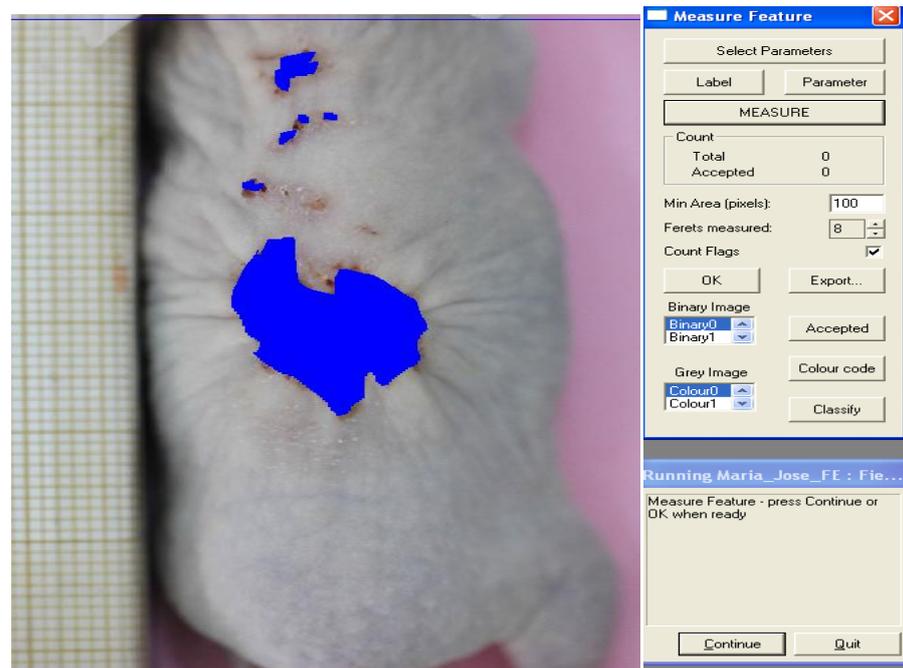


Fig. 19. Detalle del programa de análisis del área de la lesión macroscópica.

Método anatomopatológico

Al finalizar los experimentos, se procedió al protocolo de eutanasia mediante sobredosis de CO₂ en cámara de eutanasia, y posterior necropsia de todos los animales del estudio. Se extirpó la piel del lomo y las vísceras (pulmones, riñones, hígado y ganglios). Las muestras recogidas se fijaron en formol neutro tamponado al 10% al menos durante 48 horas, que fueron posteriormente procesadas para inclusión en parafina por el método habitual; seccionadas a 5 µm y teñidas con HE.

El estudio morfológico de todas las muestras tisulares se realizó con microscopía óptica. Las preparaciones fueron estudiadas por dos observadores, que dependiendo del grado de lesión se valoraron de una a tres cruces (+, ++, +++) los siguientes parámetros morfológicos:

1. Epidermis

Hiperqueratosis.

Acantosis.

Hiperplasia.

Displasia de grado I.

Displasia de grado II.

Displasia de grado III.

2. Dermis

Proliferación vasos capilares.

Infiltrado inflamatorio.

3. Neoplasias

Carcinoma "in situ".

Carcinoma microinvasor.

Carcinoma invasor.

Se realizó el estudio de 5 secciones de cada muestra de piel, evaluando distintos parámetros histológicos cutáneos:

Hiperplasia:

La hiperplasia se describe como el aumento en el número de células. Esto puede ser en el estrato espinoso (acantosis) y/o en las capas de células basales/ parabasales (compartimento proliferativo), llamado: hiperplasia de células basales. La arquitectura muestra una estratificación normal sin atipia celular.

Para el diagnóstico de la **displasia epitelial**, se evaluaron las siguientes características arquitectónicas y citológicas: (i) Arquitectural: la estratificación irregular del epitelio, pérdida de la polaridad de las células

basales, crestas epiteliales en forma de gota, aumento del número de mitosis, mitosis anormales superficiales, disqueratosis, perlas de queratina dentro de papilas epiteliales, (ii) citológico: variación anormal en el tamaño y la forma nuclear, la variación anormal en el tamaño y forma celular, aumento de la relación núcleo/citoplasma, el aumento de tamaño nuclear, figuras mitóticas atípicas, aumento del número y tamaño de los nucleolos. Según la organización mundial de la salud (OMS), los cambios se clasificaron en: displasia leve, si los cambios antes mencionados se limitan al tercio inferior del epitelio, displasia moderada, cuando estos cambios llegaron al tercio medio del epitelio, y severa displasia, cuando los cambios arquitectónicos y citológico se encuentran más allá del tercio medio del epitelio (Barnes y cols., 2005).

Carcinoma in situ:

El concepto teórico de carcinoma *in situ* es aquel en el que ha ocurrido la transformación maligna, pero la invasión aún no está presente.

Este concepto teórico es imposible de reconocer morfológicamente, por lo que hemos considerado los siguientes criterios para el diagnóstico de carcinoma *in situ*: que las anomalías arquitecturales afectaran al espesor completo de la epidermis, acompañado de atipia celular pronunciada, así como la presencia de figuras mitóticas aberrantes y mitosis superficiales.

Carcinoma invasor:

Es una lesión en la que las células cancerosas ya han roto la membrana basal y han penetrado a la zona donde se localizan las microvenas o vasos sanguíneos, por esta razón se dice que ya invade. La gravedad de la lesión se determina midiendo la profundidad de la invasión y la extensión a lo largo del tejido invadido, es decir, lo profundo que penetra y cuánta extensión posee.

Método inmunohistoquímico

El estudio de inmunohistoquímica frente a PCNA en la piel de los ratones irradiados se llevó a cabo en la plataforma de investigación aplicada en animal de laboratorio, del parque científico de Barcelona (PRAAL-PCB). Para la realización de la técnica se utilizó una de las muestras de la piel de cada animal. Después de desparafinar y bloquear la peroxidasa endógena con agua oxigenada al 3% durante 30 minutos, se desenmascaró el antígeno de las muestras con tampón citrato (Panreac) a pH=6 en microondas a potencia 1 durante 10 minutos, y se dejaron enfriar durante 20 minutos a T^a ambiente. Inmediatamente después se lavaron con PBS y se incubaron los tejidos con suero normal de cabra (Millipore) al 10% durante 1h a T^a ambiente. Después se incubaron las secciones con el anticuerpo primario monoclonal contra PCNA (Dako) a dilución 1:200 durante toda la noche a 4°C. Entonces, se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario Goat anti-mouse biotinado (Dako) durante 1h a T^a ambiente, y finalmente se incubaron con el complejo avidina-biotica-peroxidasa (Cultek) a dilución 1:1000 durante 1 h más a T^a ambiente. El revelado de la inmunotinción se hizo con diaminobenzidina (Sigma-Aldrich) durante 3,5 minutos, y las muestras contrastaron con Hematoxilina de Mayers.

El estudio cuantitativo de la expresión de PCNA se realizó mediante análisis de imagen. En primer lugar, se digitalizaron las preparaciones realizando un escaneado microscópico de alta resolución con el equipo Leica SCN400F. Después, con un módulo de análisis de imagen (*Tissue Image Analysis*) de la aplicación Digital ImageHub de Slidepath, se trazaron tres áreas de 100 μm^2 en cada una de las imágenes. Las áreas fueron seleccionadas del frente de invasión tumoral en el caso de los tumores y de la capa basal epidérmica cuando no existía carcinoma.

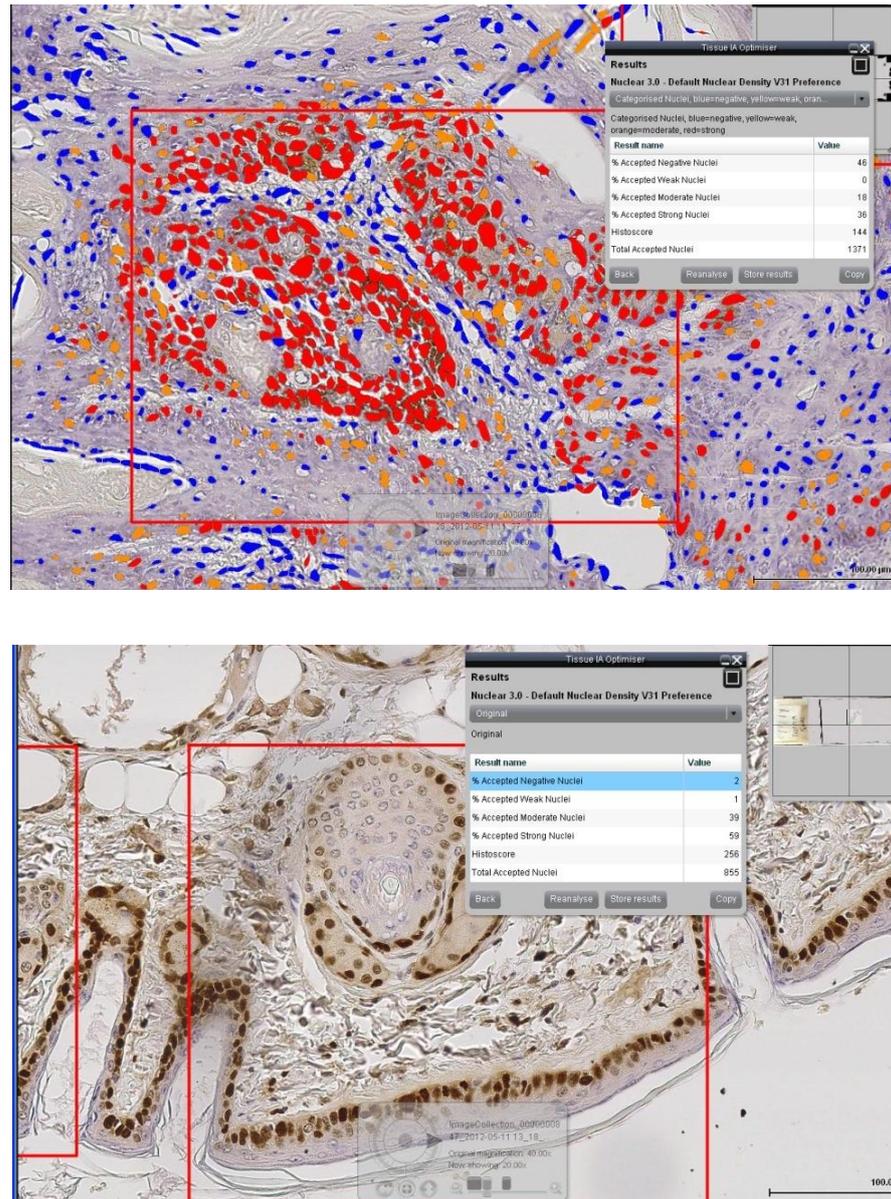


Fig. 20. Detalles del programa de análisis del área de la lesión microscópica.

El programa realiza un conteo del número de núcleos positivos y del número total de células, mediante el Algoritmo Nuclear 3.0, que detecta el marcaje de PCNA de los núcleos mediante un patrón de color definido previamente (Fig.20).

Método estadístico

Realizamos un análisis estadístico descriptivo de las variables observadas para medir la distribución de las frecuencias entre los grupos. En los casos de variables cuantitativas, se calcularon parámetros característicos: media, desviación típica, máximo y mínimo.

Para determinar el grado de asociación estadística entre las variables en estudio, se aplicó el análisis de la 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. Se consideraron significativos valores iguales o menores a 0,05 ($p \leq 0,05$). El procesamiento estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el programa estadístico SPSS 19.0 para Windows (SPSS ® Inc., Chicago, IL).

Resultados

V. Resultados

Estudio macroscópico

Desde la primera exposición a la radiación UV, todos los animales del grupo control presentaban, en la piel del lomo, eritema difuso, que mostraba carácter pasajero, puesto que desaparecía o disminuía notoriamente a partir de 2 ó 3 horas tras la exposición a las radiaciones (Fig. 21).



Fig.21. Detalle zona de la piel con eritema.

A partir de la 10^a-12^a sesión, el eritema se hacía permanente y se acompañaba de un marcado patrón geométrico de la piel, caracterizado por mostrar un aspecto reticular, que se fue haciendo más evidente con el paso del tiempo. Destacaba la aparición de prominentes arrugas longitudinales, que se observaban a lo largo de toda la superficie del dorso de los animales, con fenómenos de laxitud y pérdida de elasticidad de la piel, y aumentaban progresivamente de longitud y grosor, y que alternaban con áreas más

localizadas, ligeramente sobreelevadas y de aspecto irregular ó acompañado generalmente de superficie escamosa (Fig. 22). Estas zonas se situaban de forma no ordenada entre las arrugas, así mismo, desde esa fecha y hasta finalizar las sesiones de irradiación con UVA, la piel fue presentando áreas cada vez más extensas de aspecto telangiectásico.



Fig.22. Detalle zona de la piel con arrugas longitudinales.



Fig.23. Ulceración superficial extensa e irregular.

A partir de la 40ª sesión, la piel adquirió aspecto granular difuso, y alrededor de la 50ª sesión, sufrían ulceración superficial extensa e irregular. En los controles, las lesiones neoplásicas comenzaron a aparecer a partir de 50ª sesión, mientras que en los grupos tratados, las lesiones macroscópicas no se detectaron antes de las 60ª sesión en todos los casos.

En los animales control, estas lesiones eran más extensas e irregulares, y estaban normalmente infiltradas, mostrando superficies escamosas de coloración roja o amarillenta, y las arrugas eran más prominentes. Las lesiones de aspecto queratósico se hicieron más abundantes, aumentando el tamaño e, incluso, confluyendo para formar placas.

Al final del estudio, a las 75 sesiones, todos los animales del grupo control desarrollaron lesiones de aspecto neoplásico, como se aprecia en la figura 23.

Estas lesiones se caracterizaban por ser de tipo nodular y fijadas a planos profundos. Algunas de ellas tenían límites irregulares, eran sobreelevadas, con bordes congestivos y aspecto verrucoso, mientras que, otras mostraban el centro deprimido con aspecto escamoso y ulceración superficial. Se trataba de úlceras de fondo sucio y sangrado espontáneo en algunos casos.



Fig. 24. Detalle de lesiones neoplásicas en el grupo control tras 75 sesiones.

Estas lesiones macroscópicas variaban en número y tamaño, dependiendo de los animales sometidos a los diferentes tratamientos con los agentes a estudio.

En el grupo tratado con E. de granada, solamente dos animales desarrollaron lesiones nodulares superficialmente ulceradas compatible con el diagnóstico clínico de ulceración neoplásica.



Fig. 25. Lesión nodular compatible con ulceración neoplásica en un animal tratado con el E. de granada.

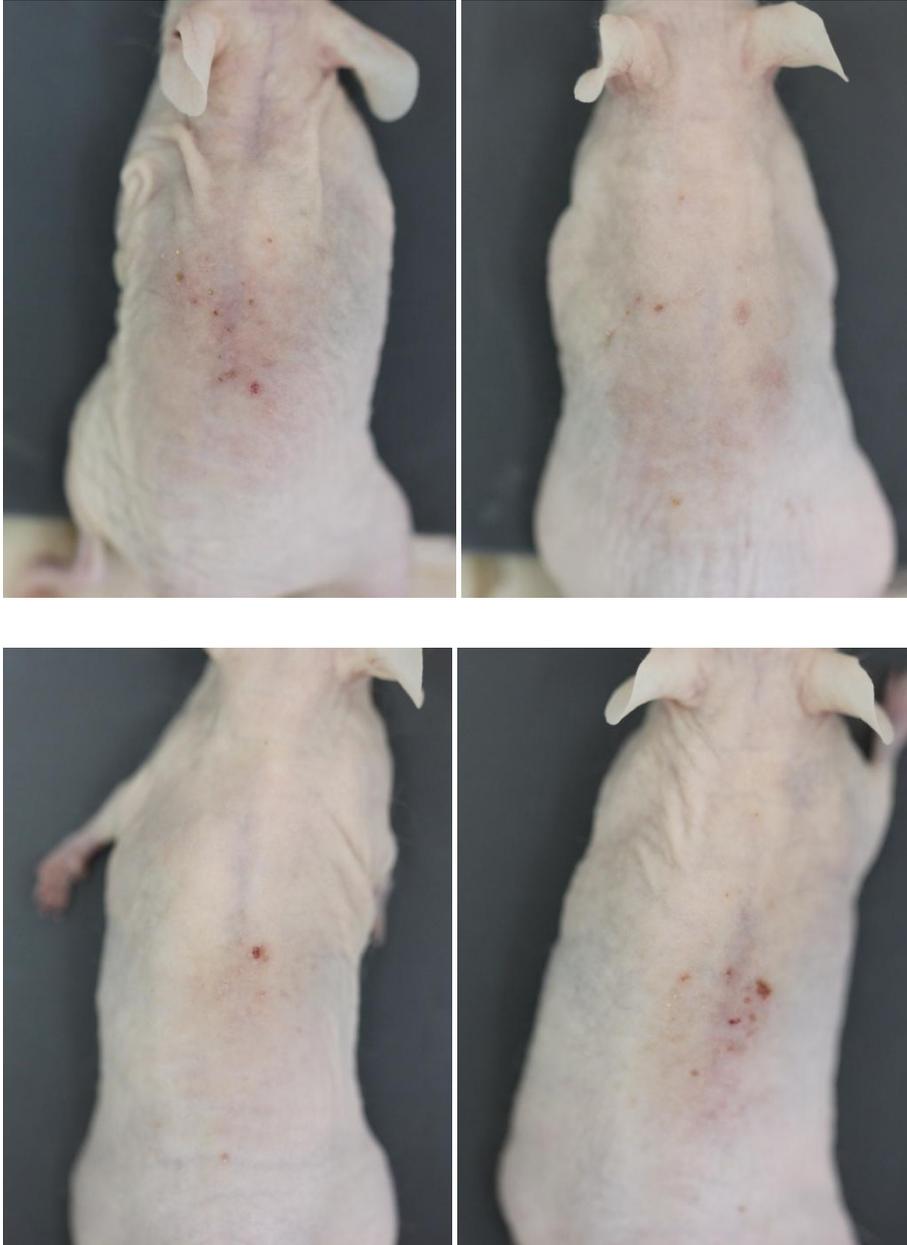


Fig. 26. Detalle de las lesiones a las 75 sesiones en el grupo tratado con E. de granada.

En el caso del grupo tratado con E. de fresno, seis animales desarrollaron lesiones extensas y con características de malignidad (fijación a planos profundos, áreas de necrosis y sangrado espontáneo).

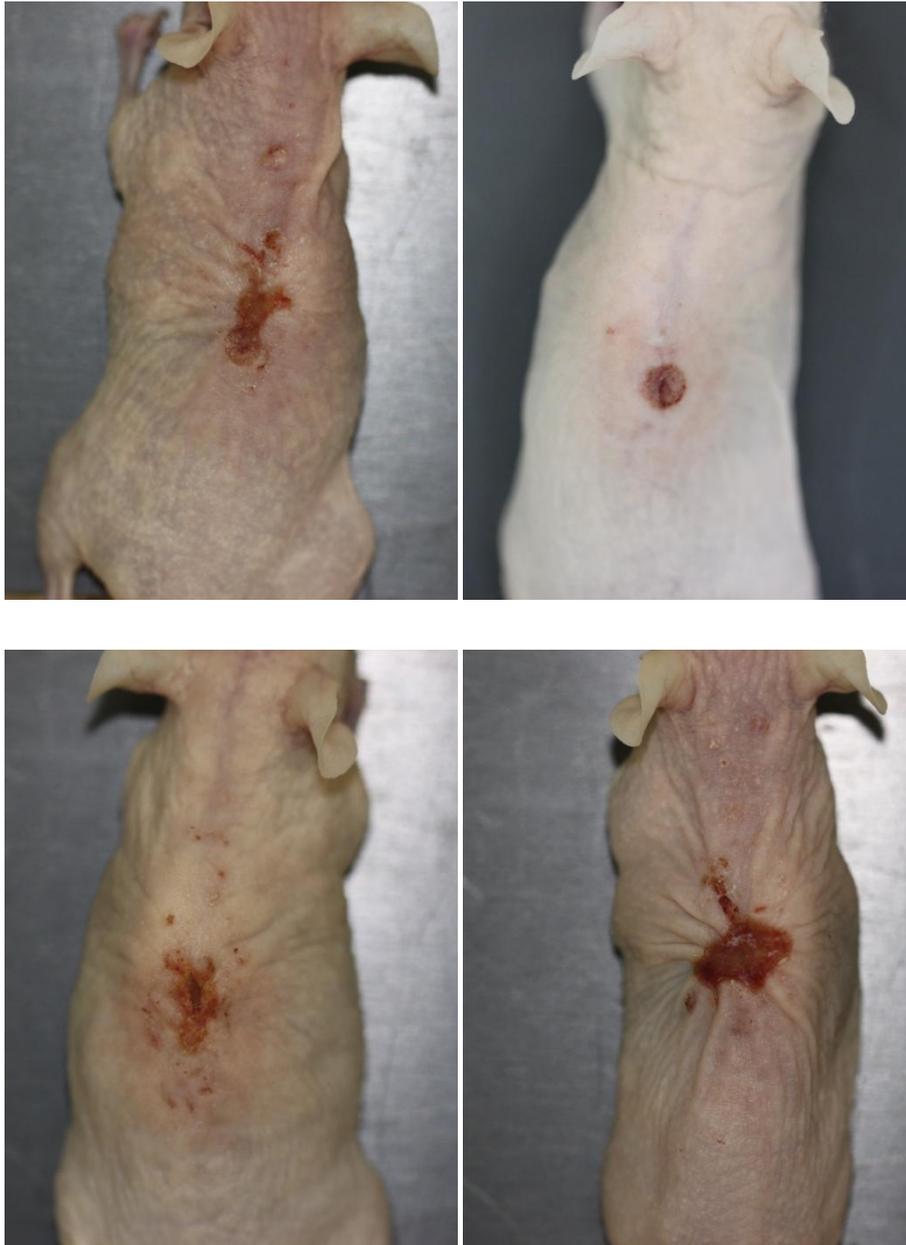


Fig. 27. Detalle de las lesiones a las 75 sesiones en el grupo tratado con E. de fresno.

En el grupo de ratones tratados con E. de uva, nueve animales desarrollaron lesiones extensas y con características de malignidad.



Fig. 28. Detalle de las lesiones a las 75 sesiones en el grupo tratado con E. de uva.

El área cutánea ocupada por lesiones objetivables determinada mediante análisis de imagen fue menor en los grupos tratados que en el control. En el grupo control, el área lesional fue de $190,43 \pm 157,52 \text{ mm}^2$, existiendo diferencias estadísticamente significativas respecto a los animales tratados con E. de granada y con el E. de fresno, que mostraron un área ocupada por lesiones de $4,65 \pm 3,18 \text{ mm}^2$ ($p < 0,001$) y $23,11 \pm 43,20 \text{ mm}^2$ ($p < 0,003$) respectivamente.

No se observaron diferencias significativas en el grupo tratado con E. de uva respecto al control, aunque el área ocupada por lesiones también fue menor ($75,9 \pm 67,10 \text{ mm}^2$ frente a $190,43 \pm 157,52 \text{ mm}^2$).

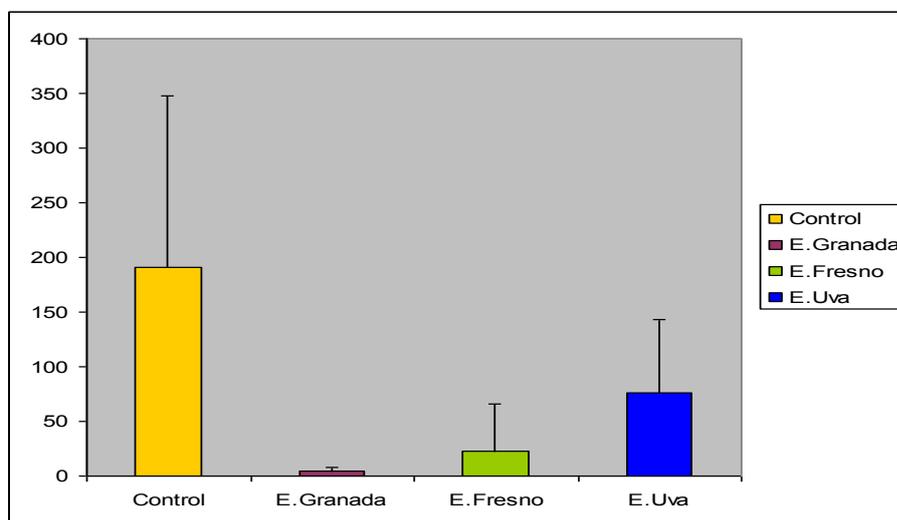


Gráfico. 1. Áreas de lesiones macroscópicas.

	Control (n= 11)	E. Granada (n= 10)	E. Fresno (n= 9)	E. Uva (n= 9)
Eritema difuso pasajero	1	1	1	1
Eritema de aspecto reticular o telangiectásico	4	7	5	5
Engrosamiento irregular	10	12	10	10
Arrugas cutáneas (longitudinales y radiales)	14	16	14	14
Lesiones eritemato-escamosas	14	16	14	14
Lesiones queratósicas nodulares	17	19	17	17
Lesiones erosivas	16	18	16	16
Lesiones ulceradas	16	18	16	16
Lesiones tumorales	20	22	20	20

Tabla 7. Tiempo de presentación en semanas de las lesiones macroscópicas.

Estudio microscópico

Incidencia de tumores e histopatología.

La incidencia de tumores se define como el porcentaje de ratones portadores de al menos un tumor en el área tratada. Los efectos del tratamiento E. de fresno, granada y uva, en la incidencia de tumores se muestran en la tabla 31.

En el examen microscópico, los carcinomas de células escamosas (SCC) se mostraban como lesiones neoplásicas proliferantes de la epidermis que formaba nidos y nódulos que penetraba en la dermis en una profundidad variable. La célula neoplásica característica era una célula poliédrica grande, con abundante citoplasma eosinófilo, y un gran núcleo redondo vesiculado y contenía uno o dos nucléolos grandes. Los focos de disqueratosis eran marcados, siendo frecuente la presencia de perlas de queratina en el interior de algunos nidos de células. Las figuras mitóticas, frecuentes y en ocasiones extrañas. La dermis subyacente mostraba fibrodisplasia suave y una inflamación reactiva suave. Las lesiones identificadas como carcinomas *in situ* eran muy similares a las descritas para el carcinoma de células escamosas anteriormente, excepto que la lesión era más pequeña y confinada a la epidermis; no atravesando la membrana basal.

El grupo tratado exclusivamente con RUV, es decir, el grupo control, presentaba todo el espectro del desarrollo neoplásico, con áreas de engrosamiento cutáneo irregular debido a hiperplasia de células basales, acantosis, papilomatosis e hiperqueratosis, zonas displásicas de diferente grado (leve, moderada y severa), carcinoma *in situ*, carcinomas microinvasores y carcinomas infiltrantes (Fig.35 y 36).

El 100% de los animales desarrollaron carcinomas, que eran generalmente bien diferenciados, con formación de numerosos globos córneos, y más raramente mostraban aspecto basaloide, con escasa queratinización. En los tumores de este último tipo, la dermis presentaba múltiples fenómenos de elastosis con predominio de los tipos II y III, fibrosis de la dermis papilar e infiltrados linfo-plasmocitarios, predominantemente alrededor de los cordones y nidos neoplásicos.

Las lesiones de los carcinomas invasores y carcinomas *in situ* presentaban características microscópicas similares, tales como: áreas irregulares de acantosis de aspecto compacto, que alternaban con fenómenos de alargamiento irregular de las crestas epidérmicas y papilomatosis. Estas áreas solían acompañarse de hiperqueratosis y, en ocasiones, paraqueratosis.

En las zonas adyacentes a los carcinomas, eran frecuentes las áreas de displasia leve (+) o moderada (++) y esporádicamente severa (+++). Estas zonas mostraban pérdida de la polaridad celular y atipias que se caracterizaban por marcado pleomorfismo celular y nuclear, alteración de la relación núcleo-citoplasma a favor del núcleo, hipercromatismo nuclear con frecuente aspecto vesiculoso del núcleo y uno o varios nucléolos voluminosos e irregulares de la dermis papilar por aumento de los capilares sanguíneos y por acúmulos de sustancia intercelular. En la dermis reticular destacaba la desorganización estructural por fragmentación y degeneración de las fibras elásticas con depósitos irregulares de material elastótico. En las zonas subyacentes a las áreas de displasia epitelial, se observaban además infiltrados irregulares de linfocitos y células plasmáticas.

Las lesiones variaron en fecha de aparición, número, tamaño o agresividad entre el grupo control y los animales tratados con los diferentes productos, pero el patrón de todas las lesiones era similar en mayor o menor grado.

En el grupo tratado con E. de granada, diagnosticamos solamente un carcinoma invasor y un carcinoma *in situ*, existiendo diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control ($p < 0,001$). Además, los animales que no desarrollaron tumores malignos, mostraban menor grado de hiperplasia ($p < 0,001$) y displasia ($p < 0,05$).

En el grupo de animales tratados con E. de fresno diagnosticamos cinco carcinomas invasores y ningún carcinoma *in situ*.

En el grupo de animales tratados con E. de uva diagnosticamos cinco carcinomas invasores y un carcinoma *in situ*.

No existían diferencias estadísticamente significativas entre estos 2 grupos y el control respecto a la incidencia de carcinoma de células escamosas.

En los animales que no presentaron lesiones neoplásicas, todos ellos pertenecientes a los grupos tratados, observamos una marcada hiperplasia epidérmica (10 capas de células de espesor frente a las 4 capas presentes en la piel de los animales no tratados).

En el caso del grupo tratado con E. granada, predominaba la displasia leve (70%) y moderada (10%), no existiendo ningún animal sin tumor con displasia severa. Las diferencias con el control eran estadísticamente significativas respecto a la hiperplasia y la displasia I ($p < 0,001$, y $p < 0,002$ respectivamente).

En los grupos de animales tratados con E. de fresno y E. de uva, tampoco diagnosticamos displasia severa en ningún caso, pero existían diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos y el control respecto a la displasia/hiperplasia.

	Control (n= 11) n (%)	E. Granada (n= 10) n (%)	P	E. Fresno (n= 9) n (%)	E. Uva (n= 9) n (%)		
Carcinoma invasor	11(100)	1(10)	< 0,001	5(55)	0,096	5(55,5)	0,096
Carcinoma in situ	0(0)	1(10)	1	0(0)	1	1(11,1)	1
Displasia III	0(0)	0(10)	0,974	0(0)	1	0(0)	1
Displasia II	0(0)	1(10)	1	1(11,1)	1	0(0)	1
Displasia I	0(0)	7(70)	0,002	3(33,3)	0,441	2(22,2)	1
Hiperplasia	0(0)	7(70)	< 0,001	4(44,4)	0,096	3(33,3)	0,096

Tabla. 8. Características histológicas.

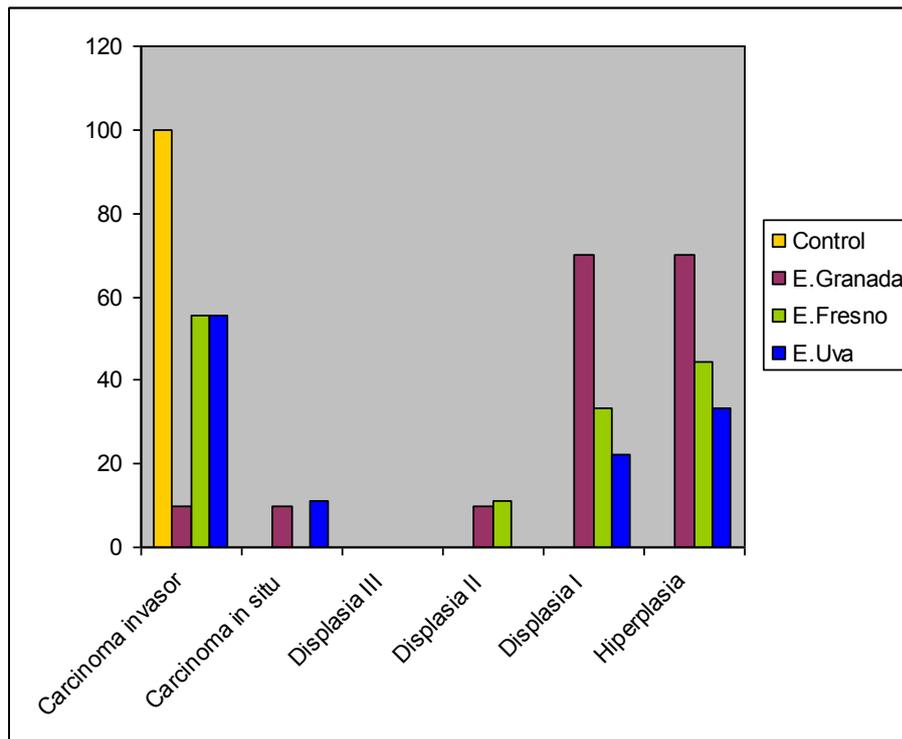


Gráfico. 2 Resumen de lesiones microscópicas.

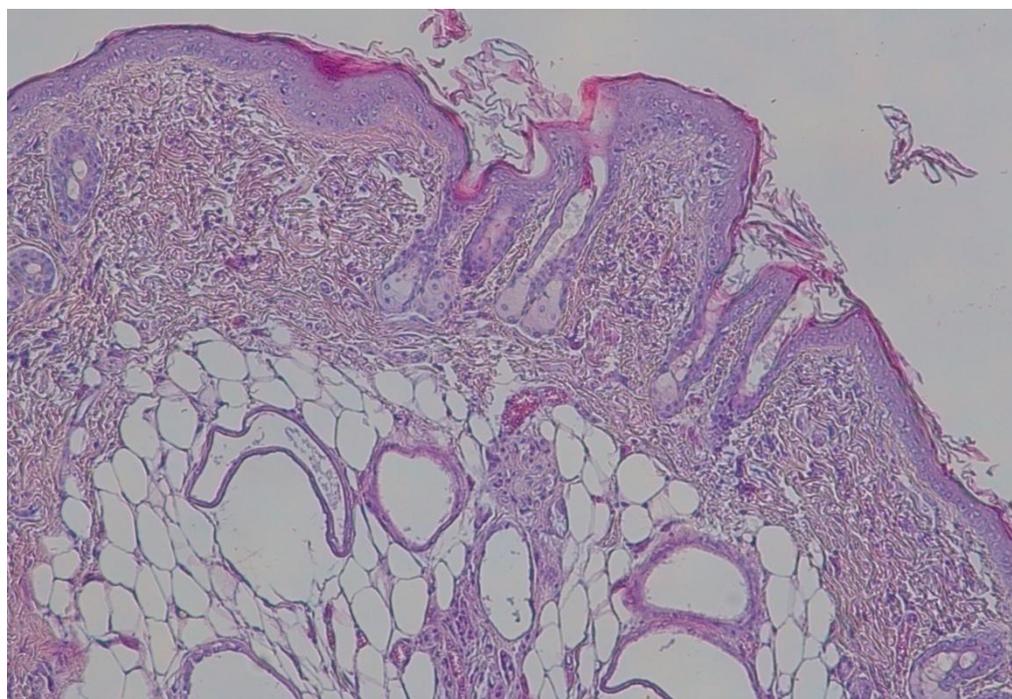


Fig. 29. Piel sana sin irradiar.

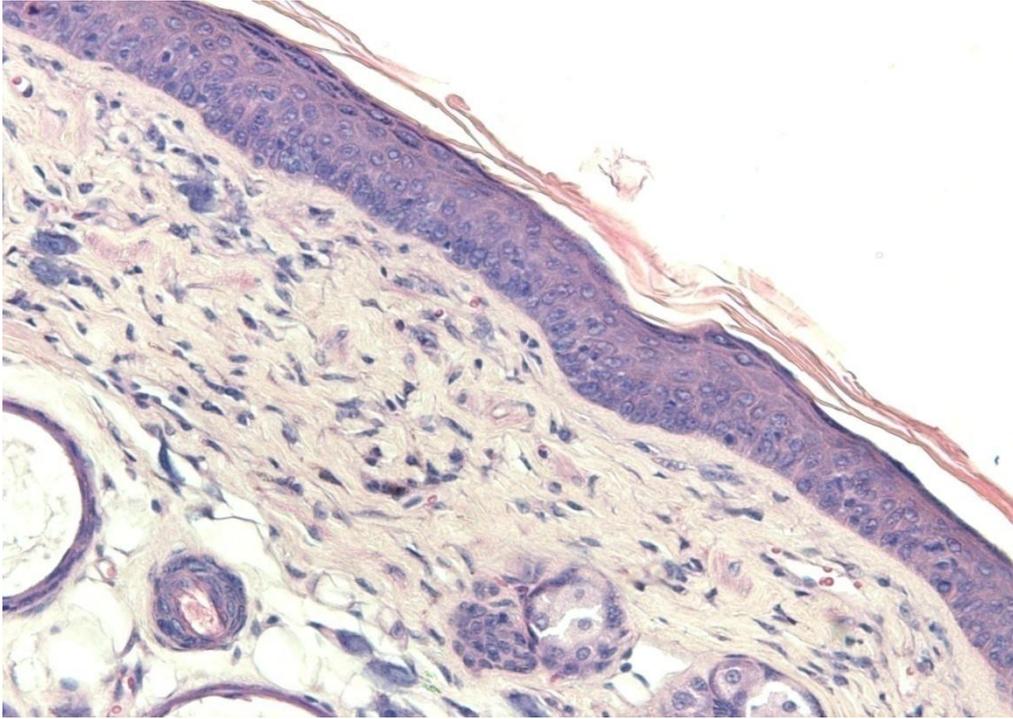


Fig. 30. Hiperplasia leve.

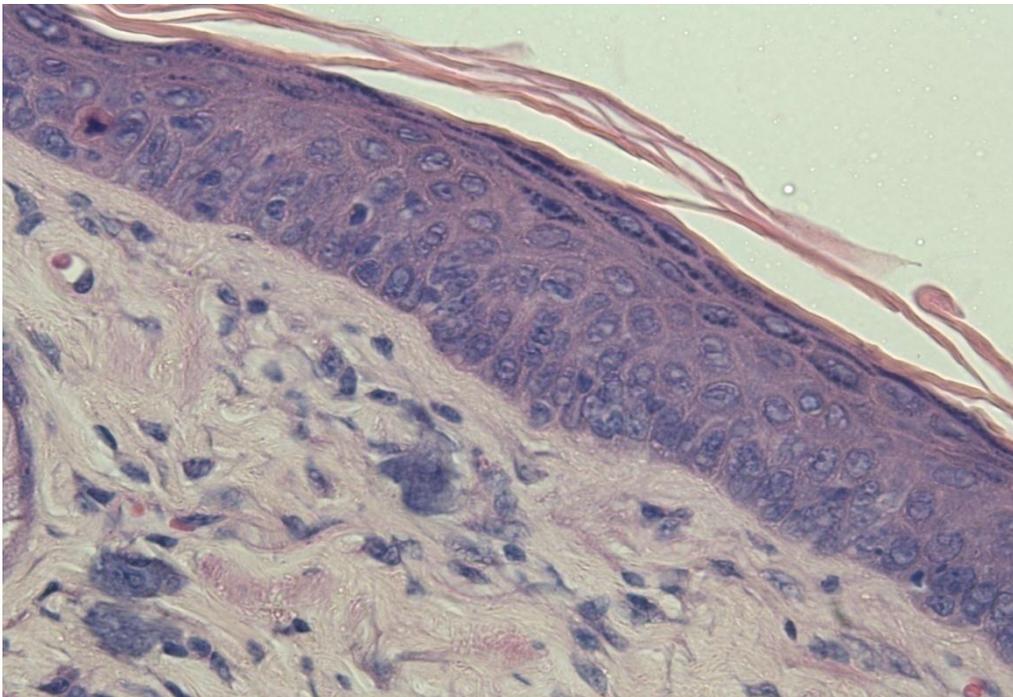


Fig. 31. Hiperplasia con displasia leve.

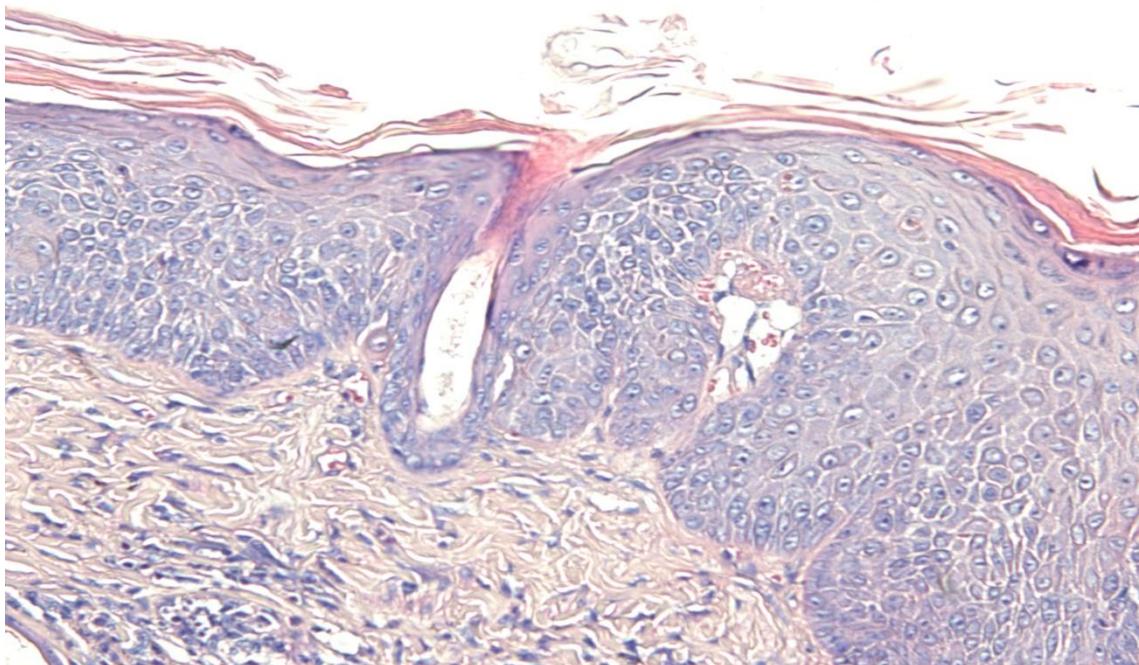


Fig. 32. Displasia moderada.

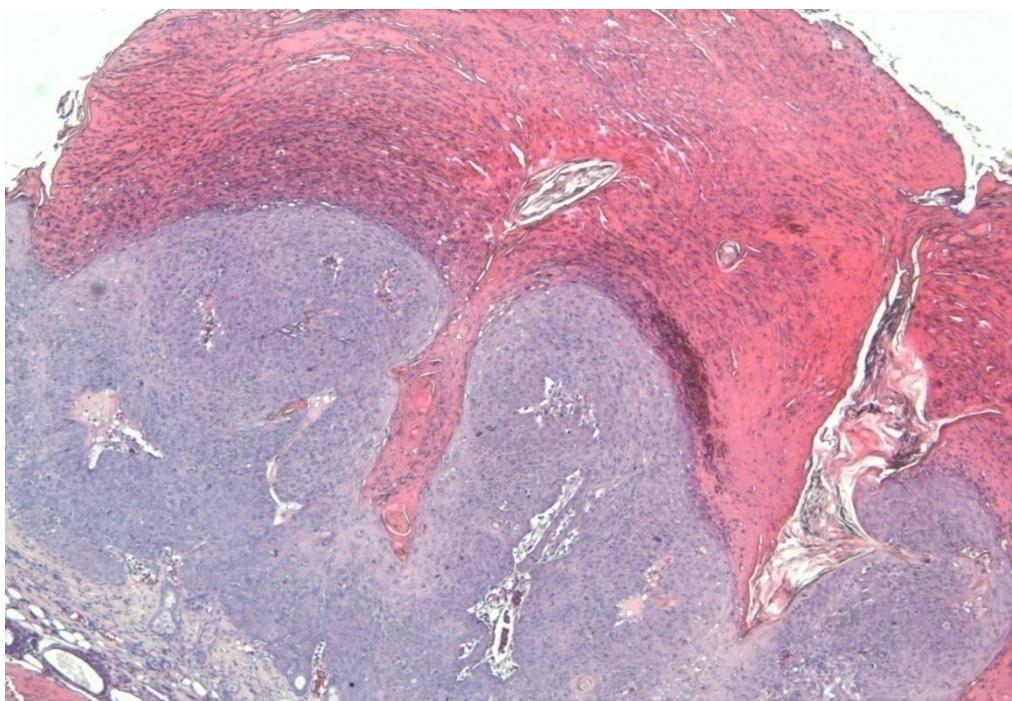


Fig. 33. Displasia severa, carcinoma *in situ*.

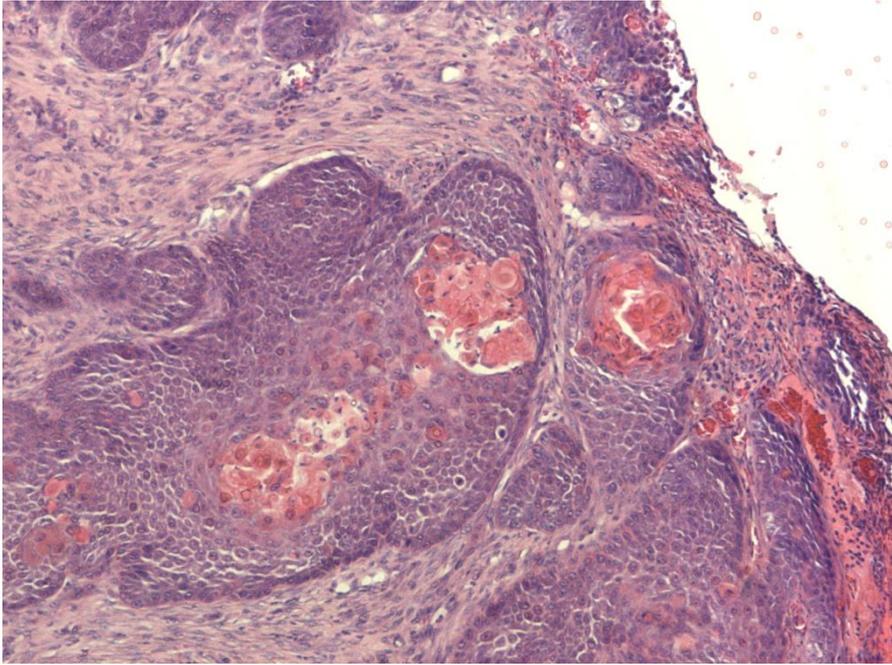


Fig. 34. Detalle de carcinoma invasor, grupo control: nidos de células tumorales con focos de queratinización interna.

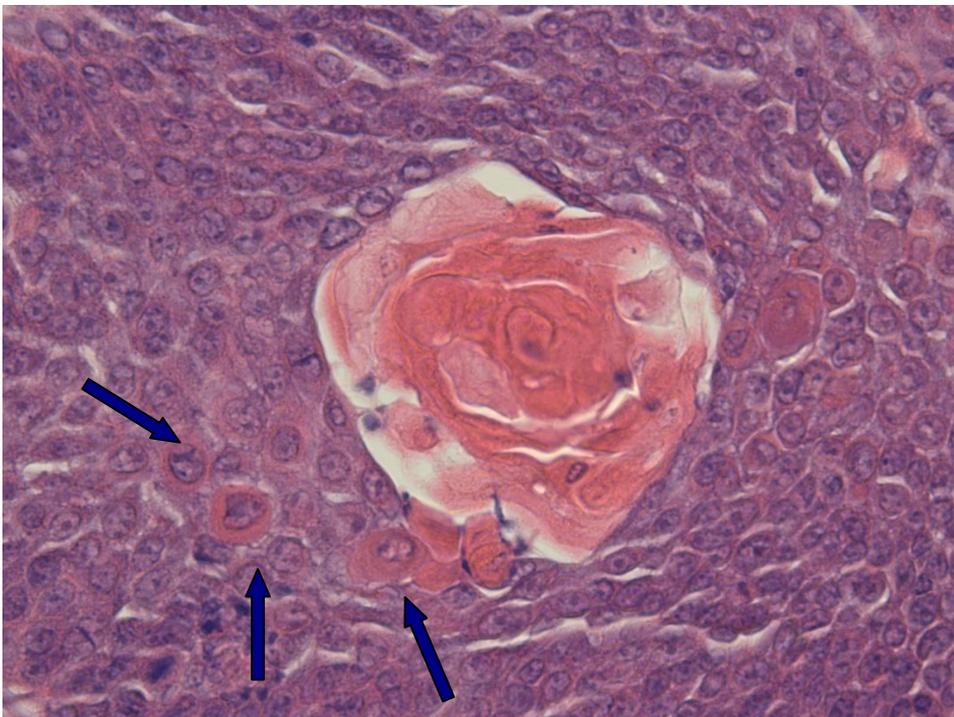


Fig. 35. Detalle de queratinización intracitoplasmática.

Estudio inmunohistoquímico

En las figuras 38, 39 y 40, se muestran unos cortes de la piel de los animales de cada uno de los cuatro grupos de estudio teñida con la técnica de inmunohistoquímica frente al anticuerpo anti-PCNA. Se observa que todos los grupos irradiados muestran células proliferantes en capas basales y suprabasales, siendo menor el número de células positivas y la densidad del marcaje en los animales tratados con los extractos (fresno, granada y uva,) que en el grupo control (Fig. 37).

En los tumores del grupo control, el recuento de células positivas fue de $529,33 \pm 102,623$. En todos los casos en los que se administró tratamiento, se observó una reducción estadísticamente significativa ($p < 0,001$) en el número de células PCNA positivas en los carcinomas en comparación con el grupo de control. En el tratamiento con E. de granada el recuento resultante fue de $324,67 \pm 11,015$, frente a los $529,33 \pm 102,623$ del grupo control. Los tratamientos con E. de fresno y E. de uva, dieron unos resultados de $429,20 \pm 91,305$ y de $424,58 \pm 59,298$, respectivamente.

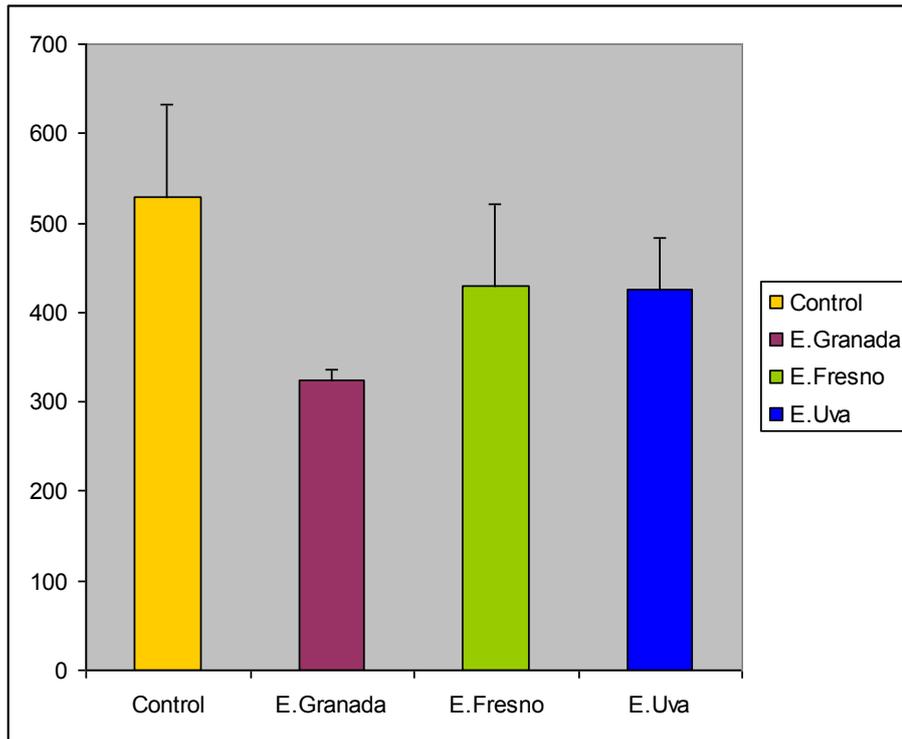


Gráfico. 3. Recuento de células positivas a PCNA.

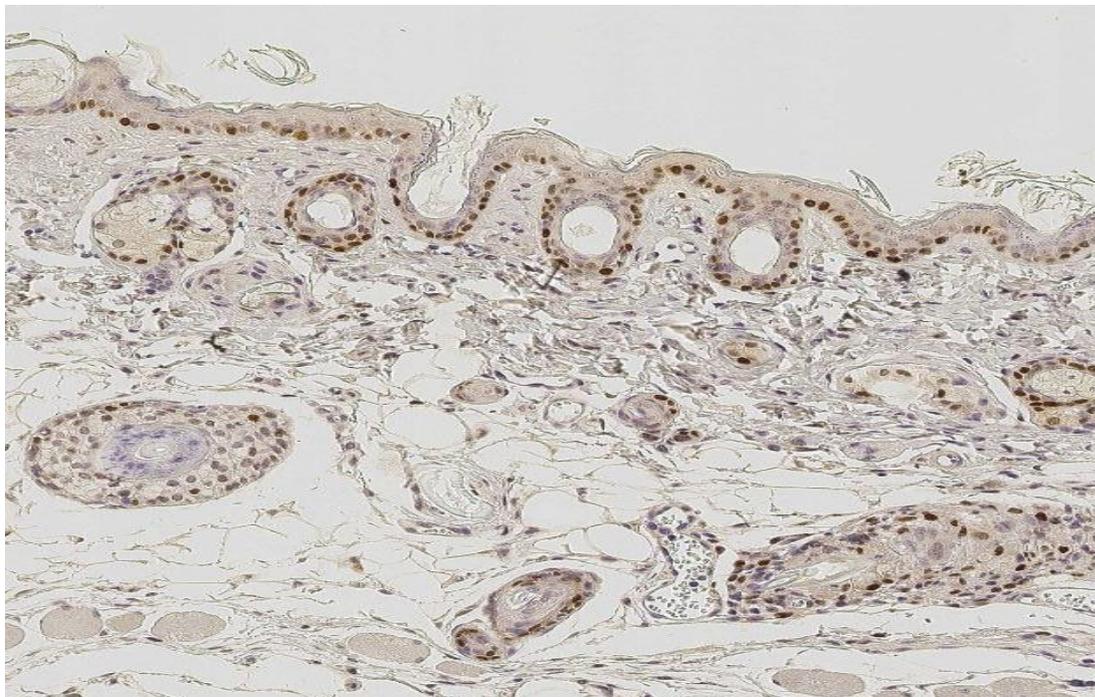


Fig. 36. PCNA en ratones control sanos: positividad en células basales.

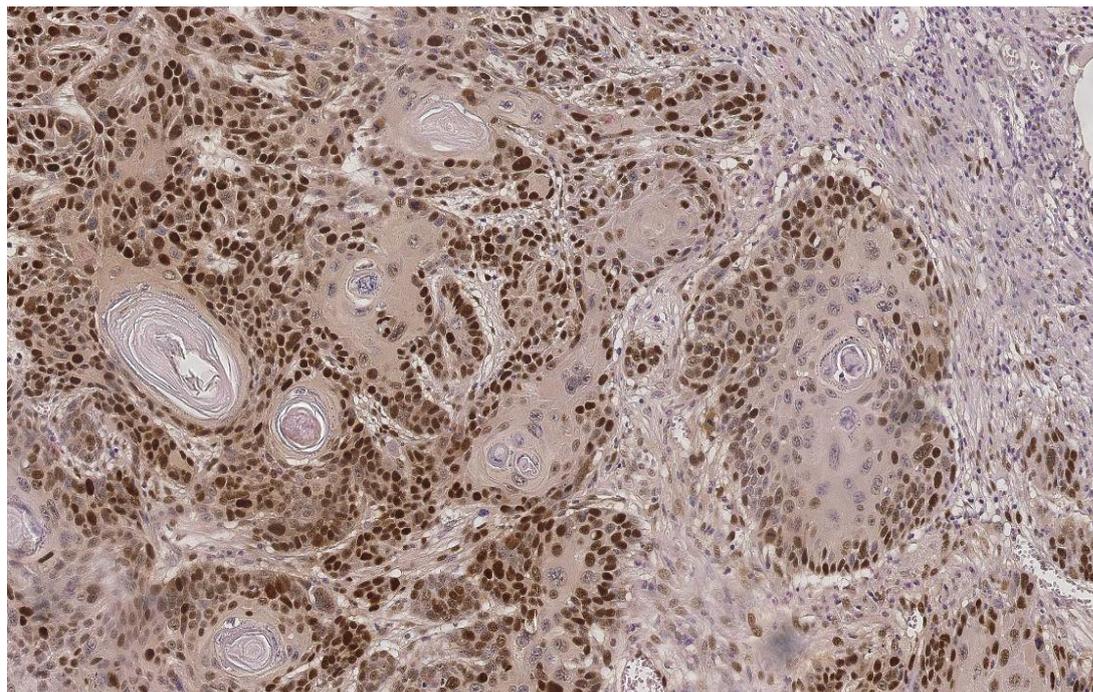


Fig. 37. Marcaje intenso de PCNA en tumor del grupo control.

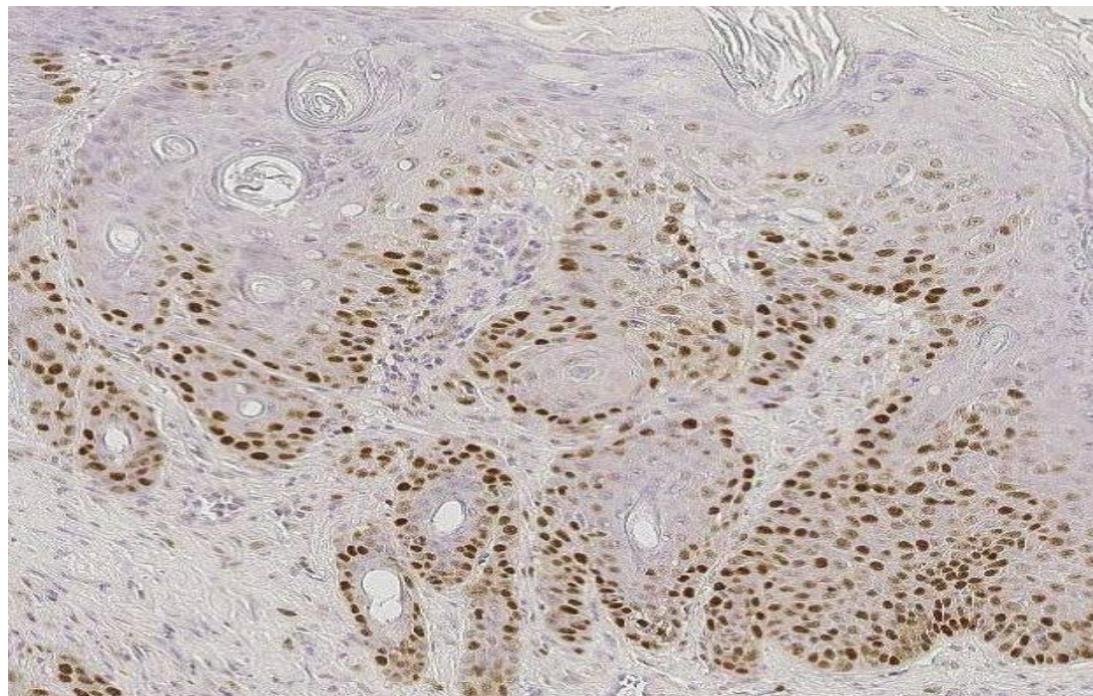


Fig.38. Marcaje leve de PCNA en un carcinoma del grupo tratado con E. de fresno.

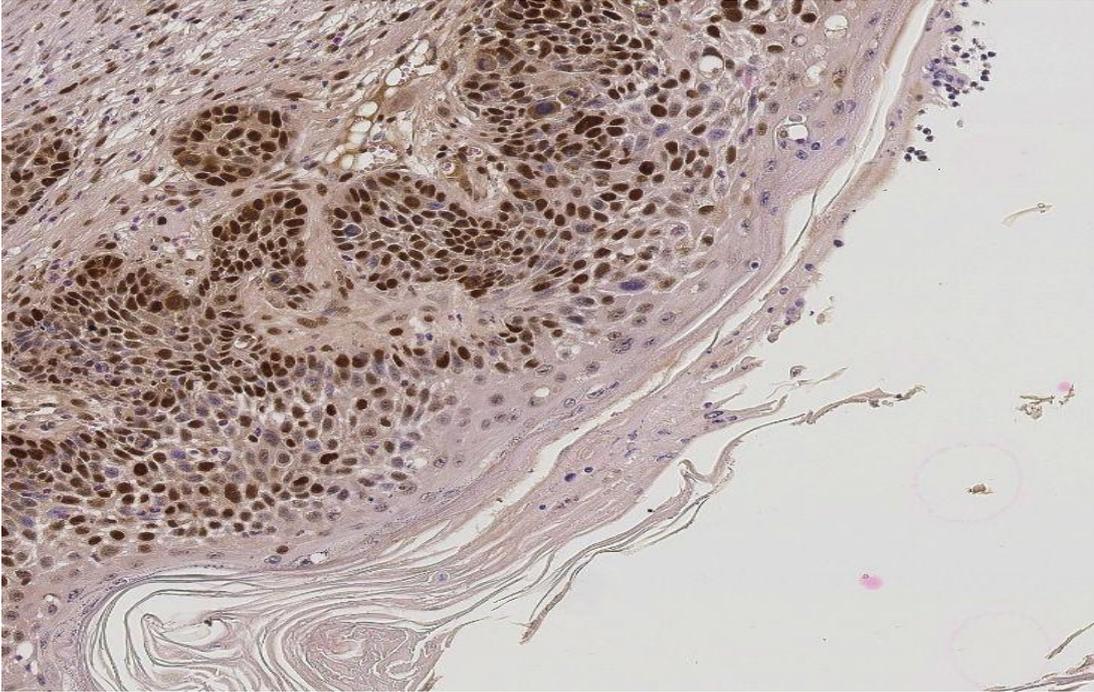


Fig. 39. PCNA en E. de granada.

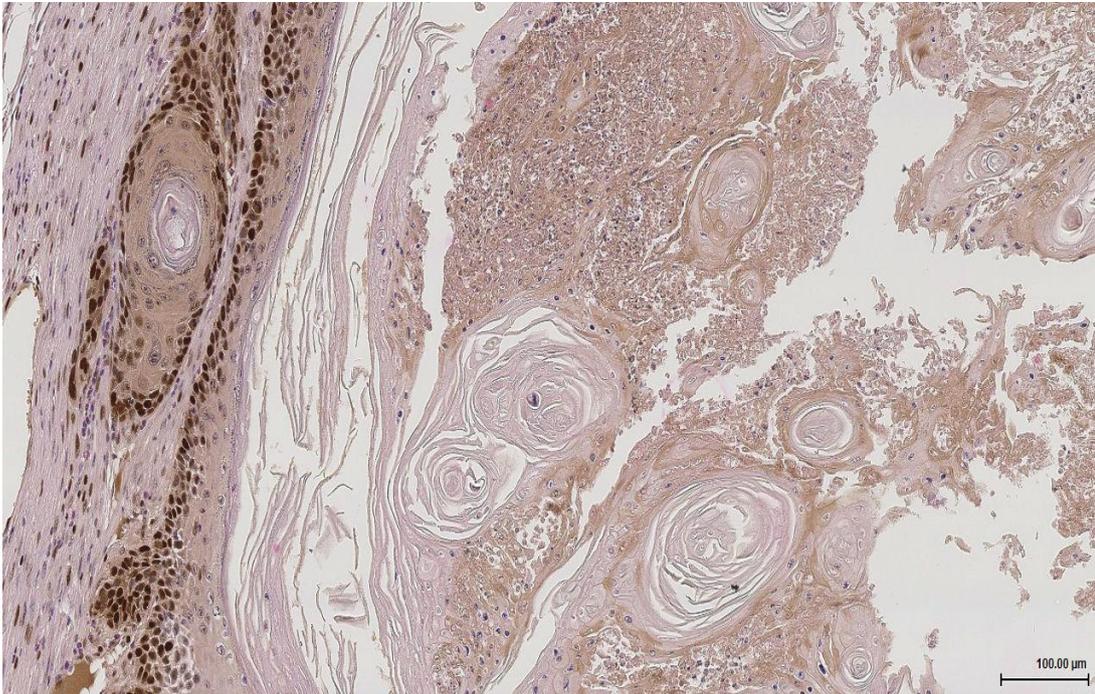


Fig. 40. PCNA en carcinoma del grupo E. de uva con área de necrosis.

Discusión

VI. Discusión

Como hemos visto en la introducción, la eficacia de diferentes polifenoles en contrarrestar los efectos deletéreos de la RUV ha sido demostrada en estudios previos tanto en cultivos celulares como modelos animales tratados por diferentes vías de administración (Afaq, 2006).

En el presente trabajo, hemos valorado la acción fotoprotectora del extracto de granada (E. de granada), extracto de fresno (E. de fresno), y extracto de uva (E. de uva) en la prevención de la tumorigénesis inducida por las RUV. También hemos tratado de establecer la posible relación de dicha actividad fotoprotectora con la capacidad antioxidante propia de estos compuestos.

En los últimos años se ha incrementado el porcentaje de enfermedades causadas por la irradiación solar, entre las que destaca el cáncer de piel. Para prevenir los efectos nocivos de la exposición a la radiación solar como el eritema, las quemaduras solares, la formación de aductos del DNA, estrés oxidativo y la inmunosupresión, se emplean filtros solares sintéticos, muchos de los cuales causan reacciones de fotosensibilidad.

La relación entre el cáncer de piel y la exposición a la luz solar se conoce desde finales del siglo XIX, cuando se observó que la aparición de este tipo de neoplasias se producía, en su mayoría, en personas con la piel dañada por el Sol (Unna, 1894; Dubreuilh, 1896).

Estudios posteriores a mediados del siglo XX, demostraron claramente el papel inductor de la radiación ultravioleta en la aparición del cáncer de piel (Roffo, 1933; Rusch, 1941).

Fue en este período cuando se publicó que el proceso de carcinogénesis en la piel era un mecanismo que se producía en dos etapas (Beremblum, 1954), consistentes en una **iniciación** (alteración irreversible

del ácido desoxiribonucleico) y una **promoción** (expansión clonal de la célula iniciada). Desde entonces, ha sido claramente demostrado que la radiación ultravioleta tiene la propiedad de actuar como iniciador y/o promotor, es decir, puede actuar como carcinógeno completo (Epstein, 1968; Pound, 1970). La Agencia de Investigación del cáncer de la OMS, las incluyó en el grupo 1 de agentes carcinógenos (El Ghissassi, 2009).

Alrededor del año 1960, comenzaron a realizarse numerosos estudios epidemiológicos del cáncer cutáneo. Estos trabajos aportaron una evidencia experimental de la relación entre la exposición solar y el cáncer de piel en humanos, y apuntaron la importancia del fenotipo y el genotipo en la determinación de la susceptibilidad a la **fotocarcinogénesis** (Urbach, 1969).

Los posteriores estudios se centraron en la respuesta celular a la radiación ultravioleta, y fueron realizados sobre piel humana y de animales de experimentación, así como en cultivos celulares.

En los años 70, la investigación en fotocarcinogénesis pasó del nivel celular al nivel molecular, en gran medida debido a los avances en las técnicas de estudio y a dos influencias: la primera fue el estudio de cómo la radiación ultravioleta producía mutaciones en las bacterias, estudio que abrió las puertas hacia una experimentación en este sentido pero con células animales (Setlow, 1972). La segunda influencia fue el descubrimiento que permitió conocer que las células procedentes de pacientes con *Xeroderma Pigmentosum* eran deficientes en la capacidad de reparar las alteraciones en el DNA producidas por la radiación ultravioleta (Cleaver, 1975).

Actualmente, los estudios se centran en comprender los mecanismos moleculares implicados en el proceso de carcinogénesis, como por ejemplo las mutaciones en p53 y *ras*, y en el estudio del proceso de inmunosupresión cutáneo (Soehnge, 1997).

En la actualidad, se considera que el cáncer cutáneo es el más frecuente en la raza blanca y ha sufrido un dramático incremento durante los últimos 40 años, debido fundamentalmente al cambio social experimentado

respecto a la exposición al Sol y las RUV. En los Estados Unidos de América en el año 2011 se diagnosticaron más de un millón de casos nuevos de cáncer cutáneo no melanoma y 53.000 melanomas (Jemal, 2011; Siegel, 2012). Publicaciones recientes indican que el 90% de los tumores de piel están causados por la exposición de la piel a la RUV (Filip, 2009; Nichols, 2010).

Esto ha determinado que se considere a las RUV como el carcinógeno ambiental más importante en nuestros días (Steerenber, 1998), y explica el enorme interés sanitario por el conocimiento y control de los efectos de estas radiaciones.

Por otro lado, el envejecimiento prematuro de la piel, o **fotoenvejecimiento**, también es consecuencia de la exposición crónica a las RUV, por lo que el descubrimiento de productos o nuevos fármacos que ayuden a contrarrestar dichos efectos, tiene un gran interés social, que se refleja en las ventas de productos o tratamientos relacionados con él, que suponen más de 10.000 millones de dólares anuales a nivel mundial (Yaar, 2007).

En el presente proyecto de investigación hemos pretendido contribuir al estudio de diferentes extractos vegetales como agentes quimiopreventivos frente a la fotocarcinogénesis en un modelo experimental *in vivo*.

Tras valorar los diferentes modelos animales que se conocen actualmente para el estudio del fotoenvejecimiento, la elección de nuestro modelo animal, ha venido condicionada por las características que presentaban los ratones frente a otros modelos animales, como son los mini pigs, cobayas (Kligman, 1982; Kreuzmann, 1990), ratas, (Nakamura, 1968), e incluso peces (xiphophorus, medaka y pez cebra) (Kurita, 2004). Los roedores, en concreto los ratones, son el modelo más utilizado, tanto cepas con pelo como sin él (Becker, 2010): C57BL/6J; BALB/C; CBA, (Benavides, 2009), Swiss, Hairless: HR-1, SKH-1, etc. (Sharma, 2011).

En nuestro estudio se optó por el modelo SKH-1, un ratón sin pelo y eufímico, por las ventajas que esto presentaba frente a otros modelos con pelo (Swiss, BALB/C...) o con inmunosupresión (CD1-Nude, NOD.SCID...).

La ausencia de pelo hace que la piel de estos animales sea muy sensible a los efectos de las RUV, y el área cutánea del lomo es fácilmente exponible a las radiaciones, sin necesidad de realizar rasurados periódicos. Aún así, había que resolver otro problema, ya que los animales tendían a colocarse unos sobre otros en la jaula, si se colocaban todos a la vez, impidiendo la exposición de los que quedaban en zonas inferiores y provocando así una exposición no homogénea. Para solventar este problema, y evitar tener que irradiar a los animales de uno en uno, con el consiguiente gasto energético, ideamos una jaula con separadores individuales, sobre la que se colocaba una celosía metálica para evitar el paso de los animales a las celdas contiguas.

El hecho de ser inmunocompetentes evitaba problemas derivados de la respuesta inmunológica, ya que los resultados en estudios sobre cáncer no son extrapolables a la situación humana cuando se utiliza el modelo de ratón nude, debido a que los animales presentan una depleción de su sistema inmune, algo que no ocurre con el ratón SKH-1, que presenta un sistema inmunitario funcional.

El papel del sistema inmune en el desarrollo del cáncer cutáneo ha quedado demostrado debido a que los pacientes inmunodeprimidos como consecuencia de haber sido tratados con fármacos inmunosupresores tras un trasplante de órganos, presentan una incidencia elevada de carcinomas cutáneos letales (Berg, 2002).

El modelo elegido es fácilmente reproducible y de bajo coste, y en el que la exposición crónica a las radiaciones provoca todo 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):

Estudios histológicos revelan que la exposición aguda a las RUV es suficiente para aumentar el grosor de la epidermis de ratones SKH- 1 como ocurre en la piel humana fotoenvejecida (Pearse, 1987; Yaar, 2007). De igual forma, se ha observado que la exposición crónica a las RUV en los ratones SKH- 1, provoca un incremento del espesor de la epidermis de estos animales (hiperplasia) (Moloney, 1992).

La principal diferencia de nuestro modelo experimental con la mayoría de los estudios propuestos en la bibliografía, es el uso de RUV-A (Wang, 2002; Syed, 2006; Pacheco-Pàlencia, 2008; Hwang, 2011; Shimada, 2011), frente al uso común de RUV-B (Cho, 2007, Kundoor, 2007; Cherng, 2011; Sharma, 2011) para reproducir las lesiones propias del fotoenvejecimiento como consecuencia de la exposición a las RUV.

La radiación UVB es un carcinógeno completo y puede generar carcinomas de tipo escamoso en animales (Black, 1997). Como hemos dicho anteriormente, el DNA absorbe UVB, hecho que implica la generación de mutaciones puntuales del tipo C→T y CC→TT. Para algunos autores el espectro de acción para la generación de carcinoma escamoso abarca principalmente la región UVB, atribuyéndose a la región UVA solamente una cierta actividad carcinogénica (de Gruijl, 1994). Estos autores consideran que mientras que la energía UVB es importante en la iniciación del tumor, la energía UVA interviene predominantemente en la promoción del mismo.

Sin embargo comparada con la energía UVB, la radiación UVA genera mayor estrés oxidativo (Gaboriau, 1995; Tyrrell, 1996), y en el conjunto de la radiación solar, la energía UVA es 10 veces más eficiente que la UVB en la producción de reacciones de peroxidación lipídica (Morliere, 1995). Por todo ello, algunos autores sugieren que la radiación UVA es más citotóxica que la UVB (de Gruijl, 2000).

La energía UVA daña el DNA mediante la producción de rupturas de cadena y la oxidación de los ácidos nucleicos (Wenczl, 1997). Esta radiación puede también inhibir la reparación del DNA (Parsons, 1985). Además, puede inducir la síntesis de metaloproteinasas de la matriz extracelular

(MMP), lo que puede aumentar la agresividad biológica del cáncer de piel (Fisher, 2001).

Aunque la mayoría de estudios sobre inmunosupresión provocada por la radiación UV se han llevado a cabo utilizando fuentes de energía UVB (Duthie, 1999), estudios recientes han resaltado la importancia de la radiación UVA en la producción de inmunosupresión (Nghiem, 2001) y la capacidad de los antioxidantes para prevenirla (Halliday, 1998).

La energía correspondiente a la región UVA de la luz solar es unas 20 veces superior a la de la región UVB. Además, mientras que la radiación UVB es prácticamente absorbida en su totalidad por la epidermis, la energía UVA es capaz de alcanzar las capas dérmicas (Gilchrest, 1983) e incluso afectar las células sanguíneas circulantes (Moller, 2002). La radiación UVA, además de ser más eficiente que la UVB para la producción de ERO en la piel, provoca efectos adicionales distintos de los provocados por la radiación UVB.

En nuestro estudio, se ha trabajado con una lámpara que emitía RUV fundamentalmente de tipo A, con un 98,6%, frente al 1,45% que emitía de B.

Con un 100% de incidencia de carcinomas espinocelulares en el grupo control, hemos puesto de manifiesto que la RUVA es capaz de provocar todas las lesiones tisulares del fotoenvejecimiento, atribuidas en su totalidad erróneamente a las RUVB por otros autores.

Las dosis de irradiación UV y los períodos de exposición empleados para provocar la fotocarcinogénesis, *in vivo*, varían considerablemente de unos estudios a otros.

Por ejemplo, Berton y cols (2001) y Sharma y cols (2011), aplicaron una irradiación de 500 mJcm^{-2} . En el experimento de Cherg (2011), se utilizó una intensidad de 180 mJ/cm^2 , 2 veces a la semana durante 20 semanas, con una duración de 2 minutos y 40 segundos. Kundoor y cols (2007), irradiaron con 180 mJ/cm^2 , 2 veces por semana durante 30 semanas y en los experimentos de Wang (2002), se aplicó una intensidad de $151,68 \text{ J cm}^{-2}$.

$2d^{-1}$, durante 30 días, con una radiación total absorbida de $4556,4 \text{ J/cm}^2$. Otros autores aplican un incremento gradual de la intensidad de la radiación; así Cho (2007), aumentó la dosis de radiación de 30 a 180 mJ/cm^2 , 3 veces a la semana durante 10 semanas.

En resumen, las intensidades de las diferentes longitudes de onda en los artículos revisados oscilaban entre $90\text{-}180 \text{ mJ/cm}^2$ cuando nos referimos a la radiación UVB y entre $90\text{-}152 \text{ J/cm}^2$ para la radiación UVA (Syed, 2006).

En estudios “*in vitro*”, cuando se irradiaban líneas celulares, por ejemplo queratinocitos humanos (HaCaT) con UVB (Afaq, 2005, Afaq 2008), las intensidades eran mucho menores (entre $15\text{-}40 \text{ mJ/cm}^2$) (Hwang, 2011) que cuando se hacía sobre animales ($90\text{-}180 \text{ mJ/cm}^2$).

Podríamos decir que no existe consenso internacional sobre las dosis de radiación a utilizar y que por lo tanto muchos trabajos no son comparables entre sí. Nosotros hemos empleado la lámpara de bronceado cosmético Philips Tipo HB 554/O1/A con 8 tubos Philips Performance S100W, que emite en un espectro de 220 a 425nm y un pico máximo de 364nm (98,6% UVA y 1,45 UVB), 3 veces a la semana, durante 60 minutos con una energía absorbida por sesión de $21,1 \text{ J/cm}^2$.

El fotoenvejecimiento cutáneo producido por la acción de la RUV conlleva cambios en todas las capas de la piel. Macroscópicamente, la piel aparece más seca, rugosa y menos elástica, presenta arrugas, elastosis y cambios de pigmentación y desarrolla lesiones queratósicas y, en último término, neoplásicas (Rabe, 2006; Yaar, 2007). Todos estos cambios se corresponden histológicamente con una compactación del estrato córneo y el engrosamiento irregular de la capa granular, que están relacionados con la sequedad y rugosidad. Los acúmulos desorganizados de elastina y de material amorfo en la dermis son responsables de la elastosis y la falta de elasticidad; las atipias y la pérdida de polaridad de los queratinocitos y la hiperplasia epidérmica causan las queratosis actínicas, mientras que los cambios de pigmentación se relacionan con los cambios en abundancia y actividad de los melanocitos (Svobodova, 2006; Yaar, 2007).

Según lo planteado en nuestro primer objetivo, conseguimos comprobar el efecto patológico de la exposición crónica a las RUV, ya que todos los animales del estudio, desarrollaron, en mayor o menor medida, los cambios en las diferentes capas de la piel que caracterizan al fotoenvejecimiento (arrugas longitudinales profundas, engrosamientos, queratosis y telangiectasias), así como displasia de diferente grado, cacinomas "*in situ*" y carcinomas invasores.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en otros estudios similares con modelos animales en cuanto a los cambios histológicos, presentando los animales expuestos de forma crónica a las RUV todo el espectro de signos clínicos e histopatológicos descritos previamente por diversos autores (Bernstein, 1996; Kambayashi, 2001; Wang, 2002; Matsumura, 2004, Mitani, 2004; Reeve, 2005), consistentes en: eritema y telangiectasias superponibles a las lesiones agudas observadas en humanos tras la exposición prolongada al Sol (Diffey, 1998 b); múltiples áreas de engrosamiento cutáneo, que corresponderían a las lesiones de presentación subaguda en humanos; presentación progresiva de arrugas profundas y de lesiones similares a las queratosis actínicas, así como neoplasias que semejarían las lesiones de exposición crónica en humanos (Ananthaswamy, 1998).

En los animales control, a partir de las 50 sesiones, eran muy frecuentes las lesiones eritemato-escamosas, dispuestas en placas irregulares, con erosiones centrales y bordes sobreelevados, recubiertas por costras fibrino-hemorrágicas. Toda la superficie cutánea del dorso mostraba áreas con engrosamiento cutáneo irregular de aspecto queratósico, firmes a la palpación e incluso con fijación a planos profundos. Las lesiones ulceradas eran también muy frecuentes, con bordes irregulares y engrosados.

A partir de las 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 y sangraban de forma espontánea.

El área cutánea total ocupada por lesiones objetivables en este grupo fue muy elevada, con una superficie de $190,43 \pm 157,52 \text{mm}^2$.

Microscópicamente, en la epidermis 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, más hiperqueratosis, disqueratosis y diversos grados de displasia. Existían múltiples áreas de carcinoma *in situ*, así como focos de carcinoma microinvasor y carcinomas de células escamosas. Las lesiones epiteliales malignas afectaron a todos los animales control (incidencia del 100%), lo que puso de manifiesto la efectividad del modelo. 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 y como era lógico, tampoco se desarrollaron melanomas, ya que el sistema melanocítico de estos animales es prácticamente inexistente.

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

Son numerosos los estudios que han demostrado una disminución de la respuesta inflamatoria, estrés oxidativo, daño en el ADN, aparición temprana de eritema, arrugas prematuras u otras consecuencias de una exposición excesiva a las RUV, tras el tratamiento con compuestos naturales, proceso conocido como **quimioprevención**.

Entre los agentes botánicos fotoprotectores más conocidos y utilizados en experimentación se encuentran: apigenina, curcumina, silimarina, resveratrol y té verde, entre otros.

Estos agentes botánicos no se consideran tóxicos y farmacológicamente son seguros para el consumo humano. Muchos de ellos han demostrado ser eficaces en diferentes modelos animales administrados en el agua de bebida, como suplementos dietéticos, o tópicamente, dependiendo de la naturaleza del agente (Baliga, 2005). La suplementación en la utilización de protectores solares con estos agentes podría proporcionar una estrategia eficaz para la prevención de cánceres de piel melanoma y no melanoma en los seres humanos.

En nuestro trabajo, nos planteamos el estudio del efecto de los extractos de granada, fresno y uva sobre el modelo empleado, debido a que son muchos los estudios que avalan la hipótesis de que estas sustancias polifenólicas, tienen un efecto favorable en el tratamiento o prevención de algunos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer cutáneo (Afaq, 2006).

El **extracto de granada** utilizado en el presente estudio es rico en polifenoles, especialmente taninos, taninos elágicos, antocianinas, catequinas y ácidos gálico y elágico. Aunque otros autores han empleado la pulpa o las semillas, el extracto utilizado en nuestro trabajo se obtuvo de la corteza de *Punica granatum*. Existen múltiples trabajos tanto *in vitro* como *in vivo*, que han demostrado sus propiedades anticancerosas en diferentes tipos de cáncer (mama, colon, próstata etc.) (Sreekumar, 2014) pero especialmente en el cáncer cutáneo asociado a la exposición solar crónica (Seeram, 2005; Afaq, 2006).

En nuestro estudio, en los animales tratados con E. de granada, las lesiones cutáneas evolucionaron de forma similar a la del grupo control, aunque con mayor lentitud, de forma que se hacían patentes alrededor de dos o tres semanas más tarde. Asimismo, alcanzaban diámetros menores y afectaban a áreas cutáneas menos extensas.

Las lesiones eritemato-erosivas no se observaron antes de las 65 sesiones. Las lesiones queratósicas, las ulceradas y las neoformaciones nodulares no se observaban antes de las 70 sesiones, e incluso en 8 animales no se presentaron lesiones de estas características. Observamos

un retraso en la presentación de dichas lesiones de entre 6-9 semanas respecto a los animales control.

El grupo tratado con E. de granada, presentó los mejores resultados en cuanto a las áreas de lesión, con una media de $4,65 \pm 3,18 \text{ mm}^2$, mostrando diferencias significativas respecto al control. Es decir, que la superficie cutánea afectada por lesiones en este grupo se redujo en un 97,56% respecto al grupo control.

Respecto a las lesiones microscópicas, la incidencia de carcinomas invasores e *in situ* fue de un 10% en ambos casos, muy inferior al control. Los animales que no presentaron lesiones malignas fueron ocho, de los que ninguno de ellos presentó displasia severa y predominaba la hiperplasia y la displasia leve.

El mecanismo de acción del extracto de granada en su papel de inhibidor de la carcinogénesis cutánea no está totalmente dilucidado, pero se ha comprobado su efecto sobre diversos procesos relacionados con la inflamación o la captación de radicales libres, entre otros. Para Hora y cols (2006), el aceite de semilla de granada posee actividad quimiopreventiva frente al cáncer cutáneo, ya que tras la aplicación tópica del aceite a una concentración del 5%, se consiguió una disminución significativa en la incidencia de tumores de la piel, y de la actividad de la ornitina descarboxilasa durante las semanas de la promoción tumoral (Longtin, 2003). Por tanto, es probable que la inhibición de la ornitina descarboxilasa por el aceite de semilla de granada sea al menos parcialmente, la responsable del efecto quimiopreventivo. El aceite de semilla de granada es muy rico en ácido punícico, un conocido inhibidor de la biosíntesis de prostaglandinas, específicamente mediante la inhibición de la ciclooxigenasa (Cox 1 y Cox 2) y la lipooxigenasa del aceite de semilla de granada.

Las prostaglandinas, en concentraciones muy bajas promueven la ornitina decarboxilasa (Cameron, 1983), sugiriendo que la inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas por el aceite de semilla de granada también

podría contribuir a la atenuación de la actividad ornitina descarboxilasa y, en última instancia, a la inhibición de la promoción de cáncer de piel.

En un modelo de carcinogénesis en rata CD-1, al aplicarle en forma tópica extracto de fruta de granada, se demostró que éste tenía propiedades que inhibían el desarrollo de tumores cutáneos (Chidambara, 2002; Afaq, 2005). La aplicación local de un extracto de cáscara de granada, similar al empleado por nosotros, recuperaba la actividad de las enzimas catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa en la piel de ratas.

En queratinocitos humanos normales, se ha observado que los extractos de granada protegen de los efectos adversos inducidos por la RUV-B (Afaq, 2005). Los mismos autores demostraron posteriormente que el tratamiento previo de las células HaCaT (línea de células inmortales de queratinocitos humanos) con polifenoles ricos en extracto de granada inhibía la disminución de la viabilidad mediada por las UVB, así como también, el contenido de glutatión intracelular, y aumentaba la peroxidación lipídica. Además, el incremento de la regulación de las metaloproteinasas y la fosforilación de las MAPKinasas también era inhibido, lo cual sugiere que los extractos de granada protegen del estrés oxidativo provocado por las radiaciones UVB, así como también, de los indicadores de fotoenvejecimiento.

Los resultados de los estudios *in vitro* con piel artificial, sugieren que los aceites derivados de las semillas de granada pueden promover la regeneración epidérmica, y los derivados de la cáscara de estas frutas promueven la regeneración de la dermis (Aslam, 2006).

Por tanto, debido a la cantidad de trabajos *in vitro* e *in vivo*, que han reportado efectos beneficiosos del tratamiento con extracto de granada, en todas las formas de aplicación y de cualquiera de las partes del fruto (corteza, pulpa y semilla), sobre el cáncer cutáneo provocado por la irradiación solar crónica, parece evidente que se trata de agentes quimiopreventivos que mejoran el daño por la RUV al modular algunas vías celulares (Syed, 2006).

El **extracto de fresno** usado en nuestro estudio provenía del polvo de la semilla del árbol *Fraxinus excelsior* L. Los principales ingredientes activos contenidos en el mismo, eran los secoiridoides, nuzhenida y GI3.

En nuestro estudio, los animales del grupo que recibió el tratamiento con extracto de fresno en la dieta presentaron unas áreas de lesión inferiores a las del grupo control, con una media de $23,11 \pm 43,20$ mm², con diferencias estadísticamente significativas. Es decir, que la superficie cutánea afectada por lesiones en este grupo se redujo en un 87,86% respecto al grupo control. Las lesiones macroscópicas se desarrollaron en seis de los animales irradiados (66,6%), caracterizándose éstas por presentar características de malignidad: fijación a planos profundos, áreas de necrosis y sangrado espontáneo. Observamos un retraso en la presentación de dichas lesiones de entre 5-7 semanas respecto a los animales control.

En el estudio microscópico fueron diagnosticados cinco carcinomas invasores (55,5%), siendo esta incidencia en el grupo control del 100%. En los animales que no desarrollaron carcinomas, se observaron diferentes grados de lesión, destacando la usencia de carcinoma *in situ* y de displasias tipo III, predominando la hiperplasia (44%) y la displasia tipo I (33%).

A pesar de que no hemos encontrado referencias del uso del fresno en fotocarcinogénesis, sí se ha descrito la relación de algunos de los compuestos presentes en el fresno, como son la nuzhenida y GI3, con la fotocarcinogénesis, al actuar como ligandos agonistas del PPAR, pudiendo producir un efecto quimiopreventivos en la fotocarcinogénesis y fotoenvejecimiento.

El receptor activador de la proliferación de los peroxisomas isoforma o PPAR es miembro de la superfamilia de los receptores para hormonas nucleares o NHR (Saltiel, 1996; Lehmann, 1995). El PPAR tiene 2 sub-tipos: el PPAR¹ que se expresa en la mayoría de los tejidos y el PPAR² que es específico de los adipocitos (tejido que tiene uno de los más altos niveles del PPAR) (Koeffler, 2003). El PPAR tiene funciones como factor de

transcripción y al ser activado por su ligando se dimeriza con el receptor x retinoide o RXR (el cual simultáneamente puede ser activado por su ligando) uniéndose a los elementos de respuesta de la proliferación peroxisomal en los genes diana (Mangelsdorf ,1995; Mukherjee, 1997; Corton ,2000).

Dentro de los ligandos conocidos del PPAR se encuentran la nuzhenida, GI3 y G5, la 15-deoxi- (Cummings, 1989; Cuzick, 1995) prostaglandina J₂ (Castaño, 2003), las tiazolidinedionas (TZDs) (Hayden, 2004) y algunos compuestos recientemente sintetizados como el triterpenoide el cual puede inducir la diferenciación e inhibir la proliferación de una gran variedad de células neoplásicas, además de presentar también actividad antiinflamatoria (Suh, 1999; Wang, 2000; Koeffler, 2003; Place ,2003).

Los genes diana que median la actividad anti-cancerígena de estos compuestos no se conocen aún, sin embargo, cuando se administran ligandos de los PPARg se expresan una serie de proteínas con propiedades anti-carcinogénicas en las células tumorales, que se cree son reguladas por estos genes (p21^{Waf1}, p27^{Kip1}, BCL-2, BCL-X_L) (Karin, 2000; Gupta, 2001; Joyce ,2001).

Se ha demostrado previamente que la irradiación con UVB induce la producción de glicerofosfolinas oxidadas (ox-GPCs) con potente actividad ligando PPARC en líneas celulares (Nandi, 1995) de células epiteliales (Yager, 1996).

Existen estudios que proporcionan pruebas de que las PPARC epidérmicas juegan un papel protector en la formación de CPNM (cáncer de piel no melanoma) inducido por RUVB en ratones (Sahu, 2012). En este estudio, se apoya la idea de que la oxidación inducida por RUVB en los lípidos celulares representa la fuente de la actividad de los ligandos de PPARC. Se aportan pruebas de que las PPARC de la epidermis actúan suprimiendo la formación de tumores inducidos por UVB y la progresión del tumor.

Por otra parte, las PPARC epidérmicas regulan la apoptosis inducida por RUVB y también actúan suprimiendo la inflamación aguda y crónica y el eritema inducido por las RUVB.

Curiosamente, estudios recientes sugieren que la activación PPARb/d también protege a los ratones contra la carcinogénesis cutánea (Bility, 2010).

Esto es coherente con la idea de que PPARC actúa para suprimir la promoción tumoral inducida por UVB y la expansión clonal de las células iniciadas. Esta idea es apoyada por estudios de carcinogénesis química llevados a cabo por Indra y cols (Indra, 2007).

En conclusión, se demuestra que la irradiación de la epidermis con UVB provoca la producción de ligandos de PPARC y que la posterior activación de los PPARC epidérmicos por diferentes agentes, probablemente juegue un papel importante en la supresión de la fotocarcinogénesis. Los mecanismos de esta actividad anticancerígena podrían explicarse por la capacidad de los PPARC epidérmicos para regular la apoptosis inducida por UVB y, posiblemente también, la reparación del ADN, para suprimir la respuesta inflamatoria cutánea y para regular la diferenciación epidérmica.

El **extracto de uva** de nuestro estudio es un extracto seco, natural, obtenido a partir de un proceso tradicional con las uvas enteras (*Vitis vinífera L*). Las uvas son ricas en polifenoles y el 60-70% de ellos se encuentran en las semillas. El extracto de uva contiene polifenoles que incluyen derivados flavan-3-ol-catequinas, epicatequinas y oligómeros de proantocianidinas (Zhao, 1999).

El grupo tratado con E. de uva, fue el que presentó resultados menos favorables en cuanto a las áreas de lesión entre los grupos tratados, con una media de $75,9 \pm 67,10 \text{ mm}^2$, aunque este tratamiento también disminuyó el área lesional respecto al control con diferencias significativas. Es decir, que la superficie cutánea afectada por lesiones en este grupo se redujo en un 60,14% respecto al grupo control desde un punto de vista macroscópico.

Todos los animales desarrollaron lesiones externas, de los que seis mostraron características de malignidad: con fijación a planos profundos, áreas de necrosis y sangrado espontáneo. Microscópicamente fueron diagnosticados cinco carcinomas invasores (55,5%) y un carcinoma *in situ* (11%). Entre los animales que no desarrollaron carcinomas, predominaba la displasia I (22%) y la hiperplasia (33,3%), no observándose displasia II/III.

Respecto al mecanismo de acción de los polifenoles de la uva frente a la carcinogénesis, parece que las principales moléculas biológicamente activas son las proantocianidinas y el resveratrol.

Para algunos autores, las proantocianidinas de semilla de uva (PSU) son potentes y mejores antioxidantes y eliminadores radicales libres que los del ácido ascórbico o la vitamina E (Bagchi, 1997; Joshi, 2001). Bouhamidi y cols. (Bouhamidi, 1998) observaron que el tratamiento con PSU inhibía la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados *in vitro* (provocada mediante irradiación UVC) a muy bajas concentraciones fisiológicamente alcanzables (2 mgL^{-1}) y que este efecto era mejor que el de los monómeros de epigallocatequina y galato epigallocatequina.

En un trabajo publicado por Mittal y cols. (2003), la suplementación dietética de PSU (0,5 %, w/w) dio lugar a la prevención de la transformación maligna de papilomas a carcinomas en ratones, en términos de la incidencia de carcinomas (45 % de inhibición), multiplicidad de carcinomas (61 % de inhibición) y el tamaño de los mismos (inhibición 75 %) en comparación con los ratones no tratados con PSU siguiendo protocolos de carcinogénesis cutánea inducida por RUVB.

El **resveratrol** (conocido químicamente como trans -3, 5, 4'-trihidroxi-trans-estilbeno), inhibe diversos eventos celulares asociados con la iniciación, promoción y progresión del cáncer de piel y cánceres de otros órganos (Jang, 1997; Aziz, 2003; Cal, 2003). Su aplicación tópica previa a la irradiación con RUVB dio como resultado una inhibición significativa del grosor del pliegue cutáneo (marcador de edema), así como de la respuesta hiperplásica, la infiltración de leucocitos, la generación de peróxido de

hidrógeno, la peroxidación de lípidos y las actividades de la COX-2 y la ornitina descarboxilasa en ratones SKH-1 (Afaq, 2003 a; Aziz, 2005).

El extracto de uva utilizado en nuestro estudio, fue obtenido a partir de las semillas de uva, por lo que la actividad anticancerígena podría estar relacionada con el contenido en proantocianinas, ya que en este extracto no había resveratrol. El mecanismo de acción de las proantocianidinas de la uva está basado en las acciones sobre: el estrés oxidativo, mediado por la fosforilación de proteínas de la familia de MAPK y la activación de los factores de transcripción NF- κ B, en todas estas activaciones de los factores actúan las citoquinas proinflamatorias y toda la cascada de COX.

El hecho de que en la bibliografía consultada se describan mayores efectos beneficiosos del tratamiento con polifenoles de la uva que los obtenidos en nuestro trabajo (Aziz, 2005; Ndiaye, 2011), podría deberse a que en la práctica totalidad de los casos, los productos estudiados contenían resveratrol, que no estaba presente en el extracto aplicado por nosotros.

El **antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)** es una proteína auxiliar necesaria para la síntesis de ADN (Wood, 1997) y la reparación del ADN (Shivji, 1992). La cuantificación del PCNA se utiliza como un marcador de la proliferación celular en los tejidos para evaluar la eficacia de los fármacos quimiopreventivos en la investigación del cáncer (Janakiram, 2012; Smolarek, 2013).

Un incremento anormal de células PCNA positivas, ha sido documentado en el carcinoma de células escamosas en comparación con otras neoplasias queratinocíticas (Saida, 1992) y en comparación con otras enfermedades de la piel no malignas (Kawahira, 1999). Los estudios inmunohistoquímicos han mostrado también un aumento de la tinción de PCNA nuclear en los carcinomas de células basales clínica e histológicamente agresivos (Toth, 1996).

La exposición de la piel a la radiación UV aumenta el potencial de proliferación de las células de la piel, esto se refleja en un aumento de células PCNA positivas en la epidermis y la dermis.

PCNA participa en la síntesis y el metabolismo de ácido nucleico y juega un papel importante en la recombinación, replicación, y reparación del ADN. Cuando se produce un daño en el ADN, la expresión de PCNA aumenta y realizando una función de reparación del ADN. Por lo tanto, la expresión de PCNA es un marcador de la reparación del ADN y podría aplicarse como un indicador de daño inducido por RUV.

El índice de proliferación celular utilizando PCNA se ha descrito como un factor pronóstico independiente de sobrevida (Niezabitowsk, 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).

Como describimos anteriormente, después de la exposición a RUV la expresión de PCNA aumentó de forma considerable en el grupo control con respecto a los grupos tratados. La expresión de PCNA en los tumores de los

grupos tratados disminuyó alrededor del 38,67%, 18,92% y 19,79% después de tratamiento con E. de granada, E. de fresno y E. de uva, respectivamente. Esta menor intensidad de marcaje con PCNA en los grupos tratados, nos indica que los extractos estudiados han contribuido a disminuir la tasa de proliferación celular de los tumores cutáneos desarrollados en nuestro modelo, hecho que se asocia con un comportamiento biológico menos agresivo y por tanto, mejor pronóstico.

Estos resultados coinciden con otros estudios realizados en los que se reveló una disminución de la expresión de PCNA tras el tratamiento con granada (Syed, 2006; Afaq, 2010) y uva (Ndiaye, 2011). Estos autores observaron que la incorporación a la dieta de estos extractos provocaba una disminución de la expresión de la proteína PCNA en la piel de ratones irradiados con UVB.

Resumen

VII. Resumen

La piel sufre, con el paso del tiempo, el envejecimiento cronológico o intrínseco, pero además, debido a la exposición prolongada a la radiación solar, puede verse afectada por el denominado fotoenvejecimiento o envejecimiento extrínseco. Este fenómeno está caracterizado por lesiones cutáneas más extensas y, sobre todo, de mayor gravedad, pues engloba también la presentación de cánceres cutáneos (fotocarcinogénesis).

Diversas sustancias polifenólicas de origen botánico, por su capacidad antioxidante, podrían mediar en los mecanismos del fotoenvejecimiento, evitando la formación de radicales libres, el daño al material genético, y en última instancia en la prevención del cáncer cutáneo.

Existen limitaciones éticas del desarrollo de modelos experimentales en humanos. Por este motivo, el primero de los objetivos de nuestro trabajo fue el establecimiento de un modelo de fotoenvejecimiento cutáneo en ratones SKH-1 mediante la exposición crónica a la radiación ultravioleta.

El segundo objetivo de nuestro estudio, fue evaluar las propiedades de los extractos de granada, fresno y uva, como posibles fotoprotectores. Para la realización de este estudio utilizamos 48 ratones hembras SKH-1/CRL, que se sometieron a radiación ultravioleta, 60 minutos por sesión, tres veces por semana, durante un total de 75 sesiones, con una energía total absorbida por animal, de 1.688 J/cm^2 . Los ratones se dividieron en cuatro grupos. El primero sólo recibió RUV (Control) y los otros tres eran tratados oralmente con los antioxidantes en el pienso: Extracto de Granada (grupo I), Fresno (grupo II) y Uva (grupo III).

Todos los animales expuestos a las RUV presentaron alteraciones características del fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis cutáneos, por lo que consideramos el modelo experimental como óptimo para el estudio de esta patología, pues la exposición crónica a las radiaciones provoca el espectro de

lesiones propias del fotoenvejecimiento, si la exposición es prolongada (entre 65-80 sesiones) y además se trata de un modelo fácilmente reproducible y de bajo coste.

De los extractos estudiados, el que mostró mejores propiedades sobre el fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis, fue el E. de granada, con una reducción de las áreas lesionales de un 97,56% respecto al grupo control, de un 90% en la incidencia de carcinomas invasores y de un 38,67% en la tasa de proliferación tumoral (PCNA). Además, el tiempo de presentación de las lesiones fue de los más tardíos entre los polifenoles estudiados.

Debido a los prometedores resultados descritos en la bibliografía consultada y los obtenidos por nosotros mismos, consideramos útil realizar ensayos clínicos con los agentes estudiados, que permitan conocer el posible efecto preventivo frente al cáncer cutáneo en humanos, ya sea mediante su incorporación a cremas solares o a la dieta, y su posible papel como agentes coadyuvantes en el tratamiento convencional de esta patología.

Conclusiones

VIII. Conclusiones

1. La exposición crónica a la radiación ultravioleta provocó, en todos los animales del grupo control, la fotocarcinogénesis cutánea, con un cien por ciento de incidencia de carcinomas espinocelulares.
2. Todos los animales de los grupos tratados mostraron menor área cutánea lesionada que el grupo control, existiendo diferencias significativas con los extractos de granada y fresno. Además, dichas lesiones se presentaban de forma más tardía y progresaron con mayor lentitud que en los animales control.
3. El tratamiento con los extractos estudiados provocó una inhibición de la carcinogénesis del 44,5% en el caso del fresno y la uva y del 90% con el extracto de granada.
4. Los tumores desarrollados por los animales tratados mostraron una menor proliferación celular respecto a los del grupo control (determinada mediante PCNA), que fue significativa en los tratados con granada y fresno.

Bibliografía

IX. Bibliografía

Afaq F, Adhami VM y Ahmad N. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003 a; 186, 28–37.

Afaq F, Adhami VM, Ahmad N, Mukhtar H. Inhibition of ultraviolet B-mediated activation of nuclear factor kappaB in normal human epidermal keratinocytes by green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Oncogene.* 2003; 22: 1035–1044.

Afaq F, Ahmad N, Mukhtar H. Suppression of UVB-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor kappa B by green tea polyphenol in SKH-1 hairless mice. *Oncogene.* 2003; 22: 9254–9264.

Afaq F, Hafeez BB, Syed DN, Kweon MH, Mukhtar H. Oral feeding of pomegranate fruit extract inhibits early biomarkers of UVB-radiation-induced carcinogenesis in SKH-1 hairless mouse epidermis. *J Invest Dermatol.* 2006 a; 126: 141.

Afaq F, Katiyar SK. Polyphenols: Skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. *Mini Rev Med Chem.* 2011; 11(14): 1200-1215.

Afaq F, Malik A, Syed D, Maes D, Matsui M S, Mukhtar H. Pomegranate fruit extract modulates UVB-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and activation of nuclear factor kappa B in normal human epidermal keratinocytes. *Photochem Photobiol.* 2005 a; 81(1): 38–45.

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

Afaq F, Mukhtar H. Photochemoprevention by botanical antioxidants. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2002; 15: 297–306.

Afaq F, Saleem M, Krueger CG, Reed JD, Mukhtar H. Anthocyanin and hydrolysable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int J Cancer*. 2005 b; (Jan 20); 113(3):423-33.

Aitken J, Welch J, Duffy D, Milligan A, Green A, Martin N, Hayward N. CDKN2A variants in a population-based sample of Queensland families with melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 1999; 91: 446-452.

Almendral JM, Huebsch D, Blundell PA, Macdonald-Bravo H, Bravo R. Cloning and sequence of human nuclear protein cyclin: homology with DNA binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987; 84: 1575-1579.

Ames BN, Shigenaga M, Hagen T. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90, 7915-7922.

Ananthaswamy HN, Fourtanier A, Evans RL, Tison S, Medaisko C, Ullrich SE, Kripke ML. p53 mutations in hairless SKH-hr1 mouse skin tumors induced by a solar simulator. *Photochem Photobiol*. 1998; 67: 227-32.

Armstrong BK, Kricger A. How much melanoma is caused by sun exposure? *Melanoma Res*. 1993; 3: 395-401.

Aslam MN, Lansky EP, Varani J. Pomegranate as a cosmeceutical source: pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. *J Ethnopharmacol*. 2006; 103:311-318.

Autier P, Dore JF. Influence of sun exposures during childhood and during adulthood on melanoma risk. EPIMEL and EORTC Melanoma Cooperative Group. European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *Int J Cancer*. 1998; 77: 533- 537.

Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, Volkova N, Presser D, Attias J, Liker H, Hayek T. Pomegranate juice consumption for

3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical Nutrition*. 2004; 23:423-433.

Aviram,M, y Dornfeld L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis*. 2001; 158:195-198.

Aviram,M., Volkova N, Coleman R, Dreher M, Reddy MK, Ferreira D, Rosenblat M. Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein e-deficient (E 0) mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins. *J. Agric. Food Chem*. 2008; 56:1148-1157.

Aziz M H, Reagan-Shaw S, Wu J, Longley B J, Ahmad N. Chemoprevention of skin cancer by grape constituent resveratrol: relevance to human disease? *FASEB J*. 2005 a; 19: 1193–1195.

Aziz M.H., Kumar R, Ahmad N. Cancer chemoprevention by resveratrol: *in vitro* and *in vivo* studies and the underlying mechanisms (review), *Int. J. Oncol*. 2003; 23, 17–28.

Aziz MH, F. Afaq F y Ahmad N, Prevention of ultraviolet B radiation-damage by resveratrol in mouse skin is mediated *via* modulation in Survivin. *Photochem. Photobiol*. 2005 b; 81, 25–31.

Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, y cols. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*. 2000; 148:187-197.

Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Tran MX y Stohs SJ. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract *in vitro*. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol*. 1997; 95, 179–189.

Bai, N, He K, Ibarra A, Bily A, Roller M, Chen X, Ruhl R. Iridoids from *Fraxinus excelsior* with adipocyte differentiation-inhibitory and PPAR-alpha activation activity. *J. Nat. Prod.* 2010; 73:2-6.

Baliga MS, Katiyar SK. Chemoprevention of photocarcinogenesis by selected dietary botanicals. *Photochem Photobiol Sci.* 2006; Feb; 5(2):243-53.

Becker BF. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med.* 1993; 14, 615-631.

Becker JC, Houben R, Schrama D, Voigt H, Ugurel S, Reisfeld RA. Mouse models for melanoma: a personal perspective. *Exp Dermatol.* 2010.

Benavente-Garcia, O, Castillo J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, an anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem.* 2008; 56:6185-205.

Benavides, F., Oberyszyn TM, A. VanBuskirk AM, Reeve VE, Kusewitt DF. The hairless mouse in skin research. *J. Dermatol. Sci.* 2009; 53, 10–18.

Benedetto AV. The environment and skin aging. *Clin Dermatol.* 1998; 16: 129-39.

Beremblum I. A speculative review: The probable nature of promoting action and its significance in the understanding of the mechanism of carcinogenesis 1954. *Cancer Res*; 14: 471-477.

Berg D, Otley CC. Skin Cancer in organ transplant recipients: epidemiology, pathogenesis, and management. *J Am Acad Dermatol.* 2002; 47:1-17.

Berger, H., Tsambaos D, Mahrle G. Experimentalelastosis induced by chronic ultraviolet exposure. *Arch. Dermatol. Res.* 1980; 269, 39-49.

Bernstein EF, Underhill CB, Hahn PJ, Brown DB, Uitto J. Chronic sun exposure alters both the content and distribution of dermal glycosaminoglycans. *Br J Dermatol.* 1996; 135: 255–62.

Bernstein SC, Lim KK, Brodland DG, Heidelberg KA. The many faces of squamous cell carcinoma. *Dermatol Surg.* 1996; 22: 243-254.

Berton TR, Pavone A, Fischer SM. Ultraviolet-B irradiation alters the cell cycle machinery in murine epidermis in vivo. *J Invest Dermatol.* 2001; Nov; 117 (5):1171-8.

Bickers, D. R., M. Athar. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *Journal of Investigative Dermatology.* 2006; 126(12): 2565-75.

Bility MT, Zhu B, Kang BH, Gonzalez FJ, Peters JM. Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta and inhibition of cyclooxygenase-2 enhances inhibition of skin tumorigenesis. *Toxicol Sci.* 2010; 113:27–36.

Birt D.F, Mitchell D, Gold B, Pour P, Pinch HC. Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid, *Anticancer Res.* 1997; 17, 85–92.

Birt DF, Hendrich S y Wang W: Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther.* 2001; 90:157-177.

Black HS, deGruijl FR, Forbes PD, Cleaver JE. Photocarcinogenesis: an overview. *Photochem Photobiol.* 1997; 40:29-47.

Boots AW, Haenen GRMM, Bast A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *EU J Pharmacol.* 2008; 585 (2-3), 325-337.

Bouhamidi R, Prevost V y Nouvelot A, High protection by grape seed proanthocyanidins (GSPC) of polyunsaturated fatty acids against UV-C induced peroxidation, *C. R. Acad. Sci. III.* 1998; 321, 31– 38.

Bravo, R, Frank, R, Blunell, PA, y MacDonal-Bravo, H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerasa-delta. *Nature.* 1987 a Apr 2-8; 326(6112):515-7

Bravo, R, y 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.* 1987b; 105: 1549-1554.

Brenner, M. y V. J. Hearing. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochemistry and Photobiology.* 2008; 84(3): 539-49.

Broadhurst R.B. y W.T. Jones. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food Agric.* 1978; 29: 788-794.

Bruls, W. A., Slaper H, van der Leun JC y Berrens L. Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths. *Photochemistry and Photobiology.* 1984; 40(4): 485-94.

Busch, RK. y Busch, H. Antigenic proteins of nucleolar chromatin of Novikoff hepatoma ascites cells. *Tumori.* 1977; 63: 347-357.

Cadenas E. Basic mechanism of antioxidant activity. *BioFactors.* 1997; 6, 391-397.

Cal C, Garban H, Jazirehi A, Yeh C, Mizutani Y y Bonavida B. Resveratrol and cancer: chemoprevention, apoptosis, and chemoimmunosensitizing activities. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents.* 2003; 3, 77–93.

Cameron CM, Rillema JA. Effects of prostaglandins on the prolactin stimulation of lipid biosynthesis in mouse mammary gland explants. *Prostaglandins Leukot Med.* 1983; 10:433–441.

Cano A, Gómez FJ., Álvarez N, Sánchez-Pedreño P, Vicente V. Modelo de fotocarcinogénesis cutánea en ratones SKH-1 por radiación ultravioleta. *Revista Española de Patología* Volume 43, Issue 4, October–December. 2010; Pages 191–195.

Carey FA, Fabroni G, Lamb D. Expression of proliferating cell nuclear antigen in lung cancer: a systematic study and correlation with DNA ploidy. *Histopathology* .1992; 20: 499-503.

Castaño E, Gil J. 15-Deoxy-D12, 14 Prostaglandin J2 Synergizes With Phorbol Ester to Induce Proliferation in Swiss 3T3 Cells Independently of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma and PGD2 Receptors. *Journal of Cellular Physiology*. 2003; 195: 421–427.

Cerda B., Ceron JJ, Tomas-Barberan FA, Espin JC. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *J Agric Food Chem*. 2003 a; 51.

Cerda B., Llorach R, Ceron JJ, Espin JC, Tomas-Barberan FA. 2003b. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *Eur J Nutr*. 2003 b; 42(1):18-28.

Chatterjee M.L, R. Agarwal and H. Mukhtar, Ultraviolet B radiation-induced DNA lesions in mouse epidermis: an assessment using a novel ³²P-postlabelling technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1996; 229, 590–595.

Chaudiere J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanism. *Food Chem Toxicol*. 1999; 37, 949-962.

Cherng JM, Tsai KD, Perng DS, Wang JS, Wei CC, Lin JC. Diallyl sulfide protects against ultraviolet B-induced skin cancers in SKH-1 hairless mouse: analysis of early molecular events in carcinogenesis. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*. 2011; 27, 138–146.

Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Singh RP. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. *J Agric Food Chem*. 2002; 50:4791-5.

Cho HS, Lee MH, Lee JW, No, KO, Park SK, Lee HS, Kang S, Cho WG, Park HJ, Oh KW, Hong JT. Anti-wrinkling effects of the mixture of vitamin C, vitamin E, pycnogenol and evening primrose oil, and molecular mechanisms on hairless mouse skin caused by chronic ultraviolet B irradiation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2007; 23: 155–162.

Cleaver JE, Bootsma D. *Xeroderma pigmentosum*: Biochemical and genetic characteristics. *Annu Rev Genet*. 1975; 9: 19-38.

Corton J C, Anderson S P, Stauber A. Central role of peroxisome proliferator-activated receptors in the actions of peroxisome proliferators. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000; 40: 491-518.

Costin, GE. y Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *Faseb Journal*. 2007; 21(4): 976-94.

Cummings SR, Black DM, Rubin SM. Lifetime risks of hip, Colles,' or vertebral fracture and coronary heart disease among white postmenopausal women. *Arch Intern Med*. 1989; 149: 2445-2448.

Cuzick J, Baum M. Tamoxifen and contralateral breast cancer. *Lancet*. 1985; 2: 282.

da Silva R JM, Darman N, Fernandez Y, Mitjavila S. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *J Agric Food Chem*. 1991; 39:1549-1552.

Darlington S, Siskind V, Green L, Green A. Longitudinal study of melanocytic nevi in adolescents. *J Am Acad Dermatol*. 2002; 46: 715-722.

Davies, FM., Busch, RK, Yeoman, LC. y Busch, H. Differences of nucleolar antigens of rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells. *Cancer Res*. 1978; 38: 1906-1915.

de Gruijl FR, van der Leun JC. Estimate of the wavelength dependency of ultraviolet carcinogenesis in humans and its relevance to the risk assessment of stratospheric ozone depletion. *Health Phys.* 1994; 67:319-325.

de Gruijl FR. Photocarcinogenesis: UVA vs UVB. Singlet oxygen, UVA, and ozone. *Methods Enzymol.* 2000; 319:359-66.

de,NF, Balestrieri ML, Williams-Ignarro S, D'Armiento FP, Fiorito C, Ignarro LJ, y Napoli C. The influence of pomegranate fruit extract in comparison to regular pomegranate juice and seed oil on nitric oxide and arterial function in obese Zucker rats. *Nitric. Oxide.* 2007; 17:50-54.

Dhanalakshmi S., Mallikarjuna GU, Singh RP y Agarwal R. Silibinin prevents ultraviolet radiation-caused skin damages in SKH-1 hairless mice *via* a decrease in thymine dimer positive cells and an up-regulation of p53-p21/Cip1 in epidermis. *Carcinogenesis.* 2004; 8, 1459–1465.

Diffey BL, Gies HP. The confounding influence of sun exposure in melanoma. *Lancet.* 1998 a; 351: 1101-2.

Diffey,B.F. Ultraviolet radiation and human health.*Clinics in Dermatol.* 1998 b; 16:83-89.

Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Vina-Ribes J. Funcional food science and defense against reactive oxidative species. *Br J Nutr.* 1998; (supp1), S77-S112.

Dubreuilh W. Des hyperkeratoses circonscriptes. *Ann Dermatol Syph* (Series 3). 1896; 7:1158-1204.

Duthie MS, Kymber I, Norval M. The effects of ultraviolet radiation on the human immune system. *Br J Dermatol.* 1999; 140:995-1009.

Eddouks, M, Maghrani M, Zeggwagh NA, Haloui M, y Michel JB. Fraxinus excelsior L. evokes a hypotensive action in normal and spontaneously hypertensive rats. *J.Ethnopharmacol.* 2005; 99:49-54.

Eddouks, M, y Mabhrani M. Phlorizin-like effect of *Fraxinus excelsior* in normal and diabetic rats. J. Ethnopharmacol. 2004; 94:149-154.

Eddouks. L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. Phytothérapie. 2007; 5:194-203.

El Ghissassi F, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Coglianò V. A review of human carcinogens—Part D: radiation. Lancet Oncol. 2009; (8):751-2.

El-Ghazaly M, Khayyal MT, Okpanyi SN, Arens-Corell M. Study of the anti-inflammatory activity of *Populus tremula*, *Solidago virgaurea* and *Fraxinus excelsior*. Arzneimittelforschung. 1992; 42: 333-336.

Elmets CA, Singh D, Tubesing K, Matsui M, Katiyar S, Mukhtar H. Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. J Am Acad Dermatol. 2001; 44: 425–432. 37.

Elwood JM, Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. Int J Cancer. 1997; 73: 198- 203.

English, DR, Armstrong BK, Krickler A y Fleming C. Sunlight and cancer. Cancer Causes Control. 1997; 8(3): 271-83.

Epstein JH, Roth HL. Experimental ultraviolet carcinogenesis: A study of croton oil promoting effects. J Investig Dermatol. 1968; 50: 387-389.

Esmailzadeh A, Tahbaz F, Gaieni I, Alavi-Majd H, y Azadbakht L. Concentrated pomegranate juice improves lipid profiles in diabetic patients with hyperlipidemia. J. Med. Food. 2004; 7:305-308.

Espín JC, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA. Nutraceuticals: facts and fiction. Phytochemistry. 2007 Nov-Dec; 68(22-24):2986-3008.

F'guyer S, Afaq F, Mukhtar H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2003; 19: 56–72.

Fazekas Z, Gao D, Saladi RN, Lu Y, Lebwohl M, Wei H. Protective effects of lycopene against ultraviolet B-induced photodamage. *Nutr Cancer*. 2003; 47: 181-187.

Ferlay J, Bray FI, Pisani P, Parkin DM. *Globocan 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide*. 2001; 1 ed. IARC Press: Lyon.

Fernandez, MT, Mira ML, Florêncio MH, Jennings KR. Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *J Inorg Biochem*. 2002; 92:105-111.

Filip A, Clichici S, Daicoviciu D, Adriana M, Postescu ID, Perde-Schrepler M, Olteanu D. Photochemoprevention of cutaneous neoplasia through natural products. *Exp Oncol*. 2009; Mar; 31(1):9-15.

Fisher GJ, Choi HC, Bata-Csorgo Z, Chao Y, Datta S, Wang ZQ. Ultraviolet irradiation increases matrix metalloproteinase-8 protein in human skin in vivo. *J Invest Dermatol*. 2001; 117:219-226.

Fitzpatrick, TB. Soleil et peau. *J. Med. Esthet*. 1975; 2:33-34.

Folin O, Denis W. "A calorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine". *J. Biol. Chem*. 1915; 22, 305- 308.

Fraga, CG, Galleano M, Verstraeten SV, y Oteiza PI. Basic biochemical mechanism behind the health benefits of polyphenols. *Mol. Aspects Med*. 2010; 31:435-445.

Franceschi S, Levi F, Randimbison L, La Vecchia C. Site distribution of different types of skin cancer: new aetiological clues. *Int J Cancer*. 1996; 67: 24-28.

Frank, J, Kamal-Eldon A, Lundh T, Maata K, Torronen R, y Vessby B. Effects of dietary anthocyanins on tocopherols and lipids in rats. *J Agric Food Chem*. 2002; 50: 7226-7230.

Gaboriau F, Demoulins-Giacco N, Tirache I, Morliere P. Involvement of singlet oxygen in ultraviolet A-induced lipid peroxidation in cultured human skin fibroblasts. *Arch Dermatol Res.* 1995; 287:338-40.

Gallagher, RP y Lee TK. Adverse effects of ultraviolet radiation: a brief review. *Progress in Biophysics and Molecular Biology.* 2006; 92(1): 119-31.

García, RL, Coltrera, MO, y Gown AM. Analysis of proliferative grade using anti PCNA/Cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparison with flow cytometric analysis. *Am. J. Pathol.* 1989; 134: 733-739.

Ghezzi P. Regulation of protein function by glutathionylation. *Free Radic Res.* 2005; 39(6), 573-580.

Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, y Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food.* 2000; Chem 48.

Gilaberte Y, Coscojuela C, Sáenz de Santamaría MC, González S. Fotoprotección. *Actas Dermosifiliogr.* 2003; 94(5): 271-93.

Gilchrest BA, Soter NA, Hawk JL, Barr RM, Black AK, Hensby CN. Histologic changes associated with ultraviolet A-induced erythema in normal human skin. *J Am Acad Dermatol.* 1983; 9:213-9.

Gómez FJ, Vicente V, Álvarez N, Yáñez J, Alcaraz M, Ortiz L. Modelo experimental de fotoenvejecimiento cutáneo por radiación ultravioleta A. *Rev Esp Patol.* 2007; Vol 40, n.º 2: 103-108.

Green A, McCredie M, Mackie R, Giles G, Young P, Morton C, Jackman L, Thursfield V. A case-control study of melanomas of the soles and palms (Australia and Scotland). *Cancer Causes Control.* 1999; 10: 21-25.

Gundermann KJ, Muller J. Phytodolor-effects and efficacy of a herbal medicine. *Wien Med Wochenschr.* 2007; 157: 343-347.

Gupta RA, Brockman JA, Sarraf O, Willson TM y DuBois RN. Target genes of peroxisome proliferator-activated receptor γ in colorectal cancer cells. *J Biol Chem.* 2001; 276: 29681–29687.

Haber F, Weiss J. *Proc R Soc London Sec.A.* 1934; 147,332.

Hachiya, A, Sriwiriyanont P, Fujimura T, Ohuchi A, Kitahara T, Takema Y, Kitzmiller WJ, Visscher MO, Tsuboi R y Boissy RE. Mechanistic effects of long-term ultraviolet B irradiation induce epidermal and dermal changes in human skin xenografts. *Am. J. Pathol.* 2009; 174, 401–413.

Halliday GM, Bestak R, Yuen KS, Cavanagh LI, Barnetson RS. UVA-induced immunosuppression. *Mutat Res.* 1998; 422: 139-145.

Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006; 141, 321-322.

Havsteen, BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 2002; 96: 67-202.

Hayden M, Tyagi S. Suresh Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atherosclerosis: The pleiotropic effects of folate supplementation. *Nutrition Journal.* 2004; 3.

Holubar, K. Historical, anthropological and biological aspects of sun and the skin. *Clinis in Dermatol.* 1998; 6 (1): 19-22.

Hora JJ, Maydew ER, Lansky EP, Dwivedi C. Chemopreventive effects of pomegranate seed oil on skin tumor development in CD1 mice. *J Med Food.* 2003; 6: 157-161.

Hynes, MJ, y O'Coinceanainn M. The kinetics and mechanism of reactions of iron (III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. *J Inorb Biochem.* 2004; 98: 1457-1464.

Hwang YP, Kim HG, Choi JH, Han EH, Kwon KI, Lee YC, Choi JM, Chung YC, Jeong TC, Jeong HG. Saponins from the roots of *Platycodon*

grandiflorum suppress ultraviolet A-induced matrix metalloproteinase-1 expression via MAPKs and NF- κ B/AP-1-dependent signaling in HaCaT cells. *Food Chem Toxicol.* 2011; Dec; 49(12): 3374-82.

Ibarra A, Bai N, He K, Bily A, Cases J, Roller M, Sang S. Fraxinus excelsior seed extract FraxiPure™ limits weight gains and hyperglycemia in high-fat diet-induced obese mice. *Phytomedicine.* 2011 Apr 15; 18(6): 479-85. SI

Ichihashi M, Ueda M, Budiyo A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, Tsuru K y Horikawa T. UV-induced skin damage. *Toxicol.* 2003; 189: 21-39.

Ignarro, LJ, Byrns RE, Sumi D, de NF, y Napoli C. Pomegranate juice protects nitric oxide against oxidative destruction and enhances the biological actions of nitric oxide. *Nitric. Oxide.* 2006; 15:93-102.

Indra AK, Castaneda E, Antal MC, Jiang M, Messaddeq N, Meng X, Loehr CV, Gariglio P, Kato S, Wahli W, Desvergne B, Metzger D, Chambon P. Malignant transformation of DMBA/TPA induced papillomas and nevi in the skin of mice selectively lacking retinoid-X-receptor alpha in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2007; May; 127(5): 1250-60.

Janakiram NB, Mohammed A, Qian L, Choi CI, Steele VE, Rao CV. Chemopreventive effects of RXR-selective rexinoid bexarotene on intestinal neoplasia of Apc (Min/+) mice. *Neoplasia.* 2012; Feb; 14(2): 159-68.

Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon CR y Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes, *Science.* 1997; 275, 218–20.

Janssen K, Mensink RP, Cox FJ, Harryvan JL, Hovenier R, Hollman PC y Katan MB. Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an *in vitro* and a dietary supplement study, *Am. J. Clin. Nutr.* 1998; 67, 255–262.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; Mar-Apr; 61(2): 69-90.

Jenkins, G. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mechanisms of Ageing and Development.* 2002; 123(7): 801-810.

Joh YG, Kim SJ, Christie WW. The structure of the triacylglycerols, containing punicic acid, in the seed oil of *Trichosanthes kirilowii*. *JAOCS.* 1995; 72: 1037–1042.

Joshi SS, Kuszynski CA y Bagchi D. The cellular and molecular basis of health benefits of grape seed proanthocyanidin extract. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2001; 2, 187–200.

Joyce D, Albanese C, y Pestell RG. NF- κ B and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001; 12: 73–90.

Kambayashi H, Yamashita M, Odake Y, Takada K, Funasaka Y, Ichihashi M. Epidermal changes caused by chronic low-dose UV irradiation induce wrinkle formation in hairless mouse. *J Dermatol Sci.* 2001; Aug; 27 Suppl 1: S19-25.

Karin M y Delhase M. The I κ B kinase (IKK) and NF- κ B: key elements of proinflammatory signaling. *Semin. Immunol.* 2000; 12: 85–98.

Kasimsetty,SG, Bialonska D, Reddy MK, Ma G, Khan SI, y Ferreira D. Colon cancer chemopreventive activities of pomegranate ellagitannins and urolithins. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58:2180-2187.

Kasimsetty,SG, Bialonska D, Reddy MK, Thornton C, Willett KL, y Ferreira D. Effects of pomegranate chemical constituents/intestinal microbial metabolites on CYP1B1 in 22Rv1 prostate cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57: 10636-10644.

Katiyar SK y Elmets CA. Green tea polyphenolic antioxidants and skin photoprotection. *Int. J. Oncol.* 2001 a; 18, 1307–1313.

Katiyar SK, Afaq F, Azizuddin K, Mukhtar H. Inhibition of UVB-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol ()-epigallocatechin-3-gallate. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001 b; 176: 110–117.

Katiyar SK, Ahmad N y Mukhtar H. Green tea and skin. *Arch.Dermatol.* 2000; 136, 989–994.

Katiyar SK, Korman NJ, Mukhtar H y Agarwal R. Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. *J. Natl. Cancer Inst.* 1997; 89, 556–566.

Katiyar SK. UV-induced immune suppression and photocarcinogenesis: Chemoprevention by dietary botanicals agents. *Cancer Letters.* 2007; 255: 1-11.

Katiyar SK. y Mukhtar H. Tea in chemoprevention of cancer: Epidemiologic and experimental studies (review). *Int. J. Oncol.* 1996; 8, 221–238.

Kaufman M, Wiesman Z. Pomegranate oil analysis with emphasis on MALDI-TOF/MS triacylglycerol fingerprinting. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 10405–10413.

Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology.* 2000; 149, 43-50.

Kemp, CJ. Multistep skin cancer in mice as a model to study the evolution of cancer cells. *Semin Cancer Biol.* 2005; 15(6): 460-73.

Khan,GN, Gorin MA, Rosenthal D, Pan Q, Bao LW, Wu ZF, Newman RA, Pawlus AD, Yang P, Lansky EP, y Merajver SD. Pomegranate fruit extract impairs invasion and motility in human breast cancer. *Integr. Cancer Ther.* 2009; 8: 242-253.

Klaunig, JE. y Kamendulis LM. The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2004; 44: 239-267.

Kligman, LH. Intensification of ultraviolet-induced dermal connective tissue damage by infrared radiation. *Arch. Dermatol. Res.* 1982; 272, 229-238.

Kligman, LH. The reversal of photodamage by tretinoin is independent of irritation. *J. Invest. Dermatol.* 1991; 96, 584.

Koeffler P: Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ and Cancers. *Clinical Cancer Research*. 2003; 9: 1-9.

Koga T, Moro K, Nakamori K, Yamakoshi J, Hosoyama H, Kataoka S, Ariga T. Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *J Agric Food Chem.* 1999; 47: 1892-1897.

Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002; Nov-Dec; 30(6): 620-50.

Kohen R, Yacamoto Y, Cundy KC, Ames BN. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85, 3175-3179.

Kohen R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress-New approaches for their evaluation. *Biomed Pharmacother.* 1999; 53, 181-192.

Korkina LG, Afanas'ev IB. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol.* 1997; 38: 151-63.

Kramata P, Lu YP, Lou YR y cols. Effect of administration of caffeine or green tea on the mutation profile in the p53 gene in early mutant p53-positive patches of epidermal cells induced by chronic UVB-irradiation of hairless SKH-1 mice. *Carcinogenesis.* 2005; 26: 1965-1974.

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

Kullavanijaya P, Lim H. Photoprotection. *J Am Acad Dermatol.* 2005; 52(6): 937-58.

Kundoor V, Zhang X, Bommareddy A, Khalifa S, Fahmy H, Dwivedi C. Chemopreventive Effects of Sarcotriol on Ultraviolet B-induced Skin Tumor Development in SKH-1 Hairless Mice. *Mar. Drugs.* 2007; 5, 197-207.

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

Lafay S, Gueux E, Rayssiguier Y, Mazur A, Rémésy C, Scalbert A. Caffeic acid inhibits oxidative stress and reduces hypercholesterolemia induced by iron overload in rats. *Int J VitamNutr Res.* 2005; 75: 119-125.

Lansky EP, Jiang W, Mo H, Bravo L, Fromm P, Yu W, Harris NM, Neeman I, Campbell MJ. Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. *Invest New Drugs.* 2005; Jan; 23(1): 11-20.

Larrosa M, Garcia-Conesa MT, Espin JC, y Tomas-Barberan FA. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Mol. Aspects Med.* 2010; 31: 513-539.

Lautenschlager S, Wulf H, Pittelkow M. Photoprotection. *Lancet.* 2007; 9586 (370): 528-37.

Le Boit P. Pathology and genetics of skin tumours. International Agency for Research on Cancer; World Health Organization; International Academy of Pathology; European Organization for Research on Treatment of Cancer; UniversitätsSpital Zürich Departement Pathologie. Lyon: IARC Press. 2006.

Lee JH, An HT, Chung JH, Kim KH, Eun HC, Cho KH. Acute effects of UVB radiation on the proliferation and differentiation of keratinocytes. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine*. 2002; 18(5): 253-61.

Lee PK, Olbricht SM, Gonzalez-Serva A, Harrist TH. Infiltrative squamous cell carcinoma: histopathologic and clinical characterization of a newly described skin cancer. *J Cutan Pathol*. 1997; 24: 108.

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Wilson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *J Biol Chem*. 1995; 270: 12953-12956.

Lepley DM, Li B, Birt DF y Pelling JC. The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratinocytes. *Carcinogenesis*. 1996; 17, 2367–2375.

Leyden, J. What is photoaged skin?. *European Journal of Dermatology*. 2001; 11(2): 165-167.

Li,Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J, y Cheng S. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*. 2006; 96: 254-260.

Longtin R. The pomegranate: nature's power fruit? *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95: 346–348.

Lozano C, Torres JL, Julià L, Jimenez A, Centelles JJ, Cascante M. Effect of new antioxidant cysteinyl-flavonol conjugates on skin cancer cells. *FEBS J*. 2005; 278, 4219-4225.

Lozano C. Nous derivats de flavonols a partir de subproductes vegetals. Síntesi, purificació i avaluació de la seva capacitat anti-radicalària i pro-apoptòtica en cèl·lules no tumorals i canceroses. Tesis. Doctoral. 2005.

Lu YP, Lou YR, Li XH y cols. Stimulatory effect of oral administration of green tea or caffeine on ultraviolet light-induced increases in epidermal wild type p53, p21 (WAF1/CIP1), and apoptotic sun burn cells in SKH-1 mice. *Cancer Res.* 2000; 60: 4785–4791.

Lu YP, Lou YR, Liao J y cols. Administration of green tea or caffeine enhances the disappearance of UVB-induced patches of mutant p53 positive epidermal cells in SKH-1 mice. *Carcinogenesis.* 2005; 26: 1465–1472.

Lu YP, Lou YR, Lin Y y cols. Inhibitory effects of orally administered green tea, black tea, and caffeine on skin carcinogenesis in mice previously treated with ultraviolet B light (high-risk-mice): relationship to decreased tissue fat. *Cancer Res.* 2001; 61: 5002–5009.

Maffei-Facino A, Carini M, Aldini G, Bombardelli E, Morazzoni P, Morelli R. Free radicals scavenging action and anti-enzyme activities of procyanidins from *Vitisvinifera*. A mechanism for their capillary protective action. *Arzneimittelforschung.* 1994; May; 44(5): 592-601.

Malik, A, y Mukhtar H. Prostate cancer prevention through pomegranate fruit. *Cell Cycle.* 2006; 5:371-373.

Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, y Mukhtar H. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005; 102: 14813-14818.

Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell.* 1995; 83: 841-850.

Mantena SK, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins inhibit UV-radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF- κ B signaling in human epidermal keratinocytes. *Free Radic Biol Med.* 2006 May 1; 40(9):1603-14.

Marmolle F, Mila I, Scarlet A, y Albrecht A. 1998. Bend, Oregon.

Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Short-term and long-term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*. 2002; 4: 1–22.

Maziere C, Dantin F, Dubois F, Santus R, Maziere J. Biphasic effect of UVA radiation on STAT1 activity and tyrosine phosphorylation in cultured human keratinocytes. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28: 1430–1437.

Mc Cormick D. y Hall PA. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology*. 1992; 21: 591-594.

Mc Vean M, Xiao H, Isobe K y Pelling JC. Increase in wild-type p53 stability and transactivational activity by the chemoprotective agent apigenin in keratinocytes. *Carcinogenesis*. 2001; 21, 633–639.

McVean M, Weinberg WC, Pelling JC. A p21 (waf1)-independent pathway for inhibitory phosphorylation of cyclin-dependent kinase p34 (cdc2) and concomitant G (2)/M arrest by the chemopreventive flavonoid apigenin. *Mol Carcinog*. 2002; Jan; 33(1): 36-43.

Meena R. Sharma, Benjamin Werth, Victoria P. Werth. Animal Models of Acute Photodamage: Comparisons of Anatomic, Cellular and Molecular Responses in C57BL / 6J, SKH1 and Balb / c Mice. *Photochemistry and Photobiology*. 2011; 87: 690–698.

Meeran SM, Mantena SK, Elmets CA, Katiyar SK. (-)-Epigallocatechin-3-gallate prevents photocarcinogenesis in mice through interleukin-12-dependent DNA repair. *Cancer Res*. 2006 a; May 15; 66(10): 5512-20.

Meeran SM, Mantena SK, Katiyar SK. Prevention of ultraviolet radiation-induced immunosuppression by (-)-epigallocatechin-3-gallate in mice is mediated through interleukin 12-dependent DNA repair. *Clin Cancer Res*. 2006 b; Apr 1; 12(7 Pt 1): 2272-80.

Meyer B, Schneider W, Elstner EF. Antioxidative properties of alcoholic extracts from *Fraxinus excelsior*, *Populus tremula* and *Solidago virgaurea*. *Arzneimittelforschung*. 1995; 45: 174-176.

Middleton P, Stewart F, Al-Qahtani S, Egan P, O'Rourke C, Abdulrahman A, Byres M, Middleton M, Kumarasamy Y, Shoeb M, Nahar L, Delazar A, Sakder D. Antioxidant, antibacterial activities and general toxicity of *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior* and *Pavaper rhoeas*. *Int J Pharm Res*. 2005; 2: 81-86.

Middleton EJr, Kandaswami C, y Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000; 52.

Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH, y Jennings KR. The effects of plant flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res*. 2002; 36: 1199-1208.

Mitani H, Naru E, Yamashita M, Arakane K, Suzuki T, Imanari T. Ergocalciferol promotes in vivo differentiation of keratinocytes and reduces photodamage caused by ultraviolet irradiation in hairless mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2004; 20: 215-23.

Mittal A, Elmets CA, Katiyar SK. Dietary feeding of proanthocyanidins from grape seeds prevents photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice: relationship to decreased fat and lipid peroxidation. *Carcinogenesis*. 2003 Aug; 24(8): 1379-88.

Mittal A, Piyathilake C, Hara Y y Katiyar SK. Exceptionally high protection of photocarcinogenesis by topical application of (-)-epigallocatechin-3-gallate in hydrophilic cream in SKH-1 hairless mouse model: relationship to inhibition of UVB-induced global DNA hypomethylation. *Neoplasia*. 2003 b; 5, 555–565.

Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol*. 1978; Dec; 121(6): 2228-34.

Mohan,M, Waghulde H, y Kasture S. Effect of Pomegranate Juice on Angiotensin II-Induced Hypertension in Diabetic Wistar Rats. *Phytotherapy Research*. 2010; 24: S196-S203.

Moller P, Wallin H, Holst E, Knudsen LE. Sunlight-induced DNA damage in human mononuclear cells. *FASEB J*. 2002; 16: 45-53.

Moloney SJ, Edmonds SH, Giddens LD, Learn DB. The hairless mouse model of photoaging: evaluation of the relationship between dermal elastin, collagen, skin thickness and wrinkles. *Photochem Photobiol*. 1992 Oct; 56(4): 505-11.

Morales-Molina JA, Grau S, Jiménez-Martín J, Mateu-De Antonio J, Espona M, Berges-Fraile MJ, Zarzuelo A, Salas E. Quemaduras solares: fotoprotección y tratamiento (sun burn: photoprotection and treatment). *Ars Pharmaceutica*. 2006; 47(2): 119-135.

Morliere P, Moysan A, Tirache I. Action spectrum for UV-induced lipid peroxidation in cultured human skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med*. 1995; 19: 365-371.

Mukherjee R, Davies PJ, Crombie DL, Bischoff ED, Cesario RM, Jow L, Hamann LG, Boehm MF, Mondon CE, Nadzan AM, Paterniti JR Jr, Heyman RA. Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature (Lond.)*. 1997; 386: 407-410.

Mulero M. Efecto de la radiación ultravioleta (RUV) sobre los procesos de estrés oxidativo e inmunodepresión cutánea. Efecto protector, Tesis doctoral. Univresitat Rovira i Virgili. 2005.

Nakamura K y Johnson WC. Ultraviolet light induced connective tissue changes in the rat skin: Ahistopathologic and histochemical study. *J. Invest. Dermatol*. 1968; 51, 253-258.

Nandi S, Guzman RC, Yang J. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats and humans: a unifying hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 3650-7.

Ndiaye M, Philippe C, Mukhtar H, Ahmad N. The grape antioxidant resveratrol for skin disorders: promise, prospects, and challenges. *Arch Biochem Biophys*. 2011; Apr 15; 508 (2): 164-70.

Nghiem DX, Kazimi N, Clydesdale G, Ananthaswamy HN Kripke ML, Ullrich SE. Ultraviolet A radiation suppresses an established immune response: Implications for sunscreen design. *J Invest Dermatol*. 2001; 117: 1139-9.

Nichols A, Katiyar S. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repair mechanism, *Arch Dermatol Res*. 2010; 302(2): 71.

Niezabitowski A, Czajewski 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): 150-60.

Oikawa S, Tada-Oikawa S y Kawanishi S. Site-specific DNA damage at the GGG sequence by UVA involves acceleration of telomere shortening. *Biochemistry*. 2001; 40 (15): 4763-4768.

Okpanyi SN, Schirpke-von Paczensky R, Dickson D. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effect of various plant extracts and their combinations in an animal model. *Arzneimittelforschung*. 1989; 39: 698–703.

Oliveras-Ferracos C. Crude phenolic extracts from extra virgin olive oil circumvent de novo breast cancer resistance to HER1/HER2-targeting drugs by inducing GADD45-sensed cellular stress, G2/M arrest and hyperacetylation of Histone H3. *Int J Oncol*. 2011; 38: 1533-47.

Pacheco-Palencia LA, Noratto G, Hingorani L, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. Protective effects of standardized pomegranate (*Punica granatum L.*)

polyphenolic extract in ultraviolet-irradiated human skin fibroblasts. *J Agric Food Chem.* 2008 Sep 24; 56 (18): 8434-41.

Pantuck AJ, Leppert JT, Zomorodian N, Aronson W, Hong J, Barnard RJ, Seeram N, Liker H, Wang H, Elashoff R, Heber D, Aviram M, Ignarro L, y Beldegrun A. Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 4018-4026.

Parra EJ. Human pigmentation variation: evolution, genetic basis, and implications for public health. *American Journal of Physical Anthropology Supplement.* 2007; 45: 85-105.

Parsons PG, Hayward IP. Inhibition of DNA repair synthesis by sunlight. *Photochem Photobiol.* 1985; 42: 287-93.

Pinnell SR. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection, *J. Am. Acad. Dermatol.* 2003; 48, 1–19.

Place A, Suh N, Williams C, Risingsong R, Honda T, Honda Y, Gribble G, Leesnitzer L, Stimmel J, Willson T. The Novel Synthetic Triterpenoid, CDDO-Imidazolide, Inhibits Inflammatory Response and Tumor Growth in Vivo. *Clinical Cancer Research.* 2003; 9: 2798–2806.

Poulsen JT, Staberg B, Wulf HC y Brodthagen H. Dermal elastosis in hairless mice after UV-B and UV-A applied simultaneously, separately or sequentially. *Br. J. Dermatol.* 1984; 110, 531-538.

Pound AW. Induced cell proliferation and the initiation of skin tumor formation of skin tumor formation in mice by ultraviolet light. *Pathology.* 1970; 2: 269-275.

Powell SG. The antioxidant properties of zinc. *J Nutr.* 2000; 130 (5S Suppl.), 1447S-1454S.

Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJ, Morison WL y Sauder DN. Photoaging: mechanisms and repair. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2006; 55 (1): 1-19.

Reagan-Shaw S, Afaq F, Aziz MH, Ahmad N. Modulations of critical cell cycle regulatory events during chemoprevention of ultraviolet B-mediated responses by resveratrol in SKH-1 hairless mouse skin. *Oncogene*. 2004; 23: 5151–5160.

Real Academia Española. Diccionario de la Lengua Española. 22 a ed. España: Mateu cromos artes gráficas, S.A. 2001.

Reeve VE, Widyarini S, Domanski D, Chew E, Barnes K. Protection against photoaging in the hairless mouse by the isoflavone equol. *Photochem Photobiol*. 2005; 81: 1548-53.

Rodríguez Yanes E. Efectos del extracto de *Polypodium leucotomos* sobre la tumorigénesis inducida por la radiación ultravioleta. Tesis doctoral. Universitat Rovira i Virgili. 2011.

Roffo AH. Cáncer y Sol. *Boletín Institucional de medicina experimental para el estudio y tratamiento del cáncer*. Méjico. 1933; 10: 417-439.

Romanova D, Vachalkova A, Cipak L, Ovesna Z y Rauko P. Study of antioxidant effect of apigenin, luteolin and quercetin by DNA protective method. *Neoplasma*. 2001; 48, 104–107.

Rozenberg O, Howell A, y Aviram M. Pomegranate juice sugar fraction reduces macrophage oxidative state, whereas white grape juice sugar fraction increases it. *Atherosclerosis*. 2006; 188: 68-76.

Rusch HP, Kline BZ, Bauman CA. Carcinogenesis by UV rays with reference to wavelength and energy. *Arch Pathol*. 1941; 371: 135-146.

Rutter K, Sell DR, Fraser N y cols. Green tea extract suppresses the age-related increase in collagen crosslinking and fluorescent products in C57BL/6 mice. *Int J Vitam Nutr Res*. 2003; 73: 453–460.

Sahu RP, DaSilva SC, Rashid B, Martel KC, Jernigan D, Mehta SR, y cols. Mice lacking epidermal PPAR α exhibit a marked augmentation in photocarcinogenesis associated with increased UVB-induced apoptosis, inflammation and barrier dysfunction. *Int. J. Cancer*. 2012; 131, E1055–E1066.

Saida T, Dohi S, Sadaki M, Tokuda Y, Ikegawa S, Takasaki Y. Distribution patterns and frequency of proliferating cells in cutaneous keratinocytic neoplasms. Immunohistochemical study with a monoclonal antibody (TOB7) used against proliferating cell nuclear antigen. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1992; 26 (5 Pt. 1), 744–748.

Saltiel AR, Olefsky JM. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes*. 1996; 45: 1661-1669.

Sardari S, Shokrgozar MA, Ghavami G. Cheminformatics based selection and cytotoxic effects of herbal extracts. *Toxicol In Vitro*. 2009; Oct; 23(7): 1412-21.

Sassano G, Sanderson P, Franx J, Groot P, Van Straalen J, Bassaganya-Riera J. Analysis of pomegranate seed oil for the presence of jacaric acid. *J. Sci. Food Agric*. 2009; 89 (6): 1046–1052.

Schempp H, Weiser D, Elstner EF. Biochemical model reactions indicative of inflammatory processes. Activities of extracts from *Fraxinus excelsior* and *Populus tremula*. *Arzneimittelforschung*. 2000; 50: 362-372.

Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber D. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J NutrBiochem*. 2005; 16: 360-367.

Seeram NP, Lee R y Heber D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. *Clin Chim Acta*. 2004; 348.

Seeram NP, Zhang Y, McKeever R, Henning SM, Lee RP, Suchard MA, Li Z, Chen S, Thames G, Zerlin A, Nguyen M, Wang D, Dreher M, y Heber D. Pomegranate juice and extracts provide similar levels of plasma and urinary ellagitannin metabolites in human subjects. *J. Med. Food.* 2008; 11: 390-394.

Setlow RB, Setlow JK. Effects of radiation on polynucleotides. *Annu Rev Biophys Bioeng.* 1972; 1: 293-346.

Sharma MR, Werth B, Werth VP. Animal Models of Acute Photodamage: Comparisons of Anatomic, Cellular, and Molecular Responses in C57BL/6J, SKH-1, and Balb/c Mice. *Photochemistry and photobiology.* 2011; 87(3): 690-698.

Sharma SD, Katiyar SK. Dietary grape-seed proanthocyanidin inhibition of ultraviolet B-induced immune suppression is associated with induction of IL-12. *Carcinogenesis.* 2006; Jan; 27(1): 95-102.

Sharma SD, Meeran SM, Katiyar SK. Dietary grape seed proanthocyanidins inhibit UVB-induced oxidative stress and activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB signaling in vivo SKH-1 hairless mice. *Mol Cancer Ther.* 2007; (Mar); 6(3): 995-1005.

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

Siskind V, Aitken J, Green A, Martin N. Sun exposure and interaction with family history in risk of melanoma, Queensland, Australia. *Int J Cancer.* 2002a; 97: 90-95.

Siskind V, Darlington S, Green L, Green A. Evolution of melanocytic nevi on the faces and necks of adolescents: a 4 y longitudinal study. *J Invest Dermatol.* 2002b; 118: 500-504.

Smetana K, Gyorkey F, Chan PK, Tan E y Buusch H. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and human malignant tumor 154 nucleolar antigen

(HMTNA) in nucleoli of human hematological malignancies. *Blood*. 1983; 46: 133-141.

Smolarek, AK, So, JY, Thomas, PE, Lee, HJ, Paul, S, Dombrowski, A, Wang, CX, Saw, CL, Khor, TO, Kong, AN. y cols. Dietary tocopherols inhibit cell proliferation, regulate expression of ERalpha, PPARgamma, and Nrf2, and decrease serum inflammatory markers during the development of mammary hyperplasia. *Mol Carcinog*. 2013 Jul; 52(7): 514-25.

Soehnge H, Ouhit H, Ananthaswamy HN. Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation. *Front Biosci* .1997; 2: d538-551.

Sreekumar S, Sithul H, Muraleedharan P, Azeez JM, Sreeharshan S. Pomegranate Fruit as a Rich Source of Biologically Active Compounds. *Biomed Res Int*. 2014; 686921.

Steenberg PA, Garssen J, Dortant P, Hollman PC, Alink GM, Dekker M, Bueno-de-Mesquita HB, Van Loveren H. Protection of UV-induced suppression of skin contact hypersensitivity: a common feature of flavonoids after oral administration? *Photochem Photobiol*. 1998; Apr; 67(4): 456-61.

Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit, and cancer prevention: A review. *J Am Diet Assoc*. 1996; 96, 1027-1039.

Strehl E, Schneider W, Elstner EF. Inhibition of dihydrofolate reductase activity by alcoholic extracts from *Fraxinus excelsior*, *Populus tremula* and *Solidago virgaurea*. *Arzneimittelforschung*. 1995; 45: 172-173.

Sturm RA. Human pigmentation genes and their response to solar UV radiation. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1998; 422(1): 69-76.

Suh N, Wang Y, Honda T, Gribble GW, Dmitrovsky E, Hickey WF, Mave RA, y cols. A novel synthetic oleanane triterpenoid, 2-cyano-3, 12-dioxoolean-1, 9-dien-28-oic acid, with potent differentiating, antiproliferative, and anti-inflammatory activity. *Cancer Res*. 1999; 59: 336-341.

Surh YJ. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances, *Mutat. Res.* 1999; 428, 305–327.

Svobodova A, Walterova D y Vostalova J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomedical Papers of the Medicine Faculty of the University Palackého Olomouc Czech Republic.* 2006; 150(1): 25-38.

Syed DN, Malik A, Hadi N, Sarfaraz S, Afaq F, Mukhtar H. Photochemopreventive effect of pomegranate fruit extract on UVA-mediated activation of cellular pathways in normal human epidermal keratinocytes. *Photochem Photobiol.* 2006; 82: 398–405.

Tanaka M, Koyama Y, Nomura Y. Effects of collagen peptide ingestion on UV-B-induced skin damage. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009; 73(4): 930-2.

Taylor L, Grotewold E. Flavonoids as developmental regulators. *Curr Opin Plant Biol.* 2005; 8: 317-23.

Tilli CM, Van Steensel MA, Krekels GA, Neumann HA, Ramaekers FC. Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. *British Journal of Dermatology.* 2005; 152(6): 1108-24.

Toschi L, y Bravo R. Changes in Cyclin/proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. *J. Cell. Biol.* 1988; 107: 1623- 1628.

Toth DP, Guenther LC, Shum DT. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA); prognostic value in the clinical recurrence of primary basal cell carcinoma. *J. Dermatol. Sci.* 1996; 11, 36–40.

Tyrrell RM. Oxidant, antioxidant status and photocarcinogenesis: the role of gene activation. *Photochem Photobiol.* 1996; 63: 380-6.

Ugartondo Casadevall V. Caracterización de derivados polifenólicos naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Tesis doctoral Universidad de Barcelona. 2009.

Uitto J. The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. *Journal of Drugs in Dermatology*. 2008; 7(2 Suppl): s12-6.

Unna PG: Die Histopathologic der Hautkrankheiten. Berlin. 1894; A. Hirschwald.

Urbach F. Geographic pathology of skin cancer, in "The biologic effects of ultraviolet radiation". Urbach F, Ed. Oxford. Pergamon Press, Ltd. 1969; pp. 635-650.

Vajdic CM, Krickler A, Giblin M, McKenzie J, Aitken J, Giles GG, Armstrong BK. Sun exposure predicts risk of ocular melanoma in Australia. *Int J Cancer*. 2002; 101: 175-182.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M y Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006; 160(1): 1-40.

Van Duyn MA, Pivonka E. Overview of the health benefits of fruit and vegetable consumption for the dietetics professional: selected literature. *J Am Diet Assoc*. 2000; 100 (12), 1511-1521.

Vayalil P K, Mittal A, Hara Y, Elmets C A, Katiyar S K. Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin. *J Invest Dermatol*. 2004; 122: 1480–1487.

Veierod MB, Weiderpass E, Thorn M, Hansson J, Lund E, Armstrong B, Adami HO. A prospective study of pigmentation, sun exposure, and risk of cutaneous malignant melanoma in women. *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95: 1530-1538.

Vertuani S, Angusti A, Manfredini, S. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des*. 2004; 10, 1677-1694.

Vicente V. El peligroso encanto de la belleza (Una aproximación a la patología de la pigmentación cutánea). Discurso de recepción pública como académico de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Murcia. 4 de noviembre de 1999. Editorial Nogué.

Von Kruedener S, Schneider W, Elstner EF. A combination of *Populus tremula*, *Solidago virgaurea* and *Fraxinus excelsior* as an anti-inflammatory and antirheumatic drug. A short review. *Arzneimittelforschung*. 1995; 45: 169-171.

([Http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Vitis_vinifera.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Vitis_vinifera.html)). 9. 1. 1998.

Wagner H, Horhammer L y Munster R. Chemistry of silymarin (silibinin), the active principle of the fruits of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Carduus marianus* L.). *Arzneimittelforschung*. 1968; 18, 688– 696.

Wang CB, Yao RY, Liu ZT, Zhong WZ, Liu XP, Wang YJ. Protective effect of polypeptide from *Chlamys farreri* on hairless mice damaged by ultraviolet A. *Acta Pharmacol Sin*. 2002 Sep; 23(9): 813-8.

Wang Y, Porter WW, Suh N, Honda T, Gribble GW, Leesnitzer LM, Plunket KD, Mangelsdorf DJ, Blanchard SG, Willson TM, Sporn MB. A synthetic triterpenoid, 2-cyano-3, 12-diooleana-1,9-dien-28-oic acid (CDDO), is a ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor. *Mol Endocrinol*. 2000; 14: 1550-1556.

Wang Y, Zhang X, Lebwohl M, DeLeo V, Wei H. Inhibition of ultraviolet B (UVB)-induced c-fos and c-jun expression in vivo by a tyrosine kinase inhibitor genistein. *Carcinogenesis*. 1998; 19: 649–654.

Wang ZY, Huang MT, Ho CT y cols. Inhibitory effect of green tea on the growth of established skin papillomas in mice. *Cancer Res*. 1992; 52: 6657–6665.

Wei H, Saladi R, Lu Y y cols. Isoflavone genistein: photoprotection and clinical implications in dermatology. *J Nutr.* 2003; 133 (11 Suppl. 1): 3811S–3819S.

Wenczl E, Pool S, Timmerman AJ, Vanderschans GP, Roza L, Schothorst AA. Physiological doses of ultraviolet irradiation induce DNA strand breaks in cultured human melanocytes, as detected by means of an immunochemical assay. *Photochem Photobiol.* 1997; 66: 826-30.

Whiteman DC, Watt P, Purdie DM, Hughes MC, Hayward NK, Green AC. Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95: 806-812.

Whiteman DC, Whiteman CA, Green AC. Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Causes Control.* 2001; 12: 69-82.

Widyarini S, Spinks N, Husband AJ, Reeve VE. Isoflavonoid compounds from red clover (*Trifolium pratense*) protect from inflammation and immune suppression induced by UV radiation. *Photochem Photobiol.* 2001; 74: 465–470.

Wood, R.D.; Shivji, M.K. Which DNA polymerases are used for DNA-repair in eukaryotes? *Carcinogenesis.* 1997; 18, 605–610.

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

Yager JD, Liehr JG. Molecular Mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996; 36: 203-32.

Yamaguchi Y, Beer JZ y Hearing VJ. Melanin mediated apoptosis of epidermal cells damaged by ultraviolet radiation: factors influencing the incidence of skin cancer. *Archives of Dermatological Research.* 2008; 300 Suppl 1: S43-50.

Yoshida M, Yamamoto M y Nikaido T: Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res.* 1992; 52: 6676-6681.

Zaid MA, Afaq F, Syed DN, Dreher M, Mukhtar H. Inhibition of UVB-mediated oxidative stress and markers of photoaging in immortalized HaCaT keratinocytes by pomegranate polyphenol extract POMx. *PhotochemPhotobiol.* 2007(Jul-Aug); 83(4): 882-8.

Zhang Y, Wang D, Lee RP, Henning SM, Heber D. Absence of pomegranate ellagitannins in the majority of commercial Pomegranate extracts: implications for standardization and quality control. *J Agric Food Chem.* 2009 Aug 26; 57(16): 7395-400.

Zhao J, Wang J, Chen Y, Agarwal R. Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis.* 1999; Sep; 20(9): 1737-45.

Zúñiga Jesús Martín. Centro de Enseñanzas Virtuales de la Universidad de Granada.D.L.gr.1291. 2006.

Anexos

X. Anexos

Tablas.

Tabla 1. Efectos de la radiación ultravioleta sobre la piel.

Tabla 2. Efectos perjudiciales sobre la piel de la radiación ultravioleta (Gilaberte, 2003).

Tabla 3. Clasificación de fototipos cutáneos y factores recomendados según el tipo de piel. Medunad, 2002.

Tabla 4. Características de la piel expuesta a RUV. (Benedetto, 1998).

Tabla 5. Fitoantioxidantes en la prevención de la fotocarcinogénesis y fotoenvejecimiento.

Tabla 6. Composición nutricional del extracto de uva por 100 g.

Tabla 7. Tiempo de presentación en semanas de las lesiones macroscópicas.

Tabla 8. Características histológicas.

Figuras

Fig. 1. Estructura de la piel.

Fig. 2. Espectro de la radiación.

Fig. 3. Esquema tipos de tumores cutáneos. Corte histológico de la piel

Fig. 4. Reacción catalizada por la superóxido dismutasa. (SOD)

Fig. 5. Reacción catalizada por la encima catalasa (CAT).

Fig. 6. Reacción catalizada por la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GRed).

Fig. 7. Reacción de Haber-Weiss.

Fig. 8. Cuadro efecto sinérgico de las moléculas antioxidantes.

Fig. 9. Clasificación de los flavonoides.

Fig. 10. Estructura básica de los flavonoides.

Fig. 11. Mecanismos de acción de los fitoantioxidantes.

Fig. 12. Ratón SKH-1.

Fig. 13. Lámpara Philips empleada en el estudio.

Fig. 14. Estructura química de los compuestos del Extracto de granada.

Fig. 15. Estructura química: Nuzhenida y GI3.

Fig. 16. Estructura química de la proantocianidina.

Fig. 17. Lámpara de irradiación UV con jaulas de PVC.

Fig. 18. Sistema de individualización de los animales expuestos a RUV.

Fig. 19. Detalle del programa de análisis del área de la lesión macroscópica.

Fig. 20. Detalles del programa de análisis del área de la lesión microscópica.

Fig.21. Detalle zona de la piel con eritema.

Fig. 22. Detalle zona de la piel con arrugas longitudinales.

Fig. 23. Ulceración superficial extensa e irregular.

Fig. 24. Detalle de lesiones neoplásicas en el grupo control tras 75 sesiones.

Fig. 25. Lesión nodular compatible con ulceración neoplásica en un animal tratado con el E. de granada.

Fig. 26. Detalle de las lesiones a las 75 sesiones en el grupo tratado con E. de granada.

Fig. 27. Detalle de las lesiones a las 75 sesiones en el grupo tratado con E. de fresno

Fig. 28. Detalle de las lesiones a las 75 sesiones en el grupo tratado con E. de uva.

Fig. 29. Piel sana sin irradiar.

Fig. 30. Hiperplasia leve.

Fig. 31. Hiperplasia con displasia leve

Fig. 32. Displasia moderada.

Fig. 33. Displasia severa, carcinoma *in situ*.

Fig. 34. Detalle de carcinoma invasor, grupo control: nidos de células tumorales con focos de queratinización interna

Fig. 35. Detalle de queratinización intracitoplasmática.

Fig. 36. PCNA en ratones control sanos: positividad en células basales.

Fig. 37. Marcaje intenso de PCNA en tumor del grupo control.

Fig. 38. Marcaje leve de PCNA en un carcinoma del grupo tratado con E. de fresno.

Fig. 39. PCNA en E. de Granada.

Fig. 40. PCNA en carcinoma del grupo E. de uva con área de necrosis.

Gráficos

Gráf. 1. Áreas de lesiones macroscópicas

Gráf. 2. Resumen de lesiones macroscópicas.

Gráf. 3. Recuento de células positivas a PCNA

Abreviaturas

BCC: Carcinoma de células escamosas.

CAT: catalasa.

CAT: ácido catalpico.

Cdk: ciclinas (inhibidor de la proteína p21/WAF1).

CDKN2A: cinasa dependiente de ciclina N2A.

COX: ciclooxigenasa.

Cultek: complejo avidina-biotina-peroxidasa.

DAKO: anticuerpo secundario goat anti-mouse biotinado.

DEM: dosis eritematosa mínima.

DMBA: 7, 12 –dimetil benzo a antroeno (dimetilbenzantraceno)

EGCG: (-)- epigalocatequina- 3- galato.

ERO: especies radioactivas de oxígeno.

GPx: glutatión peroxidasa.

GRed: glutatión-reductasa.

GSH: tripéptido glutatión.

GSSG: glutatión oxidado ó glutatión reducido.

H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

HaCaT: líneas de células inmortales de queratinocitos humanos.

HE: hematoxilina-eosina.

HPLC-DAD: cromatografía líquida de alta resolución-despliegue de activos digitales.

IECA: inhibidor de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina.

IL-10: interleuquina 10.

IL-12: interleuquina 12.

LMWA: low molecular-weight-antioxidants

MAPK: señales de activación de la proteinquinasa.

MMP: metaloproteinasas de la matriz celular.

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NER: mecanismos de escisión de nucleótidos.

NF- κ B: cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NO: óxido nítrico.

Nrf2: factor de transcripción

O₃: ozono.

OMS: organización mundial de la salud.

P53: gen supresor de tumor.

PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular..

PPAR α : receptores activados de proliferación de los peroxisomas α .

PRAAL-PCB: plataforma de investigación aplicada en animal de laboratorio del parque tecnológico de Barcelona.

PVC: policloruro de vinilo.

PTVs: polifenoles de té verde.

RLO: radicales libres de oxígeno.

RNS: especies reactivas de nitrógeno.

RUV: radiación ultravioleta.

TGF-beta 1: factor de crecimiento transformante beta 1.

TPA: tetradecanoil forbol-13 acetato.

TZDs. Tiazolidinedionas.

UVA: ultravioleta A.

UVB: ultravioleta B.

UVC: ultravioleta C.