



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Modelo de Tratamiento Experimental de la
Fotocarcinogénesis por Irradiación Ultravioleta
Crónica en Ratones SKH-1

D^a Blanca Arribas Díaz

2016



UNIVERSIDAD DE
MURCIA



**Modelo de tratamiento experimental de la
fotocarcinogénesis por irradiación ultravioleta
crónica en ratones SKH-1**

Blanca Arribas Díaz

2016

AGRADECIMIENTOS

La primera persona a la que quiero agradecer la realización de esta tesis es al Dr. Vicente Vicente Ortega. Por el cariño y la cercanía con la que me acogió y la gran ilusión que consiguió transmitirme desde el principio para iniciar este proyecto. Gracias por tu paciencia infinita, por confiar en mí, y por conseguir animarme y serenarme.

También al Dr. Francisco José Gómez García, por su gran ayuda y sus excelentes puntos de vista.

A Violeta, quien ha sido para mí todo un descubrimiento y con la que me he sentido tan identificada y acompañada.

Al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Reina Sofía de Murcia, por su intervención en el estudio inmunohistoquímico, en especial al Dr. Francisco Martínez Díaz; al profesor Manuel Canteras Jordana, de la Cátedra de Bioestadística de la Facultad de Medicina y a la Dra. Paloma Sánchez-Pedreño Guillén. Gracias por aportar vuestros conocimientos.

A todos los compañeros del animalario, Nuria, Yolanda, Jorge, Lydia y Javi, que han demostrado una gran predisposición a colaborar y con los que me he sentido como una más, os lo agradezco chicos.

Al personal de seguridad del Campus de Espinardo, que siempre me atendieron con una gran sonrisa.

A mis compañeros los “resis” del Morales que han seguido estando ahí, escuchando asombrados mis aventuras con estos animales tan curiosos.

A Isa y Jose, por entender que no les dedique todo el tiempo que se merecen y que creen en mis capacidades incluso más que yo misma.

Por último a mi familia, ese gran pilar que apoya incondicionalmente todas mis decisiones y me anima en los momentos de duda y desánimo; que celebra mis éxitos y me acompaña en el día a día. A mi hermana María, que siempre está ahí. A mi padre, a quien le debo que me hablara del Dr. Vicente y quien ha sido siempre un ejemplo como profesional, que ejerce su labor desde el lado más humano de la medicina. A mi madre que es mi otra mitad, que me entiende sin hablar, me escucha y me consuela y es quien hace posible todos mis logros. Gracias a todos.

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	13
II.	INTRODUCCIÓN.....	17
III.	ANTECEDENTES.....	22
	A. La piel.....	25
	B. Radiación solar.....	37
	C. Fotoprotección.....	43
	D. Modelos animales de fotoenvejecimiento.....	53
	E. Envejecimiento extrínseco o Fotoenvejecimiento.....	61
	F. Patología por radiación solar.....	75
	G. Prevención y tratamiento del fotoenvejecimiento.....	87
IV.	OJETIVOS.....	109
V.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	113
VI.	RESULTADOS.....	121

VII.	DISCUSIÓN.....	205
VIII.	CONCLUSIONES.....	251
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	255

I. RESUMEN

La piel es el órgano más externo y extenso que recibe directamente las radiaciones UV solares, responsables del fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis cutáneos.

El objetivo de nuestro trabajo ha consistido en el desarrollo de un modelo experimental de fotoenvejecimiento mediante la exposición crónica a RUV, así como la evaluación de los efectos del tratamiento con ingenol mebutato y paclitaxel sobre las lesiones originadas.

Para ello utilizamos 72 ratones SKH-1 que se expusieron a 65 sesiones de radiación UV (98,6% RUV A y 1,4% RUV B) de 60 minutos de duración, 4 días a la semana; cada animal fue expuesto a 1.371,5 J/cm².

Los ratones se dividieron en 6 grupos (n=12) según el tratamiento aplicado: grupo I (RUV exclusivamente); grupo II, tratados con ingenol mebutato durante 3 días consecutivos; grupo III, tratados con paclitaxel+5% GES durante 3 semanas; grupo IV, tratados con paclitaxel+5% GES 6 semanas; grupo V, tratados con paclitaxel+1,2% GES 3 semanas y Grupo VI tratados con paclitaxel+1,2% GES 6 semanas. Tras el período de tratamiento los ratones fueron observados durante 1 mes, y finalmente se realizó su sacrificio y necropsia.

Todos los animales presentaban clínicamente todo el espectro lesional del fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis cutáneos.

En los animales tratados con ingenol mebutato se produjo la reducción de la superficie de las lesiones desarrolladas durante la irradiación, así como la reducción del 17% de la incidencia de carcinomas con respecto al grupo Control, mientras que los animales de los grupos tratados con distintas formulaciones de paclitaxel lograron reducir la incidencia de carcinomas entre el 25 y el 50%, siendo los animales tratados con paclitaxel+1,2% GES durante 3 semanas los que mostraron mayor grado de respuesta al tratamiento con una reducción de la incidencia de carcinomas del 50%.

En el estudio inmunohistoquímico los animales de todos los grupos mostraron un comportamiento similar. Se observó la disminución de expresión de PCNA y, por tanto la proliferación celular y una mayor expresión de MMP-9 en los carcinomas *in situ* y microinvasores, lo que sugiere una mayor actividad de estas enzimas en estadios iniciales de la carcinogénesis; mientras que el inhibidor de metaloproteinasas TIMP-1 parece tener poca relevancia en el proceso neoplásico en nuestro modelo.

En conclusión, el presente modelo reproduce el efecto sobre la piel de la exposición crónica a la radiación ultravioleta, provocando las alteraciones del fotoenvejecimiento y el desarrollo de carcinomas. El tratamiento de la piel con signos de daño actínico con ingenol mebutato o con paclitaxel previene la

evolución de las lesiones hasta el desarrollo de carcinomas
espinocelulares.

II. INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano que ocupa mayor extensión en el cuerpo humano y, al igual que el resto de órganos, sufre el envejecimiento cronológico o intrínseco, pero a diferencia de los restantes órganos, la piel se ve influenciada por fenómenos externos como la exposición a las radiaciones solares, capaces de provocar una serie de alteraciones conocidas como fotoenvejecimiento, caracterizadas por un envejecimiento prematuro de la piel que puede llevar al desarrollo de lesiones neoplásicas o fotocarcinogénesis.

En el proceso de fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis intervienen factores inherentes al organismo, sobre los que resulta imposible actuar, aunque sí es posible la intervención sobre los fenómenos externos. En este sentido, se han desarrollado multitud de modelos experimentales del fotoenvejecimiento, tanto mediante cultivos celulares o, en su gran mayoría, con animales de experimentación, siendo los ratones, la especie de mayor experiencia por su facilidad de cuidados y su bajo coste.

Por otra parte, también se ha estudiado la protección de la piel frente a la RUV de forma física o química, conocida como fotoprotección. Ésta debe ser ampliamente considerada por la población para prevenir el daño cutáneo producido por el sol, de modo que se han comercializado productos de distinta composición para la protección cutánea. Asimismo, durante las

últimas décadas se han ensayado diversas sustancias en el tratamiento del fotoenvejecimiento. Algunas de éstas tienen como origen materias biológicas de procedencia vegetal y animal, cuyo empleo no se ha limitado a la vía tópica sino también a su consumo en la alimentación, y fármacos para tratar las lesiones cutáneas.

En este sentido, el **paclitaxel**, un fármaco semisintético del grupo de los taxanos con actividad antitumoral, ha sido utilizado durante décadas en diversas enfermedades oncológicas entre las que no se incluían las cutáneas. Habitualmente su empleo se ha centrado en la administración intravenosa y han sido numerosos los estudios que han tratado de buscar nuevas fórmulas con el fin de disminuir su toxicidad y mejorar su eficacia.

En nuestro trabajo nos planteamos en primer lugar el desarrollo de un modelo de fotoenvejecimiento en ratones albinos SKH-1 mediante la exposición de forma crónica a la radiación ultravioleta y el posterior tratamiento de las lesiones cutáneas desarrolladas mediante la aplicación tópica de ingenol mebutato y el taxano paclitaxel, con dos formulaciones y duraciones de tratamiento diferentes.

III. ANTECEDENTES

1. PIEL

La piel es el órgano más extenso del organismo, cubriendo un área de 1,5- 2m² y supone entre el 10 y el 15% del peso en la especie humana (Avci, 2013).

Es el órgano con el que se establecen relaciones con el medio externo actuando además como barrera frente a cualquier elemento del exterior, como las radiaciones solares que son necesarias para las funciones vitales, pero cuya exposición persistente promueve cambios degenerativos que constituyen el fotoenvejecimiento. Además, tiene un papel vital como barrera de regulación del medio interno, controlando la temperatura corporal y el equilibrio hidroelectrolítico (Vicente, 1999).

A. ESTRUCTURA MACROSCÓPICA

Se pueden distinguir a simple vista:

a) **Pliques y surcos.** Están siempre presentes en todos los individuos sobre la cara dorsal de ciertas articulaciones: codos, rodillas, dedos, muñecas, etc.

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

c) **Poros cutáneos.** Corresponden al orificio externo del conducto de salida de las glándulas sudoríparas y de los complejo pilosebáceos.

Además, según el desarrollo de las capas de la epidermis diferenciamos dos **tipos de piel**: piel gruesa y delgada.

- **Piel gruesa:** se encuentra en los labios así como en las palmas de las manos y plantas de los pies, en la que se observan surcos que constituyen las huellas digitales. Se caracteriza por presentar una capa gruesa de queratina y una capa lúcida que no existe en la piel delgada.

- **Piel delgada:** como la piel de los párpados y zonas genitales.

B. ESTRUCTURA MICROSCÓPICA

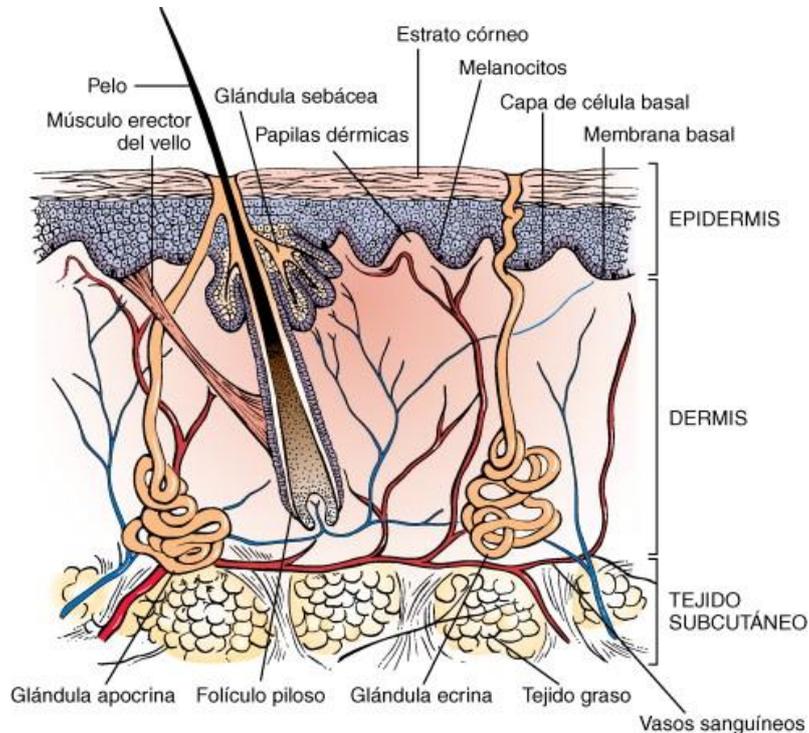


Fig. 1. Capas y estructuras de la piel (Swartz, 2010).

La piel está formada por 3 capas: epidermis, dermis y tejido subcutáneo.

EPIDERMIS: Se trata de la capa más externa y corresponde a un epitelio plano, poliestratificado y avascularizado cuyo espesor varía según la zona corporal entre 0,04 y 0,4mm.

Actúa de barrera con el medio externo y es impermeable al agua por lo que impide la evaporación del contenido.

De ella protruyen los folículos pilosos y se encuentra separada de la dermis por medio de la **membrana basal** (Palomino, 2001).

Los principales **tipos celulares** que la forman son:

-**Queratinocitos:** son las células más abundantes de la epidermis (80-90%) y se encargan de la síntesis de queratina, que ejerce una función física de barrera. En los estratos más profundos son prismáticos, con mucha mitosis y escasa actividad bioquímica mientras que se hacen cúbicos al ir ascendiendo y finalmente aplanados, perdiendo capacidad de división y aumentando la síntesis de queratohialina a medida que avanzan hacia la superficie. Contienen además melanina que recibe de los melanocitos por secreción citocrina.

-**Melanocitos:** son células productoras de melanina que es el pigmento que absorbe radiación ultravioleta protegiendo así el material genético.

En todas las razas el número de melanocitos es el mismo aunque el color de la piel varía por la capacidad de síntesis de melanina y de transporte hasta queratinocitos adyacentes (Vicente, 1999).

-**Células de Langerhans:** tienen función inmunitaria, actúa presentando y procesando antígenos a los linfocitos T epidérmicos y además participan en reacciones alérgicas. En su citoplasma pueden observarse los gránulos de Birbeck, estructuras en forma de bastones o raquetas (Valladeau, 2006).

-**Células de Merkel:** están asociadas a fibras nerviosas amielínicas y se encargan de la sensación del tacto.

En la epidermis se distinguen de dentro hacia fuera las siguientes **capas o estratos** visibles al microscopio óptico y cuya renovación ocurre completamente cada dos meses:

- **Capa córnea (o estrato córneo):** Es la capa más externa de la epidermis y comprende, en promedio, unas 20 subcapas de células muertas, aplanadas, en función de la parte del cuerpo que recubre la piel. Estas células muertas se desprenden regularmente en un proceso conocido por descamación. La capa córnea es también asiento de los poros de las glándulas sudoríparas y las aberturas de las glándulas sebáceas.

- **Capa clara (estrato lúcido):** Las células están densamente comprimidas, aplanadas y no pueden distinguirse unas de otras. Sólo se encuentra en las plantas de los pies y las palmas de las manos dando elasticidad a la piel de esta zona que soporta un fuerte estrés mecánico (Serna, 2002).

- **Capa granular (estrato granuloso):** en ella comienza la queratinización. Las células producen gránulos duros de queratohialina. En esta capa los núcleos de los queratinocitos sufren apoptosis.

- **Capa espinosa (o estrato espinoso):** Es el de mayor grosor. Los queratinocitos producen queratina y llegan a adoptar forma de huso. Recibe su nombre por presentar células con estructuras citoplasmáticas en forma de espinas

correspondientes a los desmosomas o estructuras de unión entre células vecinas.

- **Capa basal (o estrato basal):** Es la capa más interna, donde se producen los queratinocitos que migran hacia la superficie de la piel madurando y experimentando una serie de cambios conocidos como queratinización.

Además existe una serie de estructuras denominadas corpúsculos, con funciones variadas:

- **Corpúsculos de Meissner:** se encargan del tacto fino y se ubican en la piel sin pelo como: palmas de las manos, plantas de los pies, yema de los dedos, labios, punta de la lengua, pezones, glande y clítoris.
- **Corpúsculos de Krause:** son los responsables de la sensación de frío.
- **Corpúsculos de Ruffini:** son los responsables de la sensación térmica del calor.
- **Corpúsculos de Paccini:** proporcionan la sensación de la presión sobre la piel.
- **Corpúsculos de Merckel:** registran el tacto superficial.

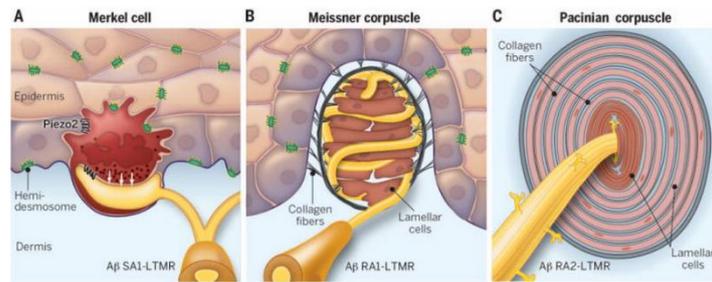


Fig. 2. Células de Merkel (A) y Corpúsculos de Meissner (B) y Paccini (C), (Zimmerman, 2008).

La **membrana basal** se sitúa entre la epidermis y la dermis; está formada por la lámina lúcida y la lámina densa. La unión dermoepidérmica es una zona de esta membrana, cuya función consiste en unir la dermis y la epidermis y conferirle resistencia.

DERMIS: Es una capa 20-30 veces más gruesa y firme que la epidermis. Es rica en vasos sanguíneos y linfáticos, nervios sensitivos y músculo liso. Se sitúa entre la epidermis y la hipodermis sirviendo de protección (Goldsmith, 1991).

Se encuentra constituida por dos capas

- **Dermis papilar:** capa más superficial, que limita con la epidermis, rodea los anejos cutáneos y suministra los nutrientes a la epidermis.

- **Dermis reticular:** está formada por haces de fibras de colágeno más gruesos que los de la capa papilar y delimita con la hipodermis (Serna, 2007).

La dermis contiene predominantemente fibroblastos encargados de la producción de fibrillas de procolágeno.

Además contiene una matriz extracelular con fibras de colágeno que aportan resistencia, elastina encargada de la elasticidad y resiliencia y fibras reticulares. Estas últimas formadas por proteoglicanos, glicoproteínas, glicosaminoglicanos y ácido hialurónico, moléculas con aspecto gelatinoso con capacidad para fijar el agua y aportar volumen a la piel.

Otras células de la dermis tienen una función defensiva como son los **mastocitos**, encargados de la respuesta inmune celular por medio de la liberación de histamina, heparina y otros mediadores; **macrófagos** y las células presentadoras de antígenos, denominadas **células dendríticas**.

TEJIDO SUBCUTÁNEOADIPOSO O HIPODERMIS: Está compuesto por lóbulos de adipocitos. Actúa como almohadilla absorbiendo los golpes y protegiendo a estructuras vitales además de mantener el calor corporal y servir de sustrato energético. El número de células adiposas es diferente en cada parte del organismo así como entre hombres y mujeres (Avci, 2013).

Además de los adipocitos existen fibras colágenas especiales, entrelazadas constituyendo los llamados septos que mantienen juntas las células adiposas y los vasos sanguíneos.

Además existen los siguientes **anexos**:

- **Aparato pilosebáceo**: corresponde a una invaginación de la epidermis. Sus células constituyen la matriz del folículo piloso y producen la queratina del cabello. Las glándulas sebáceas están repartidas por todo el cuerpo a excepción de las palmas de las manos y las plantas de los pies y producen secreción sebácea que se incrementa con la temperatura corporal.

- **Glándulas sudoríparas ecrinas**: La mayor concentración se encuentra en las axilas, palmas de las manos y plantas de los pies. Su función es la del enfriamiento de la superficie cutánea por medio de la producción de sudor y su posterior evaporación.

- **Glándulas apocrinas**: están ubicadas en: axila, región anogenital, canal auditivo externo (ceruminosas), párpados e infrecuentemente en la cara y cuero cabelludo. A diferencia de las anteriores no intervienen en la regulación del calor corporal.

- **Uñas**: consiste en el platillo ungueal y el tejido que lo rodea (Palomino, 2001).

C. FUNCIONES CUTÁNEAS

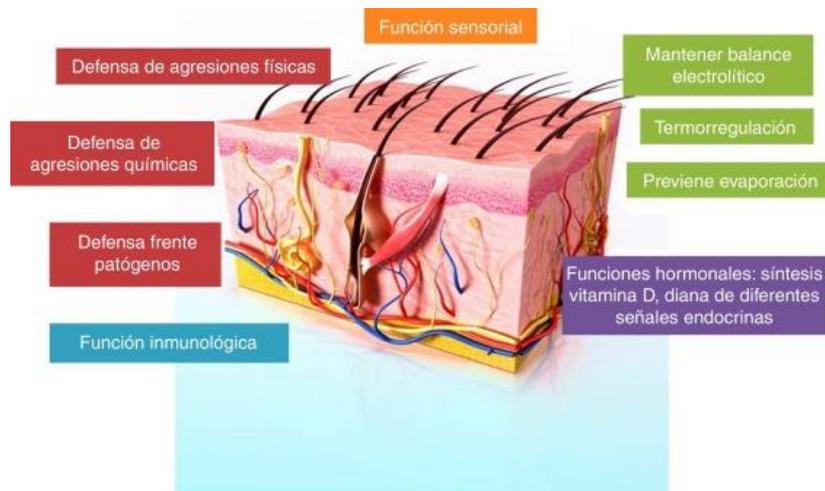


Fig. 3. Funciones cutáneas (Trachuelo, 2015).

La piel desempeña múltiples funciones para el organismo: confiere resistencia frente a traumas, protección frente a infecciones y radiaciones, previene la pérdida de agua en exceso, ayuda a regular la temperatura corporal, es el lugar donde se sintetiza la vitamina D y permite la sensación de tacto, frío o calor (Avci, 2013).

La piel protege al organismo frente a las radiaciones reflejando una proporción y absorbiendo otra cantidad de la luz que evitando que alcance al ADN celular. Además cuenta con múltiples mecanismos de reparación enzimática del daño celular causado por la radiación.

A nivel inmunológico muchas de células que sintetizan moléculas inmunológicamente activas como interleuquinas, factores de crecimiento, factores estimuladores de colonias,

interferones y citolisinas, que intervienen en el reconocimiento e internalización de antígenos, autorregulación del crecimiento, tráfico de linfocitos y mecanismos de inflamación (Palomino,2001).

2. RADIACIÓN SOLAR

La radiación solar que llega a la Tierra tiene una amplia gama de longitudes de onda y en su conjunto se conoce como **espectro electromagnético**.

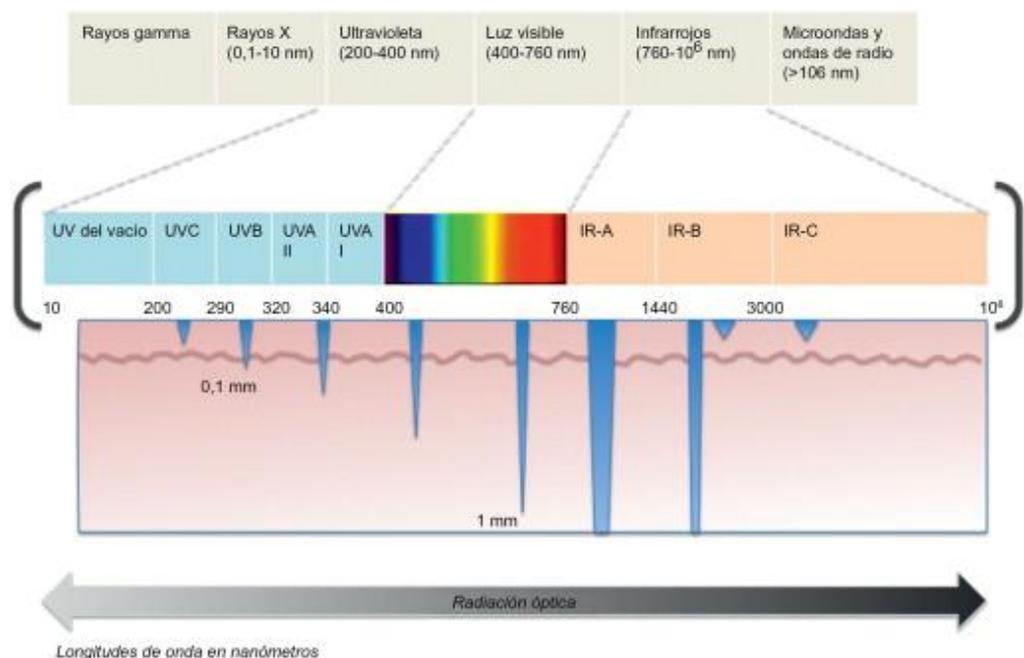


Fig. 4. Espectro de radiación electromagnética (Maibach, 2015).

A. ESPECTRO DE LUZ ULTRAVIOLETA: En 1932 se clasificó según la el Segundo Congreso de la Luz en (Pruss-ustun, 2006):

- **UVA:** 320-400nm, constituye el límite de las radiaciones detectadas por el ojo humano. Son responsables del bronceado y envejecimiento de la piel (Longo, 1998).

Recientemente se han dividido en UVA I o larga y UVA II o corta (320-340nm), teniendo estas últimas un efecto similar al de los UVB.

- **UVB:** 290-320nm, se denomina también espectro de quemadura solar por ser la más eficaz en la producción de enrojecimiento, eritema, así como mutación en los oncogenes y en los genes supresores de tumores, siendo las principales responsables del cáncer de piel. También son las encargadas de la síntesis de vitamina D.

- **UVC:** 200-290nm, es filtrada por la capa de ozono y no llega a la Tierra, por lo que no interviene en el fotoenvejecimiento. Produce irritación de la piel y la córnea y tiene un alto potencial mutagénico (Osmola-Mankowska, 2012). Se le denominara radiación germicida y se emplea en la esterilización (Sánchez-Saladaña, 2001; Lodyga, 2015).

La profundidad de la penetración de la radiación UV en la piel es directamente proporcional a su longitud de onda: a mayor longitud de onda (nm) mayor profundidad.

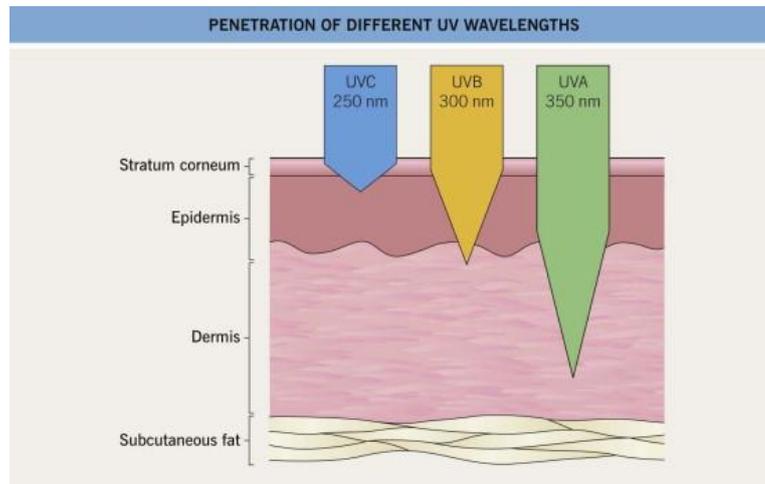


Fig. 5. Capacidad de penetración en la piel de los distintos tipos de radiación (Bologna, 2014).

B. EFECTOS BENEFICIOSOS DE LA RADIACIÓN SOLAR

La radiación solar tiene una acción **calorífica** debida a las radiaciones infrarrojas. La captación de radiación solar en cantidad moderada ha demostrado acción **antidepresiva** gracias la reducción del nivel de stress y regulación de los ritmos circadianos.

Esta radiación tiene acción antiraquítica, provoca transformación en la epidermis del 7-dehidrocalciferol en colecalciferol, el que a nivel del hígado y riñón será hidrolizado para formar el 1,25 dihidrocolecalciferol o **vitamina D3** gracias a la radiación UVB. Esta vitamina tiene funciones hormonales, anti proliferativas y de diferenciación celular, con efectos beneficios en **enfermedades dermatológicas** como la psoriasis, en la que la

fototerapia ha demostrado ser eficaz (Holick, 1981; Lodyga, 2015).

C. EFECTOS INMUNOLÓGICOS

La piel está dotada de su propio sistema inmune que la protege frente a patógenos y elimina las células dañadas. Las **células de Langerhans** son macrófagos que presentan antígenos a los linfocitos T comenzando una reacción inmune en la piel. Junto a los queratinocitos, células del endotelio vascular, macrófagos, mastocitos, granulocitos y melanocitos forman el **tejido linfoide asociado a la piel** (Thomas, 2007).

La radiación altera la función de los macrófagos involucrados en el procesamiento y presentación de antígenos, especialmente en las células de Langerhans integrantes de la epidermis y que constituye el 4% de su población celular, provocando un descenso del número de éstas así como un deterioro de los mecanismos defensivos y permitiendo la evolución de los daños hacia el desarrollo de cáncer de piel.

Se ha observado que la dosis simple de UVB aplicada a ratones inhibe el desarrollo de hipersensibilidad local por contacto a una sustancia química. A dosis mayores, puede producir supresión sistémica de la hipersensibilidad por contacto así como inhibición del rechazo de trasplantes, ambos efectos son debidos a la generación de linfocitos T supresores

antígeno específicos. Hay indicios de que la UVC mata a la células de Langerhans; que las UVB son mejores supresores y que las UVA las inducen (Valdivia, 2002).

D. FOTOTIPOS CUTÁNEOS

El límite de la tolerancia cutánea de cada individuo a la radiación ultravioleta se denomina fototipo y depende de cada tipo de piel.

Fitzpatrick, en 1975, estableció la clasificación según los distintos fototipos.

FOTOTIPO	QUEMADURAS	BRONCEADO	COLOR DE PIEL	GRUPO DE INDIVIDUOS
I	Siempre	No	Muy blanca	Pecosos, pelirrojos
II	Muy fácilmente	Mínimo	Blanca	Rubios o pelirrojos
III	Fácilmente	Gradual	Ligeramente morena	Cabello rubio/moreno
IV	Ocasionales	Sí	Morena	Latinos
V	Raramente	Intenso, rápido	Muy morena	Árabes, asiáticos, indios
VI	Nunca	Máximo	Negra	Negros

Fig. 6. Clasificación de los fototipos cutáneos (Acci, 2009).

- Las personas con **fototipo I** se queman siempre y no se broncean nunca tras la exposición solar, requieren un factor de protección solar extremo o FP 60.

- El **fototipo II** engloba a personas que tras la exposición solar sufren la formación de eritema y posteriormente la descamación de la piel; pueden desarrollar una ligera pigmentación y requieren un FP de 30.

- En el **fototipo III** están aquellas personas que se queman fácilmente y se broncean forma gradual. Estas personas requieren fotoprotector por encima de 15. Es el fototipo clásico de la raza caucásica

- Las personas con **fototipo IV**, aunque se queman mínimamente y se broncean con facilidad, requieren una protección de 6-8 con el fin de evitar el fotoenvejecimiento.

- La protección de los individuos del **fototipo V** debe ser de 2-6.

- El fototipo **VI** representa a personas de piel negra, que no requieren protección (González, 2006).

Los fototipos cutáneos son los principales determinantes de la respuesta de la piel a la exposición solar pero existen otros factores como la humedad de la piel, que permite que los rayos UV penetren con mayor facilidad, el grosor de la piel según la localización anatómica, la edad y la exposición previa a radiaciones (Young, 1998).

3. FOTOPROTECCIÓN

Los seres humanos están continuamente expuestos a las radiaciones solares, por lo que el organismo ha desarrollado **mecanismos endógenos** de defensa que incluyen la producción de pigmentación, el engrosamiento de la epidermis, reparación del ADN, apoptosis, enzimas con capacidad antioxidante, etc. Un ejemplo lo constituye el ácido urocánico contenido en el sudor con capacidad fotoprotectora. Sin embargo, la exposición prolongada al sol hace que éstos sean insuficientes frente al daño por estas radiaciones, haciendo necesario el uso de **protección externa** (Sanchez-Saladaña 2001; Lodyga, 2015).

La protección frente a las radiaciones solares pasa por evitar la exposición en las horas centrales del día (de 10 a 14 horas), el uso de ropas, sombreros y gafas de sol y la aplicación de cremas solares para prevenir las quemaduras, así como el consumo de alimentos o fármacos ricos en beta-carotenos (Harvey, 1996; Mc Ardle, 2004).

A. PRINCIPIOS GENERALES DE LA FOTOPROTECCIÓN

-**Absorción** (química) y disminución de la **transmisión** de UV en el estrato córneo, mediante el uso de sustancias químicas absorbentes de UVB y UVA.

- Aumento de **la dispersión** de UV en el estrato córneo y la epidermis, mediante el uso tópico de partículas micronizadas de dióxido de titanio, óxido de zinc o melanina.

- **Inactivación** de los radicales libres y formas reactivas de oxígeno en las células viables de la epidermis y dermis.

- **Bloqueo físico o reflexión** de los UV, mediante sombrillas, sombreros y vestidos de nilón, poliéster y algodón (Gil, 2014).

B. FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (FPS)

Actualmente el método de evaluación del factor de protección considerado estándar en Europa es el COLIPA de la Agrupación Europea de Fabricantes de Productos de Cosmética y Perfumería). Este método toma como referencia el de la FDA norteamericana y el DIN alemán. Está basado en el uso de una lámpara con arco de xenón y consiste en generar eritema en zonas delimitadas de individuos seleccionados mediante la exposición a dosis crecientes de radiaciones (Gonzalvez, 2006).

La eficacia de los fotoprotectores se mide mediante el **Factor de Protección Solar** (FPS) que indica la capacidad de protección que tiene el fotoprotector ante los rayos UVB. Es el múltiplo del tiempo durante el cual un individuo puede estar expuesto al Sol sin quemarse. Se calcula dividiendo la mínima cantidad de energía necesaria para producir eritema

mínimamente detectable 24 horas después (MED) en piel con fotoprotección y la energía requerida para producir la MED sin la aplicación del fotoprotector (Sanchez-Saladaña, 20009).

$$FPS = \frac{MED_con_protección}{MED_sin_protección}$$

El FPS está influido por factores propios de la preparación, de la cantidad aplicada y del tiempo transcurrido desde la aplicación hasta la exposición solar. Se recomienda una aplicación 10-30 minutos antes de la exposición repitiéndose cada 2-3 horas (Diffey, 2001; Thomas, 2013).

C. CLASIFICACIÓN DE LOS FOTOPROTECTORES

CATEGORÍA QUE SE INDICA EN LA ETIQUETA	FPS QUE CORRESPONDE
Protección baja	6-10
Protección media	15-20-25
Protección alta	30-50
Protección muy alta	50+ (corresponde a un FPS superior a 60)

Fig. 7. Clasificación de los fotoprotectores (Acci, 2009).

Inicialmente los fotoprotectores se centraban en el bloqueo de las radiaciones UVB para mitigar el desarrollo de quemadura solar, por lo que en 2007 se propuso cambiar el

término “factor de protección solar” por “factor de protección UVB”, sin embargo hoy día también se conocen los efectos de la radiación UVA sobre la piel, por lo que la propuesta fue desestimada y se ha pasado a emplear el término **factor de protección ultravioleta (UPF)**, que incluye el bloqueo de radiación UVA y UVB (Lodyga, 2015) y los fotoprotectores deben ser capaces de retener ambos tipos de radiaciones (Fourtanier, 2008; Wang, 2011).

Las funciones de los filtros solares son:

- Prevenir el eritema solar.
- Reducir el riesgo de cáncer cutáneo.
- Prevenir el fotoenvejecimiento cutáneo.
- Reducir el riesgo de fotodermatosis y fotosensibilizaciones.

Los fotoprotectores que se aplican sobre la piel actúan reflejando, absorbiendo o refractando la radiación ultravioleta y son de varios tipos (Gilaberte, 2010):

Filtros físicos (inorgánicos).

Todos ellos son pigmentos minerales que filtran el 99% de la luz visible y UV. Tienen un espectro de acción amplio (UVA y UVB) y provocan menos reacciones alérgicas que los químicos. Como inconvenientes, son menos estéticos por dejar sobre la piel un residuo blanquecino y pueden manchar la ropa.

Los más utilizados son el **dióxido de titanio** (TiO₂), mica, calcio, silicatos y el **óxido de zinc** (ZnO), éstos son blancos e insolubles en agua por tanto más duraderos. Otros compuestos menos usados son el carbonato de calcio, carbonato de magnesio y los óxidos de magnesio y de hierro (Schulz, 2002).

El dióxido de titanio es el pigmento más puro y duradero. Debido a su tamaño mayor de 200nm garantiza una protección frente a todo el espectro UV. Su principal inconveniente es el color blanco que deja sobre la piel. El dióxido de titanio micronizado tiene un tamaño menor (20-80nm) por lo que mejoran la cosmeticidad a costa de reducir su espectro de protección pues sólo dispersan la radiación mayor o igual a 400nm (Wang, 2011). Además, sufren reacciones fotoquímicas produciendo radicales libres de oxígeno que disminuyen la protección. Para evitar la producción de estas reacciones, las partículas se han recubierto de hidróxido de aluminio o silicona (Samreem, 2014).

Filtros químicos (orgánico).

Son compuestos aromáticos conjugados con un grupo carbonilo que se isomeriza con la radiación absorbida. Absorben la radiación de menos de 380nm, convirtiéndola en calor imperceptible, y disminuyendo su energía, mientras que refleja

los rayos de más de 380nm. Tienen mayor cosmetividad que los de tipo inorgánico.

Familia	Compuesto	UVB (290-320 nm)	UVA II (320-340 nm)	UVA I (340-400 nm)
Derivados del ácido aminobenzoico	PABA	Parcial	Ninguna	Ninguna
	Gliceril PABA	Parcial	Ninguna	Ninguna
	Padimato O	Parcial	Ninguna	Ninguna
	Roxadimato	Completa	Parcial	Ninguna
Benzofenonas	Dioxibenzona	Completa	Completa	Parcial
	Oxibenzona	Completa	Completa	Parcial
	Sulisonbenzona	Completa	Completa	Parcial
Cinamatos	Octocrileno	Completa	Completa	Parcial
	Octil metoxicinamato	Completa	Ninguna	Ninguna
Salicilatos	Homosalato	Parcial	Ninguna	Ninguna
	Etilhexil salicilato	Completa	Ninguna	Ninguna
	Salicilato de trolamina	Completa	Ninguna	Ninguna

Fig. 8. Principales sustancias que actúan como filtros químicos.

Los **filtros UVB** corresponden fundamentalmente a:

- **Ácido paraaminobenzoico (PABA) y derivados.**

Algunos de los nombres con los que se ha designado son: Escalol 507, Eusolex 6007 y Padimate O. Su uso comenzó en la década de 1920 y sus inconvenientes son su capacidad de tinción de las ropas, la producción de dermatitis de contacto y la baja solubilidad en agua.

- **Salicilatos y derivados.** Presentan bajo coeficiente de absorción por lo que requieren altas concentraciones para un nivel de protección aceptable. Son poco irritantes y tienen baja capacidad de penetración en la epidermis.

- **Cinamatos.** Presentan alta tasa de absorción en un amplio rango de longitudes de onda. A pesar de su buena

tolerancia existen estudios que postulan que su uso crónico predispone a reacciones de hipersensibilidad.

- **Ensulizol.**
- Otros: Etilhexil triazona (Tinosorb®), contenido en los productos que resisten al agua (“waterproof”).

Los **filtros UVA** son derivados de:

- **Antralatos**, cuyo representante es el meratimato.
- **Avobenzona.** Es el compuesto más efectivo y con mayor espectro frente a UVA, pero muy inestable por lo que se han desarrollado formulaciones que mejoran su estabilidad. Un ejemplo es Helioplex®, una combinación de dietil 2,6-naftalato, avobenzona y oxybenzona (Thomas, 2013).

Filtros de amplio espectro (UVA+UVB):

- **Benzofenonas:** Oxybenzona, Dioxybenzona y Sulisobenzona. Son compuestos de declaración obligatoria por su frecuente hipersensibilidad (Sharfstein, 2015).
- **Camphor.** Caracterizado por una alta fotoestabilidad y rara aparición de reacciones alérgicas. Es ampliamente utilizado en Europa. Son los siguientes compuestos: **Mexoryl XL** o **Ecamsule**.
- **Cinamatos:** Octocrileno.

Recientemente la FDA americana ha considerado que la evidencia acerca de la seguridad y eficacia de nuevos

ingredientes de los fotoprotectores es insuficiente por lo que recomienda realizar un estudio para evaluar su capacidad irritante sobre la piel, el grado de carcinogenicidad y el perfil toxicológico (Sharfstein, 2015). No obstante, el futuro de la fotoprotección pasa por la adición de sustancias capaces de reparar el daño en el ADN, como las enzimas **fotoliasas** y **endonucleasas** así como sustancias con capacidad para aumentar la producción de melanina (Carell, 2001; Lodyga, 2015).

Un nuevo término incorporado es el de **filtro biológico**, para designar a sustancias con capacidad antioxidante, que actúan secuestrando radicales libres principales implicadas en el fotoenvejecimiento y la carcinogénesis. Las vitaminas A y E en forma de palmitato o acetato y vitamina C son los principales filtros biológicos, contenidos en aceites de trigo, de sésamo, de aguacate o extractos de aloe vera, caléndula o cáscara sagrada (Divins, 2009). En ningún caso sustituyen a los protectores tópicos sino que los complementan.

En el mercado existen además productos con acción **autobronceadora**, que producen bronceado sin necesidad de exposición solar y otros productos que son **activadores del bronceado** por aceleración del proceso de síntesis y transferencia a la piel de la melanina.

El principal componente de los autobronceadores es la dihidroxiacetona (DHA), que origina una reacción de Mallard con las aminas, aminoácidos libres y péptidos de la capa córnea de la piel formando compuestos coloreados. Este compuesto es inocuo por afectar a capas superficiales de la piel, pero se debe tener en cuenta que no protege frente a la radiación solar.

Los productos activadores del bronceado actúan sobre la síntesis de melanina por lo que sí tienen acción fotoprotectora. Pueden ser de aplicación tópica o de consumo oral. Algunos ejemplos de este último grupo son los psoralenos y la L-tirosina (González, 2006).

Otra característica de los productos fotoprotectores es la forma farmacéutica en la que se presentan. Aunque la mayoría (60%) lo hace en forma de crema, también existen geles, leches, sprays, aceites, espumas y maquillajes compactos (Divins, 2009).

El uso de fotoprotectores ha demostrado disminuir la incidencia de queratosis actínica y carcinoma de células escamosas (Grenn, 1999; Hughes, 2013). Para los Carcinomas de células basales no se ha demostrado una correlación entre el uso rutinario de éstos y la disminución de la incidencia de estos tumores, pero sí se observa una tendencia general (Pols, 2006). En el caso del melanoma existe controversia, estando más implicada la radiación UVA que la UVB (Young, 1997; Thomas, 2013).

4. MODELOS EXPERIMENTALES DE FOTOENVEJECIMIENTO

Para el estudio del fotoenvejecimiento se han realizado estudios con cultivos celulares (*in-vitro*), con modelos animales de experimentación y en humanos (*in-vivo*).

Los modelos in vivo en el estudio del fotoenvejecimiento o carcinogénesis, se clasifican en: espontáneos, inducidos, negativos y huérfanos.

El **modelo animal** consiste en el empleo de un animal de experimentación para reproducir una enfermedad de manera semejante a como ocurre en los seres humanos con la finalidad de conocer y estudiar la biología de un proceso patológico o la conducta de los seres humanos.

Tanto por motivos metodológicos como por motivos éticos, es imposible demostrar que la radiación UV, es capaz de ocasionar cáncer cutáneo en el ser humano, sin embargo, existen datos epidemiológicos, clínicos, y resultados obtenidos de los numerosos modelos experimentales desarrollados en animales para afirmar que la radiación UV es la principal causa del cáncer cutáneo (Borrego, 2008).

Por las diferencias en el grosor de la piel de los animales en los distintos modelos y la humana se emplean parámetros de ajuste (Sánchez, 2006). Aunque se debe tener en cuenta que en el fotoenvejecimiento y desarrollo de cáncer de piel está

implicados factores genéticos, histopatológicos y clínicos por lo que cualquier tipo de modelo animal no será capaz de reflejar todos los tipos de la patología en la especie humana (Becker, 2010). No obstante, existe una gran similitud en las lesiones producidas durante el fotoenvejecimiento en humanos y distintas especies animales, por lo que estos modelos experimentales se consideran idóneos para el estudio del proceso de envejecimiento solar y las sustancias que pueden prevenir el desarrollo de cáncer (Cano, 2010).

El melanoma maligno es complejo de analizar, ya que no existe un buen modelo experimental (Sánchez, 2006).

A. PRINCIPALES MODELOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

-**Monos Rhesus** tienen una absorción percutánea similar a la humana para determinadas sustancias como hidrocortisona, testosterona y ácido benzoico.

-**Minipigs** (Kligman, 1982; Fourtanier, 1989).

La piel del cerdo tiene características histológicas y bioquímicas similares a las humanas. En los primeros estudios se observaron lesiones similares a las humanas pero más leves debido a la menor intensidad de radiación empleada.

-**Cobayas** (Kligman, 1982; Kreuzmann, 1990),

-**Ratas**, (Mulero, 2005; Nakamura, 1968),

-**Ratones** (Sams, 1964),

Los ratones de laboratorio son la especie de elección en el estudio de la mayoría de sistemas biológicos, entre algunas de sus características destaca su alta tasa de fecundidad.

-**Peces**: xiphophorus, medaka y pez cebra (Kurita, 2004).

Los roedores son los representantes de los estudios de la piel (Flores, 2010) y en concreto del fotoenvejecimiento en animales. En casi todos los animales usados para el estudio del fotoenvejecimiento se repite un patrón similar en el que aparece: engrosamiento epidérmico, infiltración de la dermis con células inflamatorias, inducción de tumoraciones, aumento del TNF- α , acumulación de glicosamionoglicanos, particularmente hialuronato en la epidermis y pérdida de colágeno (Sharma, 2011).

D. RATONES GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

Durante más de 60 años se han ensayado agentes inductores de tumores en la piel de los **ratones** con el fin de estudiar el proceso de carcinogénesis y los factores que lo regulan, siendo los **ratones genéticamente modificados** los más ampliamente empleados en el estudio del desarrollo de tumores en la piel y en la búsqueda de nuevas terapias (Chen, 2008).

Los ratones son una de las especies más útiles, incluso cuando es bien conocido que existen **diferencias en la piel** entre ambas especies.

- La piel del ratón es más fina.
- El principal mecanismo de reparación del ADN en humanos, la reparación de la escisión global de nucleótidos (NER), parece ser poco relevante en éstos.
- En la piel humana los melanocitos se sitúan en el lado basal de la epidermis (en las conjunciones dermis-epidermis) con conexiones dendríticas con los queratinocitos cercanos. Los melanosomas se transfieren desde el melanocito al queratinocito dando pigmentación a la piel y protección frente a la radiación ultravioleta. Mientras que en los ratones los melanocitos están en la base del folículo piloso en el seno de la dermis y tan sólo se encuentran en la epidermis de zonas sin pelo como orejas, cola o patas (Avci, 2013).

Para los estudios de fotoenvejecimiento en ratones inicialmente se **afeitaba el lomo** antes de su exposición a la radiación, esto dificultaba el proceso, suponía un trauma para el animal, se requerían dosis superiores para desarrollar lesiones y sus respuestas no solían imitar a lo que ocurre en la piel humana. En 1960 se desarrollaron **animales sin pelo** que los hacían óptimos para el estudio del envejecimiento,

convirtiéndose estos ratones en los representantes de estos estudios (Winkleman, 1963).

Se han realizado estudios con distintos **ratones genéticamente modificados** para conocer los mecanismos implicados en el fotoenvejecimiento la fotocarcinogénesis (Sharma, 2011):

Los **Ratones negros C57BL/6J** son los ratones menos susceptibles a la radiación UV-B por su coloración negra además, los procesos de fotoenvejecimiento en su piel tienen un comportamiento más similar al de los humanos por la presencia de condroitín sulfato en la epidermis (Sharma, 2011; Handoko, 2015). En éstos existe controversia acerca de si la exposición crónica favorece el engrosamiento de su epidermis.

Los **ratones no pigmentados Balb/c** son ratones con pelo a los que se depilaba el dorso, responden a la radiación UVC de manera similar a como lo hace la especie humana (Acvi, 2013) y no ocurre la inducción de TNF- α mediada por la exposición a UVB (Gomez, 2007; Sharma, 2011).

Otros ratones modelificados son: **CBA** (Benavides, 2009), **Swiss** (Gómez, 2007; Kambayashi, 2001) y **SKH-1** o SKH-1/CRL (Kolappaswamy, 2009).

E. RATONES SKH-1 ALBINOS *HAIRLESS*

Los ratones **SKH-1** presentan una piel con cierta rugosidad, la cual aumenta con la edad.

Debemos tener en cuenta que estos ratones parecen tener mayor sensibilidad a la inmunosupresión provocada por la radiación UV que aquellos animales con pelo (Benavides, 2009).

La variedad SKH-1 "**hairless**", se obtiene por mutación en el gen *Hr* de la posición 70 Mb del cromosoma 14 (Sharma, 2011). El ratón presenta alelos recesivos de este gen que permite la ausencia de pelo en homocigotos para este gen. La ausencia de pelo facilita la observación de la evolución del fotoenvejecimiento así como la aplicación de tratamiento tópico (Benavides, 2009). Debido a que no presentan timo, por lo tanto carecen de linfocitos T, es el modelo mutante natural más empleado en estudios inmunológicos, oncológicos, enfermedades infecciosas y en estudios de fotoenvejecimiento y fotocarcinogéneis (Klingman, 1989; Belmar, 2014).

Sin embargo, los ratones sin pelo tienen desventajas con respecto a modelos de piel humana: tienen una epidermis gruesa y un ciclo del pelo anormal, son propensos a la formación de quistes y la inflamación dérmica como consecuencia de la rotura de estos quistes, muestran una tendencia a formar granulomas de cuerpo extraño y sufrir de una alta incidencia de tumores (Sayama, 2010).

En la actualidad se conserva el modelo inicial de Schwartz que en 1988 irradiaba a los ratones tres veces por semana durante 10 semanas (Togsverd-Bo, 2013). En estudios posteriores se conservó el mismo esquema aumentando a la duración a 20 semanas (Moloney, 1992) y hasta un máximo de 80 sesiones de tratamiento (Cano, 2010).

Para el estudio del **melanoma** se han empleado distintos modelos murinos con modificaciones genéticas siendo el más común el modelo B16 derivado de modelo C57BL/6J en el que se desarrolla espontáneamente melanoma. Otros modelos de melanoma en ratones consisten en la expresión de oncogenes como el Ret o formas mutadas de Ras y Raf con capacidad de metastatizar en variedad de órganos, en los que no profundizaremos por no ser el melanoma objeto de nuestro estudio.

Para la realización de este trabajo elegimos como modelo animal el ratón sin pelo SKH-1, procedentes del Skin and Cancer Hospital, Temple University (Philladelphia), 1986 (Charles River Laboratories. New York, USA) que fueron aclimatados y criados en el Servicio de Animales de Laboratorio (SAI) de la Universidad de Murcia, porque consideramos que suponen un modelo animal de elección, por ser albinos y sin pelo, con menor protección frente a las RUV; además de ser eutímicos y por lo

tanto, inmunocompetentes y sobre todo, un modelo animal de fácil manejo, alta tasa de fecundidad y bajo coste.

5. ENVEJECIMIENTO EXTRÍNSECO O FOTOENVEJECIMIENTO

A. FOTOENVEJECIMIENTO

El **envejecimiento** se define por la disminución de la funcionalidad máxima y la capacidad de reserva del organismo, que provoca aumento de la probabilidad de desarrollo de enfermedades y de muerte.

A medida que se envejece, la piel pierde capacidad de respuesta a la vasodilatación y disminuye el número de melanocitos (Hung, 2012); además ocurre una lenta y progresiva disminución de la producción natural de **colágeno** y **elastina** así como del tejido subcutáneo adiposo y la capacidad de la piel para fijar agua, de manera que adquiere un aspecto menos tonificado, pierde espesor y laxitud por lo que aparecen arrugas y tumores benignos como la queratosis seborreica (Binic, 2013). Estos cambios se engloban dentro de lo que se conoce como **envejecimiento intrínseco o cronológico** que es debido a la edad por el acortamiento de los telómeros en cada ciclo de replicación (Yaar, 2002). Depende de la variabilidad genética de los organismos y no se puede prevenir ni retrasar actuando sobre él de modo alguno.

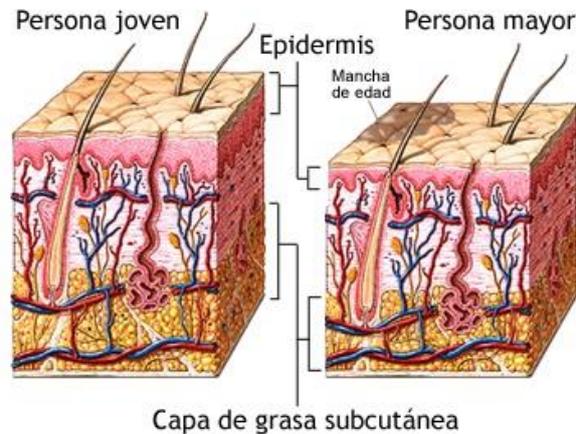


Fig. 9. Comparación del grosor de la piel joven y la piel envejecida por la edad.

En contraposición al envejecimiento intrínseco, existe el **envejecimiento extrínseco** en el que intervienen factores del medio que rodea al organismo. El factor principal es la exposición al Sol de forma crónica y con una influencia menor el tabaquismo, el consumo de alcohol en grandes cantidades, los hábitos dietéticos, etc.

En 1986 se empleó por primera vez el término **“fotoenvejecimiento”** para describir el conjunto de cambios que ocurren en la piel tras la exposición a rayos UV a lo largo de varios años. Entre los cambios observados se incluye el eritema, quemadura solar, inmunosupresión y efectos a largo plazo como el envejecimiento, la aparición de queratosis actínica y el cáncer de piel (Avci, 2013). Además se han asociado otras patologías como:

- Prurito
- Asteatosis o falta secreción sebácea
- Eccema
- Penfigoide
- Herpes zoster
- Queratosis seborreica
- Queratosis actínica
- Carcinoma basocelular
- Carcinoma espinocelular
- Léntigo maligno
- Melanoma.

Cuando la radiación solar incide en la piel, las sustancias cromóforas (ácidos nucleicos, las proteínas y lípidos) presentes en la epidermis y la dermis absorben dicha energía y se forman dímeros de **pirimidina** y **4,6-fotoproductos** con capacidad mutagénica. Los cambios producidos en el ADN son inicialmente reparados, pero existen individuos con afectación de los mecanismos reparadores en los que el riesgo de cáncer de piel está aumentado. Es el caso de individuos con **xeroderma pigmentoso**, trastorno autosómico recesivo en el que el individuo muestra una piel envejecida prematuramente con formación de carcinomas de células basales y escamosas así

como melanomas durante los primeros 20 años de vida (Longo, 1998).

En el fotoenvejecimiento el deterioro de la piel ocurre de una forma más precoz y además se manifiesta en la piel de manera distinta a como lo hace el envejecimiento cronológico (Thurstan, 2012). La piel adquiere un aspecto seco y correoso, con pigmentación irregular y gruesas arrugas como consecuencia de la pérdida de elasticidad. Histológicamente en la dermis se degrada y se acumula el material elástico, la acumulación de este material elástico se ha denominado **elastosis** y se considera un signo inequívoco de la piel fotoenvejecida (Iannacone, 2014). La elastina degradada da lugar a la formación y acumulación de un material amorfo que es una condición patológica común en la piel asociada con la exposición prolongada al sol (Sayama, 2010).

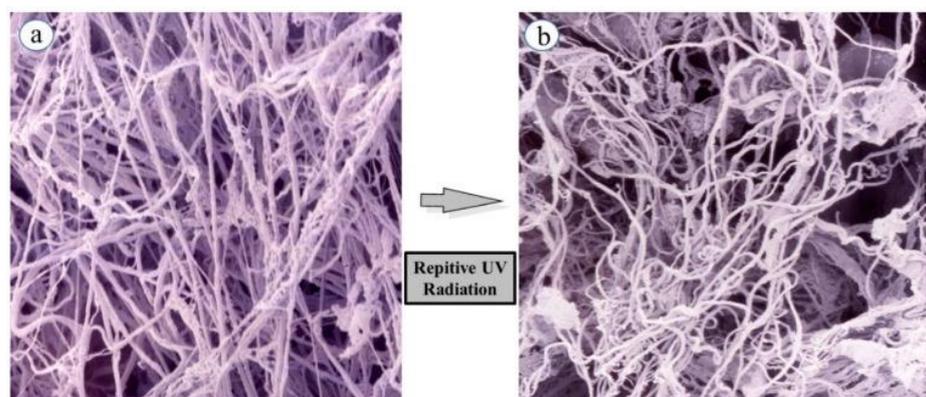


Fig. 10. Comparación de la apariencia al microscopio electrónico de las fibras de elastina antes(a) y después (b) de someterla a varias sesiones de radiación UV (Imokawa, 2015).

En la patogenia del fotoenvejecimiento ocurre la suma del daño producido por las radiaciones UVB en la capa más externa, la epidermis y el producido por las radiaciones UVA en la capa intermedia o dermis. Además, la oxidación ultravioleta promueve la formación de radicales libres de oxígeno con capacidad mutagénica. Asimismo, los neutrófilos producen sustancias proteolíticas como las **elastasas** y las **metaloproteasas** de la matriz (MMP-8 y MMP-9) y además ocurren cambios a nivel molecular que promueven la expresión de MMP por la alteración de señales de transducción, disminución de la síntesis de procolágeno y daño en el tejido conectivo (Binic, 2013).

Radicales libres de oxígeno

Su papel es clave tanto en el envejecimiento intrínseco, en el que se producen de forma natural, como en el extrínseco en el que están implicados factores externos como la exposición a las radiaciones UV y consumo de alcohol o tabaco (Cano, 2010).

En los individuos expuestos a radiaciones UV tanto A como B se produce un aumento de los radicales libres de oxígeno en su piel, disminuyendo así la capacidad defensiva del organismo y produciéndose un daño sobre proteínas y otras macromoléculas de la piel.

Los radicales libres de oxígeno, por tanto, se consideran agentes claves en el fotoenvejecimiento. Éstos actúan sobre

macromoléculas de los tejidos formando grupos carbonilos que se acumulan en la dermis papilar.

Tras la exposición de especies humanas y animales a estas radiaciones se producen metaloproteinasas (MMPs) en la matriz dérmica, que están implicadas en el fotoenvejecimiento por medio de la degradación del colágeno del tejido conectivo.

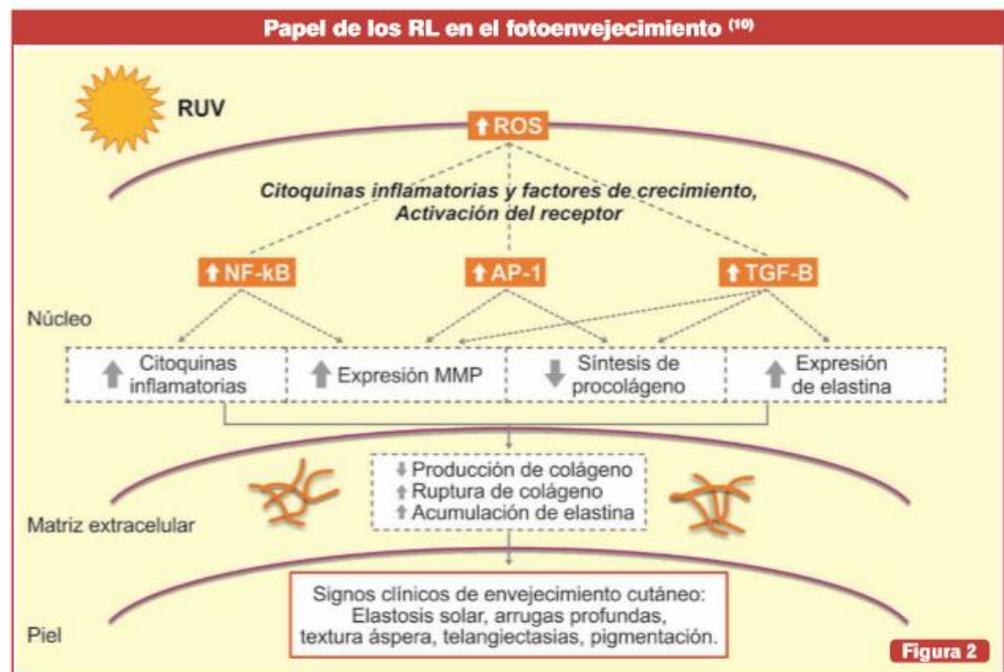


Fig. 11. Efecto de los radicales libres sobre la piel (Magliano, 2014).

Existen especies vegetales ricas en antioxidantes, como el té verde y té negro, el extracto de granada, el resveratrol presente en la uva o la soja, que han demostrado prevenir el fotoenvejecimiento al ser consumidas en la dieta (Afaq, 2006).

B. MECANISMOS DE DAÑO TISULAR DE CADA TIPO DE RADIACIÓN

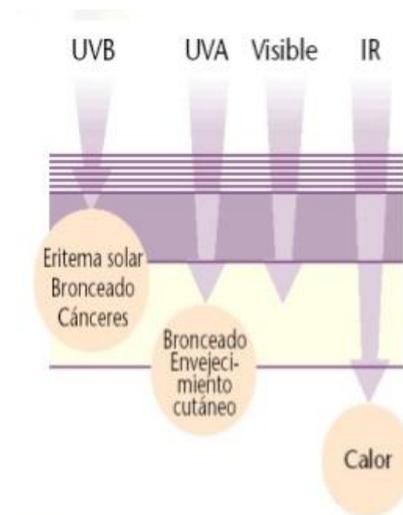


Fig. 12. Efecto sobre la piel de la radiación solar.

- **Radiación UV**

La radiación ultravioleta induce la producción de citoquinas, como el TNF- α que perjudica la síntesis de colágeno en la piel humana por activación de TNF-R55 o la interleukina-6 que media efectos sobre la destrucción del colágeno por medio de la modulación de la vía MMP-1 (Binic, 2013).

Entre las mutaciones producidas por la exposición solar que están implicadas en la carcinogénesis se encuentran las producidas a nivel de: p53, ptch y ras, en dichas mutaciones se encuentran implicadas las radiaciones UVA y UVB.

Además, la **radiación UVA** afecta a los fosfolípidos y el colesterol de las membranas celulares produciendo radicales libres e inhibiendo la peroxidación de lípidos y enzimas de membrana, y el transporte de proteínas; y daña el tejido conectivo a la vez que favorece el daño provocado por las UVB (Biniek, 2012). La radiación UVA actúa sobre el colágeno y la elastina provocando la formación de arrugas (Hung, 2012) y por oxidación del ADN provocando citotoxicidad y carcinogénesis que inducirán al melanoma maligno. Además de desencadenar alergias solares son los responsables de la pigmentación de la piel. Los UVA cortos son cinco veces más carcinogénicos que los UVA largos (Sánchez-Saladaña, 2001). Dado que la radiación UVA es 20 veces más abundante que la UVB se considera la principal causante de la inmunosupresión producida por el Sol (Lodyga, 2015). Además, UVA activa Akt, ERKs, and JNKs, (Liu 2013).

La **radiación UVB** produce el mayor daño en los queratinocitos, contribuye a este daño por medio de alteraciones de la barrera lipídica y sobre las células de Langerhans (Lodyga, 2015). Ha sido considerada como el principal agente promotor de los cánceres de piel melanoma y no-melanoma, al poder actuar como iniciador y promotor de la carcinogénesis mediante daño en el ADN celular. Al ser absorbido por la piel forma **dímeros de pirimidinas** y **6-4**

fotoproductos que distorsionan los mecanismos de reparación del ADN como la mutación del gen TP53, actuando como precursores de eventos precancerosos, también actúa por medio de la telomerasa (Schmitt, 2012) y además se producen **especies reactivas de oxígeno** que entran en competencia con los mecanismos antioxidantes del organismo y causan daño en moléculas de lípidos, proteínas y ADN (Ávila, 2014). Modifica la composición de la matriz dérmica, concretamente en humanos se ha visto que la exposición crónica a UVB reduce la síntesis de colágeno, especialmente el de tipo I (Klingman, 1989; Handoko, 204; Sharma, 2011).

UVB activa PKC, ATM, Akt, quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), c-jun NH2 terminal kinase (JNK), y p38.

	MAPK pathway	PI-3K pathway	Transcription factors
UV-A	EGFR, SRC, RAS, RAF, ERK1/2, p70 ^{s6k} and p90 ^{RSK}	ATM	c-JUN, Nrf2, NFAT
UV-B	PKC, JNK, p38 kinase, RSK2, MSK1	EGFR, PI-3K, Akt, p70 ^{s6k} and p90 ^{RSK}	c-FOS, NF-κB NFAT
UV-C	EGFR, SRC, ERK, p38 kinase JNK1/2	ATR	AP-1

Fig. 13. Protein kinasas y factores de transcripción activados por los distintos tipos de RUV (López-Camarillo, 2012).

- **Radiación visible**

La radiación visible contribuye a la melanogénesis y al aumento de producción de radicales libres de oxígeno (Grether-Beck 2014).

- **Radiación IR**

Se ha postulado la posibilidad de que la radiación IR incremente la actividad de la MMP-1 y reduzca la producción de fibras de colágeno tipo I. También aumenta la angiogénesis promoviendo la formación factor de crecimiento del endotelio vascular (Grether-Beck 2014).

Principales mecanismos implicados en el envejecimiento:

- **Acortamiento de los telómeros**

Es ampliamente conocido que el acortamiento de los telómeros es una causa de envejecimiento cronológico.

En cada ciclo celular éstos sufren un acortamiento que es compensado en las células de la línea germinal por la actividad de la telomerasa. Sin embargo, en los tejidos somáticos adultos, la actividad de la telomerasa es insuficiente dando lugar al inevitable acortamiento de los telómeros. Cuando éstos son críticamente cortos son afuncionales y desencadenan la apoptosis celular.

De esta manera, los telómeros son dispositivos de control de la división que, al llegar a una longitud crítica, imponen el fin de la esperanza de vida replicativa de las células del individuo (Garcia-Cao, 2006).

Además de esto, la tasa de pérdida de los telómeros en cada división celular está influenciado por la presencia de factores estresantes celulares, tales como el daño oxidativo, un

aspecto que refuerza aún más la participación de los telómeros en el inicio del envejecimiento (Von Zglinicki, 2003).

El gen supresor tumoral TP53 es un sensor importante de telómeros disfuncionales. Se ha constatado que el aumento de la función de p53 se correlaciona con una reducción de la presencia de células dañadas en el bazo, el intestino y la piel (Garcia-Cao, 2006).

- **Proteína p53:**

El gen TP53 es la diana más frecuente de las alteraciones genéticas en el cáncer humano.

Es un gen supresor tumoral que codifica una proteína de unión a ADN implicado en la detención del ciclo celular, la apoptosis y en la respuesta de la piel al daño solar. Si el ADN en una célula epidérmica tiene un daño irreparable, la proteína p53 puede inducir la muerte celular.

Sin embargo, la exposición crónica a la radiación UV induce clones de células que sobreexpresan un gen TP53 mutante y afuncional en la epidermis, los queratinocitos dañados pueden seguir reproduciéndose y degenerar en carcinomas de células escamosas con mutaciones del TP53, así como neoplasias (Rebel, 2012). Los pacientes portadores de tumores con mutaciones de TP53 a menudo tienen un peor pronóstico que aquellos que albergan tumores con TP53 nativo, y en varios

casos las mutaciones de TP53 se han asociado con tumores resistentes a los fármacos (Lanni, 1997).

En respuesta al daño del ADN, p53 se acumula en las células, se transloca al núcleo, activa la transcripción génica, y en última instancia resulta en la detención del ciclo celular, para permitir la reparación del ADN dañado antes de la replicación celular. Además, p53 activa una vía de la muerte celular programada, presumiblemente en las células con daño en el ADN excesivo. Esta predicción es apoyada por muchos informes de cáncer en el que TP53 está mutado o perdido y por la alta incidencia de tumores malignos en las personas con síndrome de Li Fraumeni \pm , que heredan una mutación en un alelo de TP53 (Jiang, 1999; Costa, 2015).

Los cambios en las vías de la proteína p53 promueven la angiogénesis y suprimen la apoptosis, que permiten el crecimiento y la proliferación de los queratinocitos mutados, con potencial maligno. Se ha observado que las mutaciones en los genes de la proteína p53 son más frecuentes en lesiones iniciales, que crea un ambiente permisivo para la proliferación celular y las mutaciones en otras proteínas de esta vía (p16 y Hras) en las lesiones más maduras (Schmitt, 2012). El gen TP53 mutado puede dar a las células ventaja de crecimiento sobre las células vecinas por apoptosis alterada.

En la carcinogénesis de piel asociada a radiación UV en los seres humanos y los ratones, las mutaciones en TP53 están presentes en casi el 100% de los casos. Esta mutación se encarga de la transición de C a T y de CC a TT, especialmente a nivel del codón 270 (Benavides, 2009).

- **Metaloproteasas de la matriz (MMP)**

Las metaloproteasas de la matriz son proteínas producidas por los queratinocitos responsables de la degradación de la matriz extracelular del tejido conectivo de la dermis. De manera general la expresión de estas proteínas en los individuos sanos es muy baja pero la radiación UV afecta a 3 MMP (1: colagenasa, 3: estromelina y 9: gelatinasa) y en respuesta a esta exposición aumentan su capacidad para degradar la mayoría de proteínas de la matriz extracelular. Estas enzimas son inicialmente inducidas en la epidermis, éstas difunden hasta la dermis degradando el colágeno extracelular (Quan, 2009).

- **Proteína p-38**

La quinasa p-38 puede ser activada por la RUV de cualquier longitud de onda para modificar la respuesta al daño sobre el material genético (López- Carrillo, 2012).

La expresión del transgén p38DN inhibe significativamente la apoptosis de los queratinocitos inducida por la radiación UV-B (Dickinson, 2012).

La señalización mediada por p38 juega un papel principal en la inducción de carcinogénesis cutánea, aunque su acción puede verse afectada según el tipo de tejido (Liu, 2013).

6. PATOLOGÍA POR RADIACIÓN SOLAR



Fig.13. Fotocarcinogénesis (Honeyman, 2002).

La luz solar es una fuente de bienestar para la salud humana con importante participación en el aporte de calor y la síntesis de vitamina D; sin embargo, la exposición a ésta tanto de forma aguda como crónica tiene consecuencias nocivas (Longo, 1998).

Las patologías cutáneas se han visto agravadas en los últimos tiempos por el alargamiento de la vida media y sobre todo por la mayor exposición al sol, lo que unido a una alarmante depleción del ozono, lleva a una mayor irradiación (Vicente, 1999).

El aumento de la exposición solar en las últimas décadas se ha debido en parte a la percepción de que la piel bronceada proporcionaba un aspecto más saludable, lo que constituye un reto en la prevención del fotoenvejecimiento (Iannacone, 2014).

En Junio de 2015 el La Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) publicó 10 consejos sobre la protección solar.

Otro factor directamente implicado con la patología de la piel es el uso, cada vez más expandido de **cámaras de bronceado**. El gobierno español reguló su utilización por los Centros de bronceado humanos, mediante el **Real Decreto 1002 / 2002**, en el que se informa de la asociación entre su uso y el envejecimiento prematuro e irreversible de la piel, la prohibición de su uso en menores de edad así como las condiciones y consecuencias que su empleo puede acarrear en la salud. También está ampliamente regulado el uso de estos aparatos por profesionales en el **Real Decreto 2032/2009** y el **Real Decreto 486/2010**. Además la Agencia de Investigación del cáncer de la OMS y la FDA, las incluyó en el grupo 1 de agentes carcinógenos (WHO, 2003; CR-UK, 2009).

El cáncer cutáneo es el más frecuente en la raza blanca y además ha sufrido un notable incremento debido a la exposición al sol, considerándose en la actualidad la radiación ultravioleta como el carcinógeno ambiental más potente (Cano, 2010).

Estos efectos del Sol sobre la piel son acumulativos y dosis dependientes, y están en relación con la duración, frecuencia y calidad e intensidad de la radiación (Sánchez-Saldaña, 2002). La

exposición solar provoca cambios en la piel a corto, medio y largo plazo.

A. EFECTOS AGUDOS: Eritema o quemadura solar:

Aparece de forma inmediata tras la exposición en forma de enrojecimiento, calor, dolor y tumefacción. Se debe principalmente a la vasodilatación de los vasos sanguíneos más superficiales de la epidermis y la velocidad de aparición es inversamente proporcional al tiempo de exposición, de manera que cuanto mayor es la exposición menor es el tiempo de aparición.

Se manifiesta principalmente en los fototipos I a III.

La radiación UVA se encarga de producir una pigmentación inmediata, conocido como fenómeno de Meirowski, por fotooxidación de la melanina.

Reacciones cutáneas derivadas de la exposición solar:

- **Fotodermatosis** es un grupo de enfermedades que agravan las reacciones de hipersensibilidad a la radiación UV.
- **Fototoxicidad:** ocurre por el consumo de determinadas sustancias que agravan el impacto de la radiación UVA sobre la piel. Algunos ejemplos son psolareños, sulfonamidas, tetraciclinas, furanocoumarinas o colorantes.
- **Fotoalergia:** se deben a la asociación de esta radiación con agentes fotosensibilizantes y no son dosis

dependientes. Se presentan a las 24-48 horas de la exposición solar en forma de eczema, prurito o quemadura. Algunos ejemplos son los salicilatos y otros antiinflamatorios no esteroídicos, fragancias y constituyentes de los propios protectores solares.

B. EFECTOS RETARDADOS: Bronceado.

Es el mecanismo natural de protección de la piel frente a la agresión que suponen las radiaciones solares, sin embargo si la exposición se prolonga este mecanismo es insuficiente (Divins, 2009).

Existe un **bronceado agudo** que aparece pocos minutos después de la exposición y es de un color algo más grisáceo que el bronceado tardío y se desvanece en unos pocos minutos si la exposición no continúa. Se debe a la oxidación de la melanina y la distribución de los melanosomas en los melanocitos desde una posición cercana al núcleo, hacia las dendritas y finalmente al citoplasma de los queratinocitos. Es debido a longitudes de onda de 320 a 450nm, que incluye UVB, UVA y visible.

El **bronceado tardío** aparece a las 24-72 horas de la exposición a radiaciones UVB y se mantiene durante varios días o incluso semanas. Es consecuencia de la neosíntesis de melanina (Gil, 2014).

Tanto el eritema inicial como el bronceado de la piel dependen de la herencia genética por polimorfismo en el receptor MSH (Melanocyte Stimulating Hormone) y se cree que pueden existir otros genes también implicados (Valverde, 1995; Tsatmali, 2000).

Eritema actínico por acción de las UVA que actúan sobre cromóforos dérmicos provocando la liberación de prostaglandinas encargadas del enrojecimiento y de serotonina e histamina.

Por último se produce una **hiperplasia dérmica** con engrosamiento de la capa cornea por la estimulación de las mitosis de los queratinocitos 48 horas después de la exposición. Se trata de una reacción reversible ya que tras meses sin exposición solar la piel vuelve a su estado inicial (Valdivia, 2002).

C. EFECTOS CRÓNICOS o FOTOENVEJECIMIENTO:

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

Fig. 14. Efectos del envejecimiento cutáneo en los estratos de la piel (Glougau, 2012).

Los signos más característicos son la formación de arrugas, sequedad, hiperqueratosis, hiperpigmentación, telangiectasias, pérdida de elasticidad de la epidermis y un aspecto tosco e irregular que se ha denominado "curtido por la intemperie".

El término fotoenvejecimiento hace referencia a los cambios visibles y microscópicos que ocurren en la piel como consecuencia de cambios estructurales y funcionales tras una exposición prolongada a este tipo de radiación y afectan a todas las capas y estructuras presentes en ésta. Se debe a la pérdida de capacidad anabólica en la piel y aumento de la catabólica (Branco, 2010).

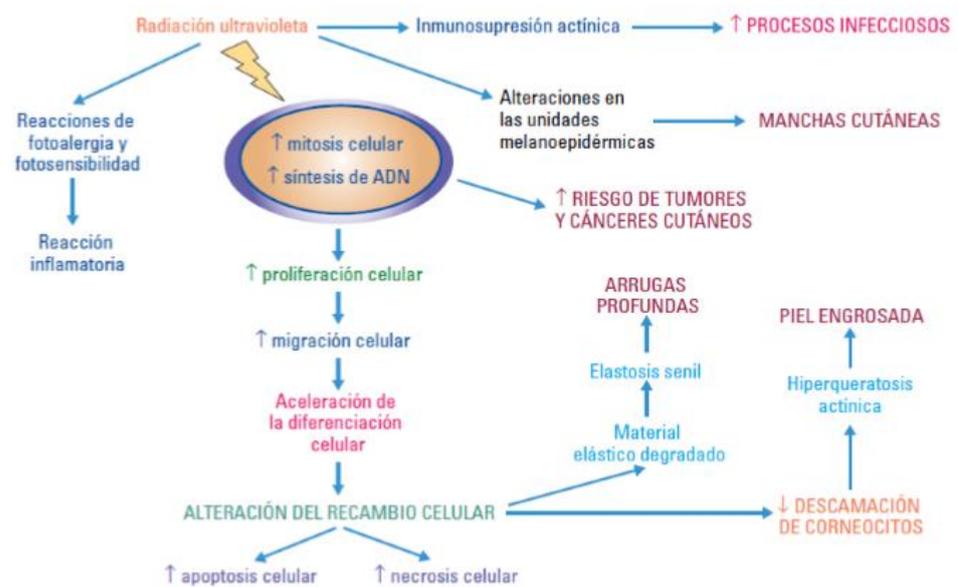


Fig. 15. Mecanismos de fotoenvejecimiento cutáneo (Pons, 2008).

La debilidad del tejido conectivo y los cambios en la microcirculación provocan dilatación permanente de los vasos que se manifiestan en forma de **telangiectasias**.

Además ocurre una destrucción del colágeno mediada por metaloproteasas.

El fenómeno más característico en el fotoenvejecimiento es el de la **elastosis** o acúmulo de elastina en forma de masas. Inicialmente se produce la hiperproducción y el engrosamiento de las fibras que muestra acúmulos desorganizados de elastina finalmente forman masas enrolladas y compactas. Además de un aumento de los glicosaminoglicanos y proteoglicanos y de degradación del colágeno. Esta alteración depende de la síntesis de componentes estructurales dérmicos, y de su degradación mediante las MMP, reguladas por TIMP.

Ocurre disminución en la síntesis de pro-colágeno tipo I y III y ácido hialurónico y aumento de la elastina causados principalmente por el aumento de MMP, endopeptidasas zinc-dependientes, fibroblastos, queratinocitos, macrófagos células endoteliales, mastocitos y eosinófilos como consecuencia de la exposición a UVA (MMP-1, -2, -3, -9) o UVB (MMP1, -3, -9), o a ROS, citoquinas inflamatorias o MAPK.

La propia radiación UV actúa atrayendo a la piel neutrófilos encargados de liberar MMP-86. También se liberan

reguladores de estas MMP, disminuyendo los niveles de TIMP-118 (Cano, 2010).

La degradación de colágeno, elastina y glicosaminoglicanos tiene como consecuencia la formación de **arrugas** (Hachiya, 2009).

Otro síntoma que aparece es oscurecimiento o hiperpigmentación de la zona expuesta por una desigual estimulación de los melanocitos dando lugar a la formación de **pecas y lentigos**.

Además de la piel hay otros órganos que se ven afectados por la exposición al Sol, como es el caso de los ojos que desarrollan patologías agudas en forma de queratitis y conjuntivitis; o incluso patologías crónicas sobre el cristalino y la retina.

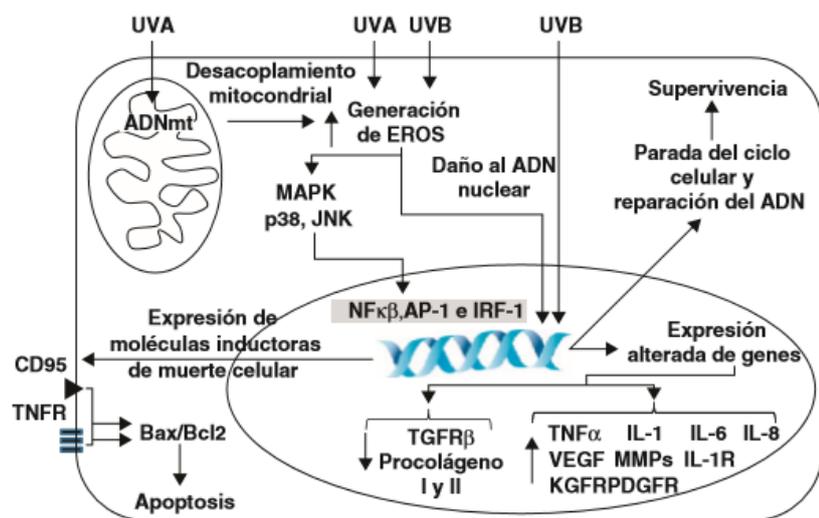


Fig. 16. Mecanismos moleculares de daño molecular por radiación UV (Reyes, 2013).

Malignos o Fotocarcinogénesis: La radiación UVB tiene acción casi directa sobre carcinogénesis, la UVA tiene papel inductor y la IR tendría un efecto promotor (Valdivia, 2002). El desarrollo del cáncer de piel ocurre en tres etapas sucesivas que son la **inducción**, la **promoción** y la **progresión** del tumor. La radiación solar se considera un carcinógeno completo por estar implicado en las dos primeras etapas (Schmitt, 2012).

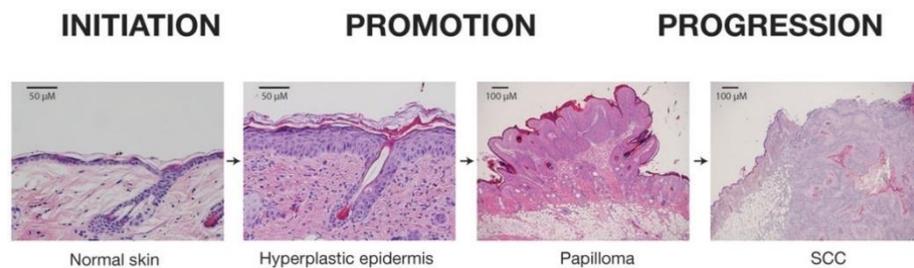


Fig. 17. Fases del desarrollo tumoral en la piel (Abel, 2009).

El primer paso es la **iniciación** de la acción carcinogénica sobre el ADN de una célula causándole mutaciones, posteriormente la célula se replica al menos una vez permitiendo la fijación de la mutación producida. Se trata de un proceso irreversible en el que los queratinocitos normales adquieren la capacidad de formar tumores.

La **promoción** es el paso reversible en el que el clon de células iniciadas se expande formando un papiloma y a continuación ocurre la progresión en la que las células sufren

cambios genéticos que permitirán su transformación de células benignas a malignas (Benavides, 2009).

Los mecanismos de reparación de la piel frente a este daño son: el sistema NER (reparación de la escisión de nucleótidos) cuyos fallos permiten que el ADN dañado se perpetúe.

La radiación UVB produce el cambio de timina en el lugar de la citosina (CT o CC-TT). Estos cambios se consideran marcadores de daño tumoral y están presentes en diferentes neoplasias de la piel (Lodyga, 2015).

Las principales neoplasias de la piel que están consideradas cancerosas o malignas son: carcinoma espinocelular, carcinoma basocelular y melanoma.

-Carcinoma basocelular.

Es el tumor cutáneo maligno más frecuente en la **raza blanca**, más frecuente en personas de ojos azules y piel clara y excepcional en la **raza negra** (Kasper, 2012). Se desarrolla en zonas de la piel donde existen folículos pilosebáceos. No produce metástasis. La principal causa es la exposición a radiación solar, aunque también se encuentran implicadas otras radiaciones y metales pesados como el arsénico. Se presenta como una pápula brillante y perlada con telangiectasias que puede llegar a ulcerarse presentando bordes sobreelevados (Khalesi, 2013).

-Carcinoma escamoso.

Aparecen en zonas expuestas al Sol como cara, cuero cabelludo alopecico, dorso de las manos, escote y piernas. Los agentes etiológicos son los mismos que en el anterior pero estas lesiones aparecen siempre sobre una lesión premaligna existente como queratosis actínica.

La queratosis actínica, corresponde a displasia o carcinomas *in situ* que se manifiestan como lesiones levemente eritematosas cubiertas por escamas, costras o cuernos, que al evolucionar forman nódulos o masas que se ulceran formando costras hemorrágicas y aparecen sobre la piel con daño actínico crónica (Ferrandiz, 2014).

Actualmente se considera una entidad precursora del 65% de los carcinomas de células escamosas y del 36% de todos los carcinomas de células basales (Barrera, 2007; American Cancer Society; 2014).

-Melanoma: El término melanoma procede del griego: «melas», negro y «oma», tumor. Por tanto, se trata de un tumor cutáneo oscuro, debido a la pigmentación de la melanina. Es el tumor maligno de los melanocitos con elevada tendencia a la metastatización (Zaidi, 2008). Existe una regla denominada regla ABCDE para la identificación de posibles melanomas, en las que se hace referencia a la asimetría, bordes, color, diámetro y evolución para prececir la malignización de estas lesiones.

7. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL FOTOENVEJECIMIENTO

A. Historia

Durante la Edad Media y el Renacimiento la palidez de la piel estaba asociado a la belleza de la mujer y a la pertenencia a un alto estamento dentro de la sociedad, hasta el punto de que éstas consumían vinagre para obtener dicho tono en la piel.

Desde 1801, año en que se descubrió la naturaleza de la radiación solar, seguido de la evolución del conocimiento científico moderno acerca de la estructura y funciones de la piel y la su pigmentación en 1840, año en que se desarrolló el microscopio (Holubar, 1998) y hasta los últimos años se han realizado y publicado estudios que ponen de manifiesto el verdadero efecto perjudicial del Sol sobre la salud del organismo humano.

Sin embargo, en las primeras décadas del siglo XX la piel bronceada pasó a considerarse como ideal de cosmética, lo cual llevó a la sociedad, especialmente en mujeres y jóvenes, a realizar exposiciones solares masivas, prescindiendo del empleo de fotoprotectores y en los últimos años al uso cada vez más generalizado de lámparas de bronceado.

No obstante, la comunidad científica no ha dejado de investigar los efectos que estas exposiciones suponen en los

animales y humanos y esto ha llevado a la sociedad a adquirir una mayor concienciación del peligro asociado a éste y a un mayor empleo de sustancias fotoprotectoras (Reyes, 2013).

Además del empleo de protección solar la sociedad demanda sustancias capaces de retrasar el envejecimiento, circunstancia que ha llevado a la ciencia a investigar con compuestos tanto naturales como artificiales con dichas propiedades.

Está ampliamente aceptado que los radicales libres intervienen en el envejecimiento de la piel. Se trata de moléculas altamente reactivas con un número impar de electrones en su orbital externo lo que le confiere capacidad para dañar proteínas, ácidos nucleicos y membranas lipídicas, así como originar inflamación. El organismo los neutraliza liberando sustancias antioxidantes, pero cuando su reserva funcional se agota es necesario un aporte externo, de manera que el consumo de antioxidantes es particularmente eficaz para combatir el efecto de las radiaciones UVA, implicada en múltiples procesos oxidativos (Opländer, 2012).

B. SUSTANCIAS ANTIENVEJECIMIENTO

Por su efecto antieritematígeno y la capacidad para reducir los radicales libres es frecuentemente la adición a los productos cosméticos la **coencima Q10**. También se ha

recurrido al empleo de sustancias con propiedades **antielastasa** y otras sustancias con propiedades **endonucleasa** que reparan los daños en el ADN de la radiación solar sobre las células expuestas.

Sin duda alguna, las **sustancias naturales** con propiedades antienvjecimiento que han sido más empleadas en cosmética y salud son los antioxidantes fenólicos, grupo al que pertenecen la **vitamina E** o tocoferol y sus derivados, así como el ácido úrico.

La principal fuente de vitamina E son los aceites vegetales, cuya aplicación tópica reduce el eritema solar y retrasa el fotoenvjecimiento (Kaur, 2007; Mocchegiani, 2014). Otra vitamina con propiedades similares es la **vitamina A** y sus derivados, que actúan principalmente evitando la sequedad cutánea. La **vitamina C**, afecta a la estructura del colágeno y ha demostrado prevenir el daño causado por la radiación UV al aplicarse de forma tópica (Bhattacharyya, 2009).

Otro grupo de sustancias con propiedades antienvjecimiento es el formado por los **quelantes** como el ácido etilendiamino tetra acético (EDTA) cuya acción consiste en secuestrar iones de los metales hierro y cobre y evitar así su capacidad oxidativa.

Los **carotenoides** son pigmentos rojo-anaranjados que solamente pueden ser sintetizados por plantas, hongos, bacterias y algas, sin embargo muchos animales los incorporan a

través de la dieta. Los más conocidos son el β -caroteno y el licopeno presentes en zanahorias, tomates y pimientos. Los β -carotenos previenen las quemaduras solares mediante la eliminación de radicales libres causados por las radiaciones UVA y el licopeno neutraliza los radicales del óxido nítrico (Lodyga, 2015).

El **té verde** es una importante fuente de polifenoles (40%), capaces de contrarrestar el efecto de los radicales libres) y numerosos estudios confirman que su uso ingerido o por vía tópica (Afaq, 2006) previene la fotocarcinogénesis (Baliga, 2006).

La **granada** es rica en antocianidinas y taninos hidrolizables con efecto antioxidante y antiinflamatorio y el **resveratrol** presente en las semillas y la piel de la uva, nueces, frutas y vino tinto presenta propiedades antiinflamatorias y antiproliferativas. Las **moras**, por su contenido en antocianinas reduce el eritema, edema en la piel e infiltración leucocitaria, reducción de la producción de COX-2, iNOS, prostaglandina 2, Interleukina-6, TNF- α y marcadores de proliferación celular tras su aplicación tópica (Divya, 2015; Shaygannia, 2015).

Las isoflavonas presentes en la **soja**, las poliantocianidinas del **café** o la glicirricina del **regaliz** también presentan actividad antioxidante y quimiopreventivo al ser incorporados en la dieta habitual (Afaq, 2006; Binic, 2013; Millsop, 2013).

C. TRATAMIENTO DEL FOTOENVEJECIMIENTO

Consiste en el tratamiento de las lesiones precancerosas con el fin de prevenir su evolución hacia cáncer cutáneo, es decir, previenen la malignización de estas lesiones no malignas.

El tratamiento es seleccionado en función del tamaño, el tipo y la localización de la lesión, pudiendo ir dirigidos a una lesión de forma **aislada** o aplicarse sobre todo el **campo** en el que se encuentran las lesiones (Haque, 2015).

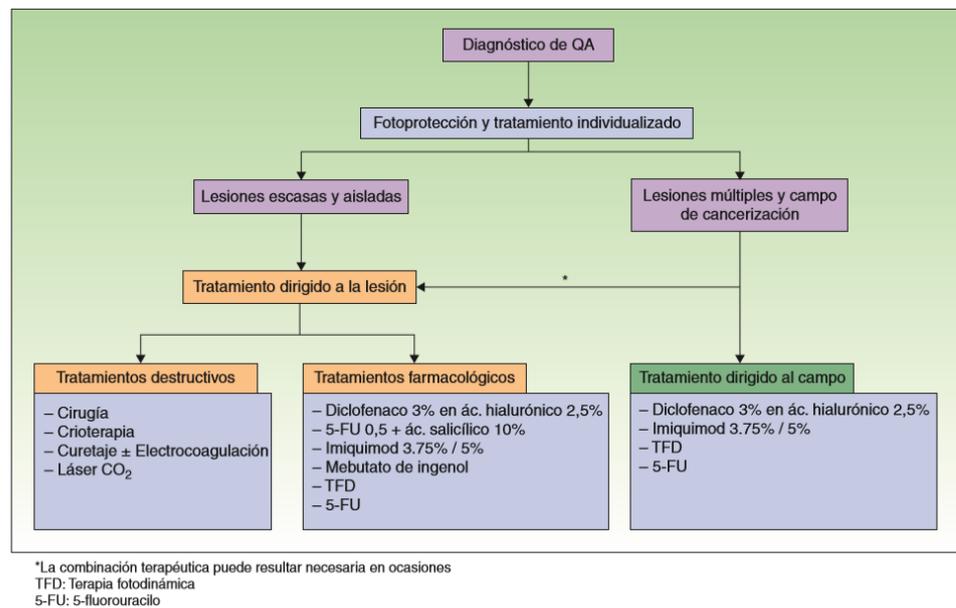


Fig. 18. Algoritmo de tratamiento de queratosis actínica (Ferrandiz, 2014).

- **Crioterapia** mediante la aplicación de spray de nitrógeno líquido (Alomar, 2014; Lebwohl, 2012).

Junto con la escisión quirúrgica constituye los tratamientos ablativos (Ribera, 2013).

- **Terapia fotodinámica.**

Basado en la aplicación de una sustancia fotosensibilizante (5-aminolevulinato tópico en Estados Unidos y metilaminolevulinato en Europa) y la posterior iluminación con luz visible para producir moléculas de oxígeno activado que destruyen selectivamente las células diana. Su principal limitación es el bajo nivel de penetración por lo que sólo se recomienda en lesiones superficiales (Young, 1997; Barrera, 2007; Tierney, 2009; Morton, 2013).

La resistencia y recurrencia de este tipo de tumores hace que sea frecuente la combinación de terapia fotodinámica con otros tratamientos (Lucena, 2015).

- **Retinoides tópicos**, como la alitretinoína (Panretin® Ficha técnica). Son análogos de la vitamina A. Han demostrado tener cierta actividad frente a la queratosis actínica, en cuanto al tratamiento del carcinoma basocelular la evidencia de eficacia es aún insuficiente.

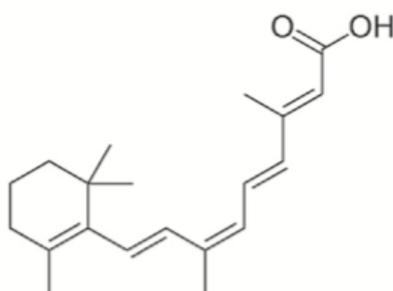


Fig. 19. Estructura química de la molécula de alitretinoína (Haque, 2015).

- **Fluorouracilo** tópico (5-Fu).

Desde su aprobación por la Food and Drug Administration (FDA) en 1970 ha sido considerado el tratamiento de elección de las queratosis actínicas y se emplea además para el tratamiento de la enfermedad de Bowen y el carcinoma basocelular avanzado. Bloquea la síntesis de ADN por medio de la inhibición de la enzima timidilato sintetasa. Se administra dos veces al día durante 2-4 semanas. Presenta como principal inconveniente el desarrollo de una reacción local inflamatoria intensa que en ocasiones provoca el incumplimiento del tratamiento. Inicialmente se comercializó con concentraciones del 1 y 5% y años más tarde se incorporó la de 0,5% para queratosis actínica de cara y cuero cabelludo de aplicación una vez al día lo que la hace más atractiva para el paciente (Yentzer, 2009).

Para el carcinoma basocelular superficial es necesaria la concentración al 5% durante un mínimo de 6 semanas. Este agente para su uso tópico a la concentración de 5% no está autorizado en España.

Recientemente se ha comercializado como 5-Fu 0,5% combinado con ácido salicílico al 10% para favorecer la penetración del fármaco (Ferrandiz, 2014).

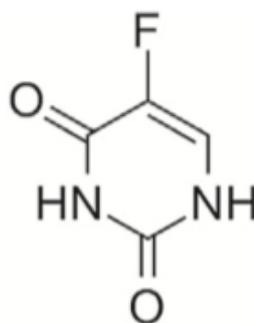


Fig. 20. Estructura química de la molécula 5-fluorouracilo (Haque, 2015).

- **Diclofenaco sódico** tópico. Los primeros estudios con esta molécula proponían su empleo por vía oral (Pentland, 1999), pero posteriormente esta opción fue descartada por la alta incidencia de hemorragia digestiva, optando por su uso de forma tópica. Se encuentra comercializado en forma de gel tópico al 3% en ácido hialurónico al 2,5% para el tratamiento de la queratosis actínica. Es un antiinflamatorio no esteroídico con efecto antitumoral por inhibición de la formación de ácido araquidónico. Se aplica dos veces al día durante un periodo de tiempo relativamente largo, de 60-90 días. Su eficacia global parece ser menor que la de 5-Fluorouracilo, aunque presenta mejor perfil de tolerancia produciendo reacciones locales de una menor intensidad (Solaraze® Ficha técnica).

Tras su comercialización de han descrito casos de aumento de las transaminasas por lo que éstas deben ser

monitorizadas periódicamente durante los tratamientos de larga duración (Costa, 2015).

No existe evidencia en el tratamiento del carcinoma basocelular ni en el carcinoma espinocelular.

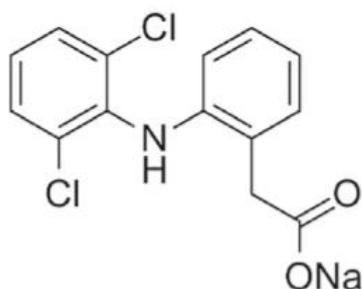


Fig. 21. Estructura química de la molécula de diclofenaco sódico (Haque, 2015).

- **Imiquimod** crema al 5% (Aldara® Ficha técnica). Agonista del *Toll-like receptor-7* (TLR-7). Es un modulador de la respuesta inmune con actividad antivírica y antitumoral que actúa induciendo la liberación local de interferón- α , del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y de otras citoquinas que estimulan la respuesta innata y celular; además de promover la apoptosis de células tumorales.

Autorizado para el carcinoma basocelular superficial y la queratosis actínica no hiperqueratósica ni hipertrófica de cara y cuero cabelludo. Se aplica una vez al día, durante 8 horas, 5 días a la semana en el carcinoma basocelular y 3 veces por semana durante 4 semanas en la queratosis actínica. En esta última

indicación presenta mayor evidencia de eficacia que 5-fluorouracilo.

Recientemente se ha formulado al 3,75% con la ventaja de poder aplicarse en zonas más extensas y presentar mejor tolerancia por parte de los pacientes (Ferrandiz, 2014).

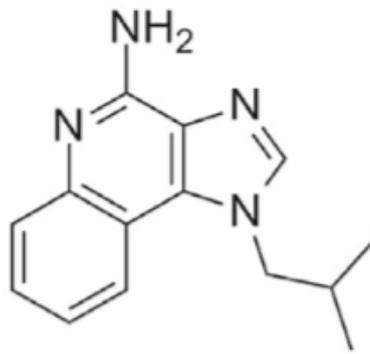


Fig. 22. Estructura química de la molécula de imiquimod (Haque, 2015).

- **Resiquimod** antagonista del TLR 7 y 8. Tiene efectos similares al imiquimod pero además activa células mieloides induciendo mayor secreción de IL-12 y TNF (Gorden, 2005; Ferrandiz, 2014).

- **Colchicina** al 0,5 a 1% (Schmitt, 2012). Presenta eficacia en el tratamiento de múltiples lesiones a la vez con un corto período y sin efectos sistémicos. Sin embargo puede provocar inflamación severa y su uso está limitado a escasa evidencia, sin tener autorización expresa para su empleo en esta indicación (Weinberg, 2007).

- **Pterostilbene.** Se trata de un análogo del resveratrol con mayor vida media y efectos anticancerígenos más potentes que éste por prevenir el daño causado por la radiación UVB (Sinerol, 2015).

- **Ingenol mebutato.**



Fig. 24. Planta *Euphorbia peplus* (Bhandari, 2012).

La savia de la planta de origen australiano *Euphorbia peplus* contiene terpenos macrocíclicos como el ingenol angelato, que ha demostrado eficacia en el tratamiento tópico del cáncer de piel en animales de experimentación con excelentes resultados cosméticos (Ogbourne, 2004) así como el ingenol mebutato.

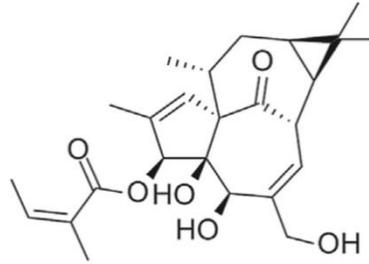


Fig. 23. Estructura química de la molécula de ingenol mebutato (Haque, 2015).

Esta molécula ha sido incluida en un gel para su aplicación tópica y ha sido autorizado en España en noviembre de 2012 para el tratamiento de la queratosis actínica no hiperqueratósica ni hipertrófica en adultos, además existen estudios que demuestran su eficacia en SCC y en la reducción de mutaciones en el gen TP53 de los queratinocitos (Cozzi, 2013).

No se conoce claramente su mecanismo de acción, pero se sabe que afecta a la membrana celular y las mitocondrias de los queratinocitos displásicos produciendo la muerte celular en la lesión e interviene en la promoción de una respuesta inmune innata y adaptativa con reclutamiento de neutrófilos, producción de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias así como la infiltración de células inmunocompetentes; todo ello da lugar al desarrollo de hemorragia y formación de escaras, que se resuelve lo largo de varias semanas (Cozzi, 2012; Picato® Ficha técnica).

Gracias a la glicoproteína-P esta molécula es capaz de atravesar el estrato córneo y ejercer su acción en la dermis e hipodermis directamente así como de manera indirecta mediante la producción local de citoquinas inflamatorias (Costa, 2015).

Su principal ventaja es la duración del tratamiento de 2 días (0,05%) en lesiones sobre el tronco y extremidades o 3 días (0,025%) en lesiones en la cara y cuero cabelludo (Alomar, 2014; Lebwohl, 2012).

A diferencia de otros productos, ingenol mebutato no produce efectos de fotosensibilidad, por lo que puede ser empleado en todas las épocas del año. Como inconveniente, de importancia relativa, es la necesidad de refrigeración durante su conservación (Costa, 2015).

- **Paclitaxel.**



Fig. 25. Planta *Taxus bacatta* (Lesney, 2004).

El Paclitaxel o Taxol® es una sustancia de estructura terpénica producida por semisíntesis química a partir del extracto de la planta *Taxus spp* (*T. bacatta* y *T. brevifolia*) o tejo. Estos extractos comenzaron a emplearse en 1962 y unos años después se descubrió su capacidad citotóxica frente a diversos tumores como los ováricos (1992), mamáricos (1994) (Lesney, 2004) y pulmonares (Weaver, 2014). Actualmente es una de las sustancias con actividad antitumoral con mayor experiencia de uso.

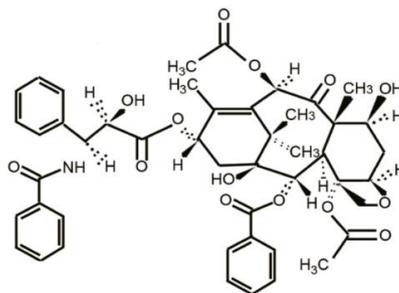


Fig. 26. Estructura química de la molécula de paclitaxel (Zhang, 2014).

Junto con, docetaxel y cabazitaxel (Jevtana®, comercializado en 2011) forma al grupo de los **taxanos**. Por su mecanismo de acción se clasifica como agente antimicrotúbulos al igual que los alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina y vinflunina).

Los microtúbulos son largos polímeros de proteínas formados por heterodímeros de α -tubulina y β -tubulina. La polimerización de los microtúbulos se produce a través de la dinámica de polimerización en la mitosis que implica la hidrólisis de GTP para suministrar energía en el momento que la tubulina, con GTP unido, se añade a los extremos de los microtúbulos. En la mitosis, los cromosomas duplicados de las células se dividen en dos conjuntos idénticos antes de la división en dos células hijas, y la dinámica de la polimerización de los microtúbulos desempeña un papel fundamental en este proceso como parte de la replicación celular. La participación crucial de microtúbulos en la mitosis los convierte en un objetivo para los agentes

antitumorales; en general, estas sustancias son conocidas como agentes antimetabólicos (Gangjee, 2007).

El paclitaxel actúa en la metafase de la mitosis celular, uniéndose a las subunidades de β de tubulina impidiendo su despolimerización e inhibiendo el proceso de división celular clave en la formación de lesiones cancerosas, y provocando la apoptosis mediada por p53.

Además, diversos estudios sugieren que la eficacia de paclitaxel puede ser debida no sólo a su actividad de estabilización de microtúbulos, sino a su capacidad para activar la liberación local de TNF- α de los macrófagos, una citoquina inductora de la apoptosis (Lanni, 1997).

Entre las **indicaciones** autorizadas por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMyPS) se encuentran distintos tipos de cáncer: ovario, mama, pulmón no microcítico avanzado, sarcoma de Kaposi en pacientes con SIDA (Paclitaxel Accord® ficha técnica). Además se emplea en angiosarcoma, tumores de origen desconocido, cáncer de vejiga, testículo, esófago, ovario, de trompas de Falopio, próstata, cérvix, gástrico, cabeza y cuello, linfoma maligno, útero, nasofaríngeo, peritoneal, mieloma múltiple, cáncer pulmón y oligodendrogliomas.

Aunque el tratamiento de las afecciones de la piel no se encuentra entre sus indicaciones, se han notificados casos en los

que paclitaxel intravenoso se ha empleado en el tratamiento de carcinoma de células basales con buena respuesta y tolerancia (Millsop, 2012) y en enfermedades inmunomediadas como la psoriasis (Ehrlich, 2014) para la que existen estudios por **vía tópica** (Kilfoyle, 2012).

Se han realizado estudios con otros agentes quimioterápicos para su aplicación tópica en el tratamiento de **queratosis actínica**, como es el caso de la antraciclina valrubicina. Se trata de una antraciclina con una mayor lipofilia, lo cual permite su formulación para su aplicación tópica (Andersen, 2010). Otro grupo de fármacos como son los inhibidores de la tirosinkinasa, también se han estudiado para la prevención del fotoenvejecimiento en ratones albinos SKH-1 expuestos 3 veces por semana a radiación UVB durante 20 semanas, mostrando acción quimiopreventiva (Uckum, 2010).

En concreto el paclitaxel ha sido formulado de diversas maneras para conseguir una mayor permeación en las distintas capas de la piel sin llegar a provocar un efecto sistémico y evitar así un amplio rango de efectos adversos. Se ha empleado el Cremophor, nanopartículas, liposomas, emulsiones, parches así como jabones (Haque, 2015).

Paclitaxel formulado como **microcoloide (microencapsulado)** o **Ethosomas®** presenta una mejor permeación hacia el estrato córneo (en menor tiempo y mayor

capacidad de acceso a la dermis) con respecto a paclitaxel en otras formulaciones ya que el paclitaxel presenta una elevada lipofilia que hace que quede retenido en el estrato córneo y no penetre a capas más profundas de la piel. Una diferencia fundamental en esta formulación de paclitaxel como Ethosomas® es la elaboración utilizando etanol que permite una distribución más homogénea de paclitaxel en compartimentos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos (Paolino, 2012).

La formulación de paclitaxel en **tirosferas** permite controlar la sobreproliferación de queratinocitos, controlar la dosis liberada de paclitaxel y facilitar su entrada en la **dermis** frente a otros estratos, minimizando así la exposición sistémica y los efectos adversos asociados (Kilfoyle, 2012). Tan importante como la encapsulación para permitir la entrada del principio activo al lugar de acción es la capacidad para liberarlo una vez que éste ha sido alcanzado, dicha capacidad ha sido posible en este modelo gracias a la degradación del polímero y la disociación de las partículas que lo forman (Kilfoyle, 2012).

GantrezES es un copolímero de metil vinil éter y un derivado de ácido maleico con capacidad adhesiva que permite una fuerte interacción y el contacto prolongado con la piel que aumentan la biodisponibilidad del fármaco (Bionanoplus, 2016). Presenta variedad de aplicaciones farmacéuticas como adhesivos para dentaduras postizas, espesante y agentes de

suspensión, como adyuvantes para la preparación de parches transdérmicos y como agentes de recubrimiento de película (Abello, 1990). Tras su aplicación forma una película transparente y pegajosa con gran resistencia a la humedad. La formulación de paclitaxel junto con este polímero proporciona al fármaco una mayor permeación transdérmica a través de los folículos pilosos y la difusión por la membrana del compuesto libre (Mpharm, 2014) pero no se comporta como mero excipiente ya que ha demostrado capacidad para estimular el sistema inmune (Ferrer, 2012).

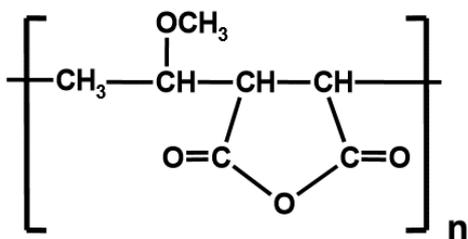


Fig. 27. Estructura química de la molécula de Gantrez (Irache, 2005).

IV. OBJETIVOS

1º Establecer un modelo de fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis cutáneos en ratones SKH-1 mediante la exposición crónica a Radiación Ultravioleta.

2º Estudiar los efectos de la administración tópica de ingenol mebutato y un taxano, paclitaxel, en diferentes formulaciones, sobre las lesiones cutáneas desarrolladas.

3º Determinar el comportamiento biológico y la capacidad de invasión de los tumores desarrollados mediante técnicas inmunohistoquímicas.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

A. Animales

Hemos utilizado 72 ratones SKH-1, eutímicos, inmunocompetentes, hembras de 4 semanas de edad y un peso medio de 19 gramos, al principio del experimento. Procedían del laboratorio Charles River, Nueva York y fueron aclimatados en el Servicio de Animales de Laboratorio (SAI, nº REGAES 300305440012) de la Universidad de Murcia.

Los ratones se distribuyeron en seis grupos:

- **Grupo I** Control (n=12): expuestos a radiación RUV + observación.
- **Grupo II** (n=12): RUV + ingenol mebutato 3 días.
- **Grupo III** (n=12): RUV + paclitaxel 1% (p/p) con 5% GES tópico 3 semanas.
- **Grupo IV** (n=12): RUV + paclitaxel 1% (p/p) con 5% GES tópico 6 semanas.
- **Grupo V** (n=12): RUV + paclitaxel 1% (p/p) con 1,2% GES tópico 3 semanas.
- **Grupo VI** (n=12): RUV+ paclitaxel 1% (p/p) con 1,2% GES tópico 6 semanas.

B. Lámpara

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



Fig. 28. Detalle de la los 8 tubos de la lámpara.

Ésta se conectó a un dispositivo para el control del tiempo de exposición.



Fig. 29. Lámpara de irradiación con jaulas de PVC y temporizador.

C. Ingenol mebutato

Gel de ingenol mebutato (Picato®) de 150mg/g para uso cutáneo. Laboratorio LEO Pharma, Barcelona.



Fig. 30. Ingenol mebutato.

D. Paclitaxel

Se emplearon dos formulaciones del taxano objeto de estudio que fueron:

- Paclitaxel 1% (p/p) con 5% GantreES (GES), envase de 50g.

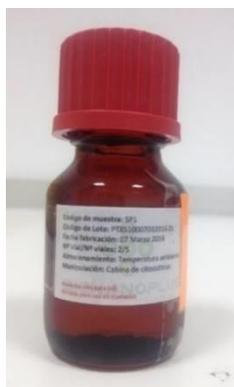


Fig. 31. Paclitaxel 1% (p/p) con 5% GES.

- Paclitaxel 1% (p/p) con 1,2% GES (GES), envases de 3ml.



Fig. 32. Paclitaxel al 1% p/p con 1,2% GES.

Ambos compuestos fueron fabricados por BIONANOPLUS (Navarra, España) y suministrados por el Laboratorio Spherium Biomed (Barcelona, España).

2. MÉTODOS

A. Procedimiento experimental

Tras la llegada de los ratones a las instalaciones de estableció un **período de acomodación** de siete días antes del inicio del experimento, en el que los ratones fueron sometidos a las condiciones experimentales.

Cada grupo de 12 animales fueron mantenidos en jaulas de metacrilato transparente de 40x30 cm, con cubierta metálica de rejillas y con espacio para alimento y agua. Éstas se ubicaron en una sala con foto-periodo-luz-oscuridad de 12-12 horas, una temperatura media de 20-24°C y humedad relativa de 40-70%, con aporte de comida y bebida "ad libitum".



Fig. 33. Jaulas de mantenimiento de los ratones.

Fueron tratados según las normas de la Unión Europea sobre la protección de animales utilizados en experimentación Directiva 2010/ 63/ UE, así como el Real Decreto 53/2013 del 1 de febrero de 2013, España. Asimismo, el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia aprobó todos los experimentos.

El **período de irradiación** consistió en la irradiación UV 4 veces por semana (lunes, martes, jueves y viernes), durante un total de 65 sesiones. Para ello, se situaba a los animales en jaulas de PVC con separadores individuales para cada ratón y una cubierta de celosía metálica y se colocaban bajo la lámpara de luz ultravioleta a una distancia foco/piel de 20 cm y ésta se conectó con un dispositivo de control automático del tiempo de irradiación, fijado en 60 minutos. La distribución de los animales en cada receptáculo fue rotando con el fin de obtener una exposición uniforme a todos ellos.



Fig. 34. Jaula para la irradiación con cubierta de celosía metálica.

La energía recibida por sesión fue de 21,1 J/cm², por lo que al final de las 65 sesiones, la energía total absorbida por cada animal fue de 1.371,5 J/cm².

A continuación comenzó el **período de tratamiento** en el que el grupo I (Control) se mantuvo un mes sin tratamiento y bajo las condiciones experimentales. A los ratones de grupo II se les aplicó ingenol mebutato por vía tópica sobre la piel del lomo y la cabeza durante 3 días consecutivos.

Las distintas formulaciones de paclitaxel se administraron de forma tópica usando un pincel sobre la misma zona de los animales correspondientes a los grupos III-VI tras el periodo de irradiación durante 3 (grupos II y V) ó 6 semanas (grupos IV y VI).

El **período de mantenimiento** comenzó al finalizar cada tratamiento y consistió en un mes en el que los ratones se mantuvieron bajo las condiciones experimentales sin someter a ninguna intervención adicional.

Los animales fueron **revisados clínico-macroscópicamente** a diario antes y después de cada sesión de irradiación y tratamiento y semanalmente durante el periodo de mantenimiento.

Se estableció un protocolo de vigilancia y punto para detectar animales que tuvieran que ser sacrificados antes de finalizar el experimento basado en la *Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research* (Workman, 2010),

mediante el que se descartaba la presencia de signos de malestar animal mediante el análisis de la respuesta al manejo, el comportamiento, la apariencia y signos clínicos como el sangrado.

Una vez transcurrido un mes desde la finalización del tratamiento de cada grupo, los ratones fueron sometidos a **eutanasia** mediante la sobrecarga progresiva de inhalación de CO₂ en una cámara de eutanasia experimental.

A continuación se les realizó la **necropsia** de la piel del lomo con inmersión en formol neutro tamponado al 10%, al menos durante 48 horas.

Los animales que murieron en el transcurso del experimento fueron excluidos del estudio.

B. Estudio clínico

A las 0, 30, 50 y 65 sesiones de irradiación, se realizaron fotografías de la piel del dorso expuesta a las radiaciones y posteriormente con periodicidad semanal hasta el final del experimento.

Las principales lesiones observadas en cada grupo se anotaron en una tabla que recogía el **tiempo de aparición** de: eritema difuso pasajero, eritema permanente-telangiectásias, patrón geométrico y arrugas cutáneas, engrosamiento irregular,

lesiones eritematosas-escamosas, lesiones queratósicas-nodulares, lesiones tumorales y lesiones ulceradas.

- **Las áreas medias de lesión por grupos en cada etapa.**

Las fotografías digitales se realizaron con la cámara fotográfica digital Canon EOS 500D junto a papel milimetrado para medir el tamaño de las lesiones, según el procedimiento de Feng (2006).

Para la realización del proceso de pesada y fotografiado, cada animal fue anestesiado mediante la inhalación de isofluorano 1.00mg/g.

Las fotografías tomadas al final del período de irradiación, tras el tratamiento y al finalizar el estudio fueron medidas individualmente mediante el software de procesamiento y análisis de imagen *Image J* para obtener el área afectada por las lesiones.

Para ello primero se realizó un calibrado del programa con el papel milimetrado que acompañaba al ratón en cada fotografía y a continuación se marcaron los puntos del perímetro de las áreas de cada ratón obteniéndose la medida en centímetros cuadrados del área afectada.

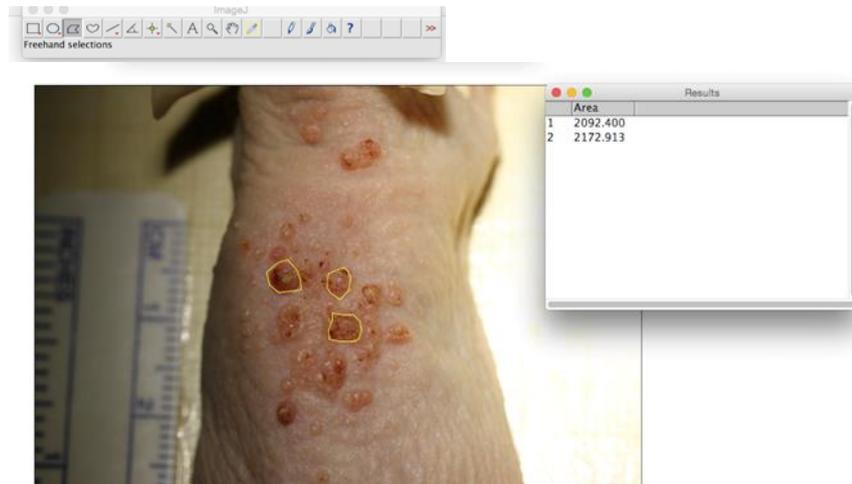


Fig. 36. Calibrado y medida del área de lesión

Tras el cálculo de las áreas de lesión macroscópica, determinamos tres variables en cada uno de los grupos experimentales en función de la **evolución las áreas de lesión** obtenidas:

Área de lesión desarrollada tras la irradiación.

Se consideraban como: mínima, media o máxima. Para la valoración de esta variable se determinó que la superficie total del lomo suponía en torno a 10 cm² (100%), y se comparó con esta área el área de afectación de cada ratón; así se clasificaron como:

- **mínima:** lesiones que ocupan menos de 1/3 ó 3,3cm² de la superficie del lomo.
- **media:** entre 1/3 y 2/3 ó 3,3 y 6,6 cm²
- **máxima:** más de 2/3 o más de 6,6 cm² o aquellas lesiones de aspecto neoplásico.

Porcentaje de **remisión de las lesiones tras el tratamiento** aplicado, al compararlo con la medida en la etapa anterior (al final de la irradiación). Clasificándose de la siguiente manera:

- **remisión del 100%**
- **remisión del 75%**
- **remisión del 50%**
- **no remisión.**

Estado de las lesiones al final del experimento. El área de lesión de cada animal se midió y se comparó con el área al final de la etapa anterior y los resultados se clasificaron como:

- **no lesión**
- **lesión remanente sin crecimiento**
- **lesión remanente con crecimiento.**

C. Estudio microscópico

Tras un período de fijación de las pieles de 48 horas en formol neutro tamponado al 10%, se tomó una muestra de la lesión principal de la piel de cada ratón y se incluyeron en parafina.

De los bloques de parafina se realizaron secciones histológicas de 3 μm de grosor que fueron teñidas con Hematoxilina-eosina (H&E, Panreac) y Ver-Hoeff (Dako) que tiñe específicamente las fibras elásticas de la dermis.



Fig. 37. Incluidor automático Dia Path.

El estudio microscópico fue realizado con el microscopio Leica DM, mediante la observación realizado por tres observadores de las secciones histológicas de las lesiones de cada animal que recopilaron un listado de la **lesión de máximo grado de malignidad** observada en cada muestra.



Fig. 38. Microscopio Leica DM.

D. Estudio inmunohistoquímico

El estudio inmunohistoquímico se realizó en colaboración con el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario Reina Sofía de Murcia.

Realizamos el estudio inmunohistoquímico de la lesión principal de la piel de los animales de los grupos I (Control), II (Ingenol mebutato) y V (Paclitaxel con 1,2% GES 3 semanas).

Después de desparafinar y bloquear la peroxidasa endógena con agua oxigenada al 3% durante 30 minutos, se desenmascaró el antígeno de las muestras con tampón citrato (Panreac) a pH=6 en microondas a potencia 1 durante 10 minutos, y se dejaron enfriar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después se lavaron con PBS y se incubaron los tejidos con suero normal de cabra (Milipore) al 10% durante 1 hora a Tª ambiente. Después se incubaron las secciones con el anticuerpo primario monoclonal contra PCNA, Metaloproteinasa-9 e Inhibidor de Metaloproteinasas TIMP-1 (Dako) a dilución 1:2000 durante toda la noche a 4°C. Entonces, se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario Goat anti-mouse biotinado (Dako) durante 1 hora a Tª ambiente, y finalmente se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Cultek) a dilución 1:1000 durante 1 hora más a Tª ambiente. El revelado de la inmunotinción se hizo con

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

Posteriormente procedimos a la cuantificación semicuantitativa de la expresión de cada anticuerpo, realizada por dos patólogos experimentados, cegados a los resultados del estudio. Se valoró de una a tres cruces la intensidad del marcaje observada en cada campo de estudio, que fueron tres en cada muestra, con una magnificación de 10x. El marcaje leve se valoró con una cruz (+), el moderado con dos (++) y el severo con tres (+++).

E. Estudio estadístico

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

Con respecto al **área de lesión** se determinó el área total, el área **media**, y su **desviación estándar** de cada grupo de animales en cada uno de las tres etapas del experimento (exposición, tratamiento y post-exposición).

De estas medidas se realizó, en cada etapa, el **análisis de la varianza de medidas repetidas (ANOVA)** de las áreas medias de lesión de cada grupo y **comparaciones múltiples por pares**,

obteniendo el error típico, el intervalo de confianza al 95% y la significación estadística de la diferencia entre los grupos comparados.

La presencia cada tipo de **lesión microscópica** en cada grupo y el resultado de la **inmunohistoquímica** se expresó como porcentaje de cada caso.

Considerándose estadísticamente significativos los valores de p inferiores o iguales a 0,05.

VI. RESULTADOS

ANIMALES SANOS

A. ESTUDIO CLINICO-MACROSCÓPICO

Clínicamente la piel de los ratones SKH-1 es rugosa, rugosidad que aumenta progresivamente con la edad. El pelo se desarrolla de modo normal, y cubre toda la superficie y a partir de la segunda semana de vida se produce la pérdida del pelo de manera rápida y completa, que se inicia en los párpados y continua progresivamente en sentido caudal, de modo que a las tres semanas de vida los animales se quedan sin pelo, exceptuando la persistencia de algunas vibrisas o pelos blancos y largos. Las uñas son largas y retorcidas.



Fig. 39. Piel a la primera semana de nacer en las que aún conserva el pelo.

B. ESTUDIO MICROSCÓPICO

Microscópicamente la epidermis es similar en espesor en los dos sexos, pero en los machos la dermis es más gruesa y la hipodermis más delgada. La epidermis está constituida por 3 a 5 capas de queratinocitos de morfología poligonal en las capas más profundas de la epidermis y se van aplanando en las capas más superficiales. El estrato córneo consta de 2-3 capas de corneocitos aplanados y cornificados. En la dermis se aprecian numerosos folículos pilosos generalmente atróficos y dilatados.

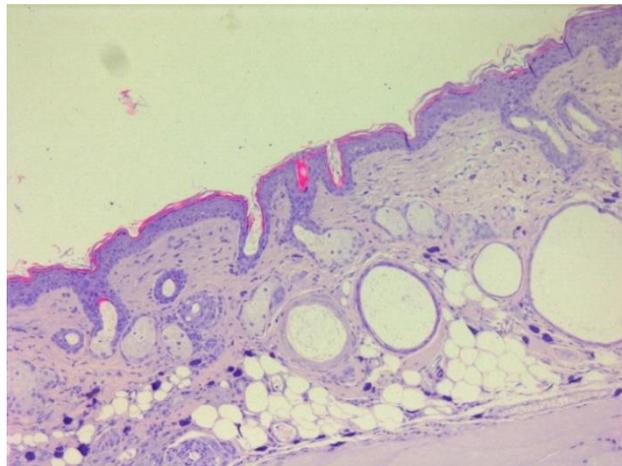


Fig. 40. Zona de piel sana. (H.E. 125x.)

I. GRUPO CONTROL

A. ESTUDIO CLINICO-MACROSCÓPICO

Durante la realización del experimento todos los animales, tras su exposición a la radiación presentaron una amplia gama de lesiones, con una evolución diferente en cuanto al tamaño y extensión, severidad y evolución que, en general estaban relacionadas con la radiación acumulada y el tratamiento al que eran sometidos.

Las principales lesiones desarrolladas consistieron en:

- 1. Eritema:** correspondía a las primeras modificaciones que presentaban todos los animales al ser expuestos a las radiaciones. Estaba caracterizado por la presencia de **enrojecimiento cutáneo** en las zonas de menor distancia con el foco de irradiación, como la zona central del lomo, el cuello, la cabeza y las orejas. Se presentaba desde la primera sesión de irradiación, siendo difuso y pasajero pues desaparecía generalmente durante las primeras sesiones al cabo de 30 a 60 minutos de exposición. Transcurridas 30 sesiones se hacía permanente, pasando a una tonalidad más violácea y con aspecto **telangiectásico**.



Fig. 41. Eritema de carácter permanente sobre la superficie de piel expuesta.

2. **Patón geométrico y aspecto reticular cutáneo:** se observaba un marcado patrón geométrico con aspecto reticular de la piel, fundamentalmente a partir de 30 sesiones de irradiación, que se hacía más patente conforme aumentaba el número de sesiones.



Fig. 42. Patrón geométrico sobre la superficie del lomo.

3. **Arrugas cutáneas:** las **arrugas longitudinales** se presentaban asimismo, a partir de 30 sesiones de irradiación extendiéndose a lo largo de todo el dorso de los ratones. Durante la evolución del experimento

solían acompañar a los fenómenos de laxitud y pérdida de elasticidad de la piel lesionada, presentándose también en forma **radial** alrededor de las lesiones eritematosas y de las ulceradas.

4. **Engrosamiento cutáneo irregular:** aparecía transcurridas 50 sesiones de irradiación, presentaba un **aspecto granular difuso** y una distribución variable por todo el dorso cutáneo que puntualmente se acompañaba de lesiones de aspecto queratósico localizadas.
5. **Lesiones escamosas:** eran muy frecuentes hacia la 50 sesión de irradiación. Se localizaban sobre las lesiones anteriores, en áreas de aspecto eritemato-escamoso de entre 1x1 mm y 3x3mm que aumentaban progresivamente de volumen a **placas** irregulares, así como la presencia de zonas erosionadas.



Fig. 43. Numerosas lesiones papulosas y micronodulares que confluyen formando placas.

6. Lesiones nodulares: a partir de la sesión 50 toda la superficie expuesta a la radiación experimentaba engrosamiento cutáneo y comenzaban a aparecer lesiones nodulares sobre la piel en la que también se observaban arrugas cada vez más marcadas. Inicialmente eran de pequeño tamaño y se presentaban de forma aislada y dispersa. Conforme avanzaba el número de sesiones de irradiación crecían en número y tamaño.



Fig. 44. Lesiones nodulares múltiples.

Estas lesiones crecían hacia el exterior formando **lesiones vegetantes** que, al aumentar de tamaño se acompañaban de **ulceración** en la zona central, dando lugar a depresiones de aspecto **crateriforme-cornificadas**.

7. Lesiones ulceradas: se presentaban una vez finalizado el período de irradiación, aunque la mayoría se desarrollaba al final del experimento, como grandes áreas ulceradas sobre las zonas eritematosas, que estaban generalmente recubiertas de **costras fibrino-necróticas** y mostraban consistencia firme y con frecuencia estaban fijadas a planos profundos.



Fig. 45. Lesiones de tipo tumoral infiltrada de 5x7mm y superficie ulcerada.

Dado que observamos una gran variedad respecto al tamaño de las lesiones entre animales del mismo grupo, para el estudio de la evolución de las lesiones, utilizamos como medida de referencia el **área media** de afectación, en lugar del área total en cada grupo.

Tras la última sesión de irradiación el área media de las lesiones fue de 1,13 cm².

Asimismo las lesiones eran de extensión mínima en un 91% de los ratones; y media en el 9% restante.



Fig. 46. Lesiones de extensión mínima.

Al cabo de 10 días tras el final de la irradiación se observaban fundamentalmente lesiones tumorales y ulceradas.

Transcurrido un mes desde la última sesión de irradiación, período en el que este grupo no se sometió a ningún tipo de tratamiento, el área media de las lesiones era de 1,03 cm².

El 23% de los ratones mostró remisión del 50% de las lesiones y el 77% restante no mostró remisión. (Tabla N° 13).



Fig. 47. Lesiones de extensión media con pápulas y nódulos de mayor tamaño.

Después de 2 meses de observación sin tratamiento el área media de lesión fue de 1,71 cm².

El 100% de las lesiones mostraba crecimiento con respecto a la etapa anterior.

B. ESTUDIO MICROSCÓPICO

Las principales alteraciones desarrolladas fueron:

1. Hiperqueratosis: Caracterizada por aumento del **grosor** del estrato córneo que está formado por varias hileras de células queratinizadas y anucleadas dispuestas densamente formando un patrón en hojaldre; se acompañaba de **hipergranulosis** con numerosos **gránulos de queratohialina** en el citoplasma de los queratinocitos, que está caracterizada por el aumento de grosor del estrato granuloso.

Con menos frecuencia se observaba **paraqueratosis**, caracterizada por la presencia de núcleos en las células del estrato epidérmico más superficial que estaban totalmente queratinizadas (estrato córneo). También observamos en la zona **disqueratosis**, caracterizada por la queratinización de forma individualizada de los queratinocitos, preferentemente a nivel del estrato espinoso de Malpighio.

2. Hiperplasia: Estaban constituidas por varias hileras (entre 3 y 10) de queratinocitos basales de morfología poligonal. Los citoplasmas eran escasos y los núcleos voluminosos con los ejes mayores perpendiculares a la

membrana basal epidérmica. Mostraban nucleolos muy patentes y en ocasiones se observaban algunas figuras de mitosis. Se observaba de forma frecuente tanto de manera aislada como en las proximidades de **las lesiones neoplásicas.**

No obstante, las alteraciones más frecuentemente correspondían a engrosamiento irregular de la epidermis, con mayor o menor grado de papilomatosis. Esta acantosis era el fenómeno que caracterizaba a la mayor parte de la piel de las áreas más expuestas a la radiación (lomo, dorso de la cabeza y cuello, etc.) y mostraba gran heterogeneidad, pues alternaban las áreas de un gran espesor (15 a 20 capas celulares) con otras no tan engrosadas, que solían acompañarse de frecuente pleomorfismo celular y nuclear

En el grupo control el 100% de los ratones mostró presencia de hiperplasia epitelial.

- 3. Displasia:** Estas lesiones se encontraban, con frecuencia, tanto de forma aislada como junto a los fenómenos descritos previamente, así como en la vecindad de las lesiones neoplásicas malignas.

En estas áreas predominaban las alteraciones de la polaridad celular, así como el intenso pleomorfismo

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

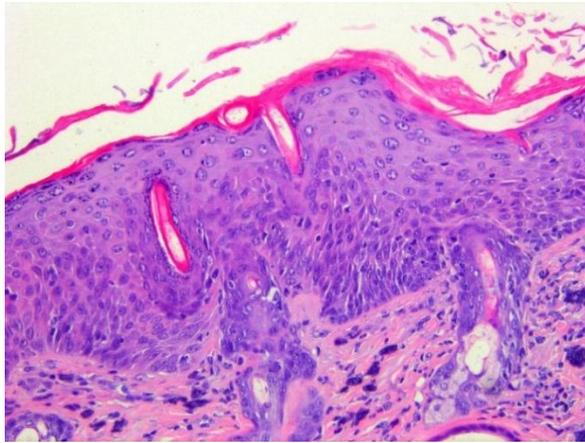


Fig. 48. Hiperplasia y displasia leve. (H.E. 200x.)

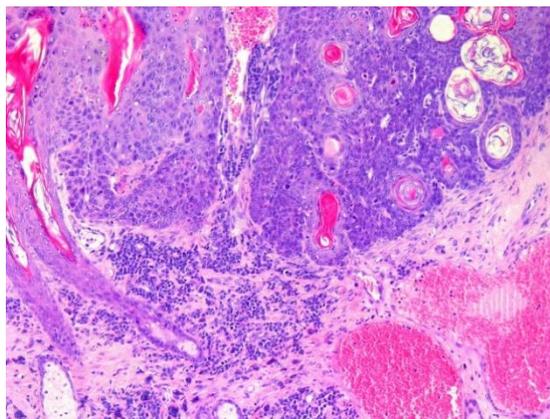
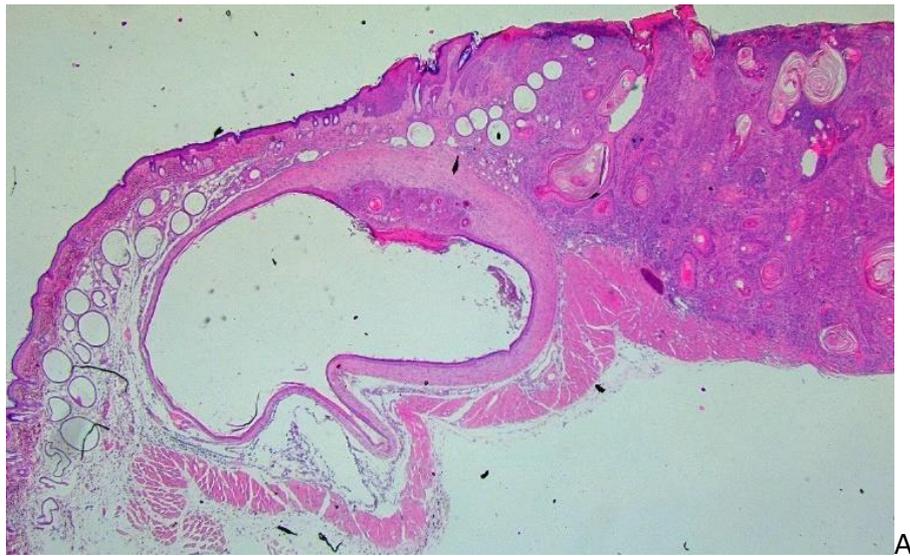
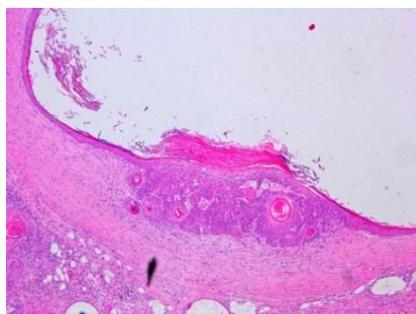


Fig. 19. Displasia grave. (H.E. 312,5x.)

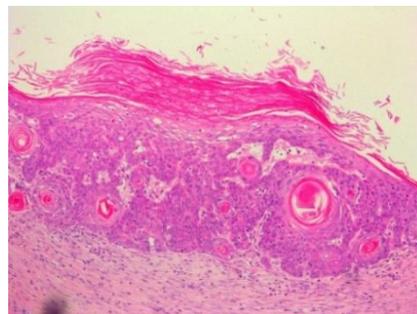
Además, en el 7,7% de los animales del grupo se observó la presencia de **carcinoma *in situ***. Se caracterizaba por la atipia de queratinocitos que afectaba a todo el espesor de la epidermis, y se disponían de forma irregular lo que hace imposible distinguir el estrato basal, el estrato espinoso y el córneo aunque se **mantenía intacta la membrana basal**. Sus núcleos presentaban figuras mitóticas aberrantes y mitosis superficiales.



A



B



C

Fig. 50. A: Carcinoma *in situ* en un quiste epidérmico. B y C: Detalle de carcinoma *in situ*. (H.E. 125x, 200x y 212,5x.).

Con frecuencia no se observaban **carcinomas microinvasores**, que habitualmente se caracterizan por la presencia de cordones epiteliales irregulares con marcadas atipias celulares que infiltran a través de la membrana basal hasta la dermis papilar. En éstos es frecuente observar pequeños focos epiteliales aislados, de características morfológicas atípicas, así como infiltrados periféricos y parcheados de linfocitos y células plasmáticas.

- 4. Carcinoma de células escamosas:** El 92,3% de los animales en el grupo control mostró presencia de carcinomas de células escamosas, que consistían en nidos o cordones de células epiteliales escamosas que surgían de la epidermis expendiéndose por la **dermis** hasta una distancia variable. Con frecuencia la invasión dérmica estaba localizada en la dermis papilar, y con menor frecuencia se extendía de forma irregular hacia la dermis reticular subyacente. Las células eran poligonales, con núcleos voluminosos y moderado pleomorfismo celular y nuclear. Los núcleos eran, en general, muy voluminosos, con uno o varios nucléolos grandes e hipercromáticos.

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

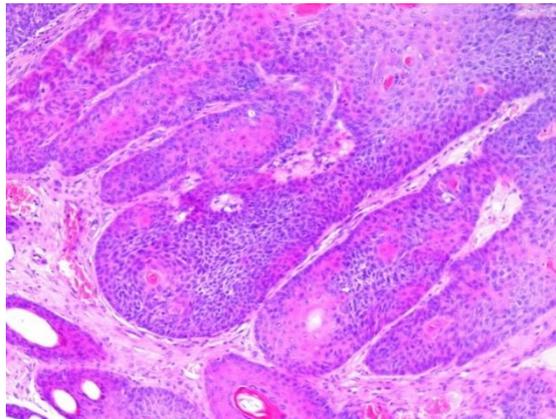


Fig. 51. Carcinoma escamoso. Detalle de los cordones de células escamosas con frecuente disqueratosis y pequeños globos córneos. (H.E. 200x.)

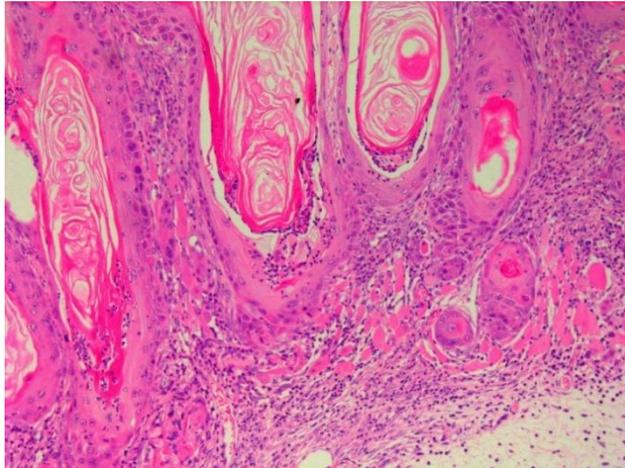


Fig. 52. Carcinoma espinocelular invasor con reacción inflamatoria interna. (H.E. 200x.)

Las células neoplásicas mostraban abundante **citoplasma eosinófilo** y formación de **globos córneos voluminosos**.

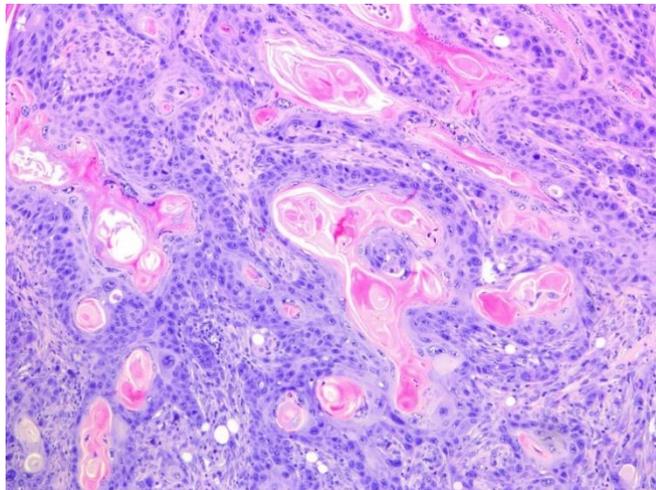


Fig. 53. Carcinoma espinocelular. Detalle de la queratinización (globos córneos). (H.E. 340x.)

Estos carcinomas mostraban extensa **infiltración de la dermis** y en uno se extendía afectando al **músculo** adyacente. En ocasiones se infiltraba a lo largo de las **vainas nerviosas, vasos sanguíneos o linfáticos**.

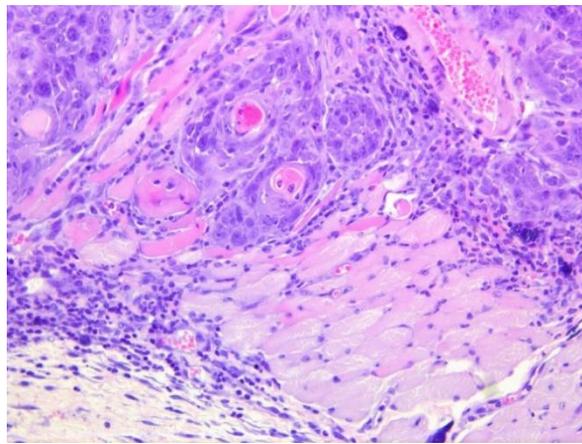


Fig. 54. Carcinoma con invasión muscular.
(H.E. 360x.)

La mayoría de los carcinomas de células escamosas mostraban en su periferia zonas de **displasia**.

5. **Elastosis dérmica:** se observaban fenómenos de desorganización de la estructura, así como la degradación de las fibras de colágeno y elastina **como resultado de la inflamación crónica** provocaba acúmulo de material amorfo en la dermis.

Esta desorganización ocurría según tres patrones o grados: el **grado I** con predominio de fibras desorganizadas y dispuestas individualmente, el **grado II** en el que estas fibras alteradas se alternaban con acúmulos irregulares y compactos de elastina, ligeramente basófilos y el **grado III** con marcado predominio de los acúmulos compactos de elastina.

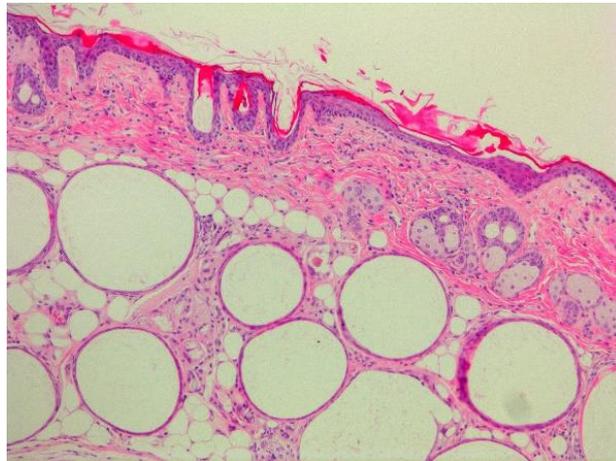


Fig. 55. Elastosis dérmica. (H.E. 125x.)

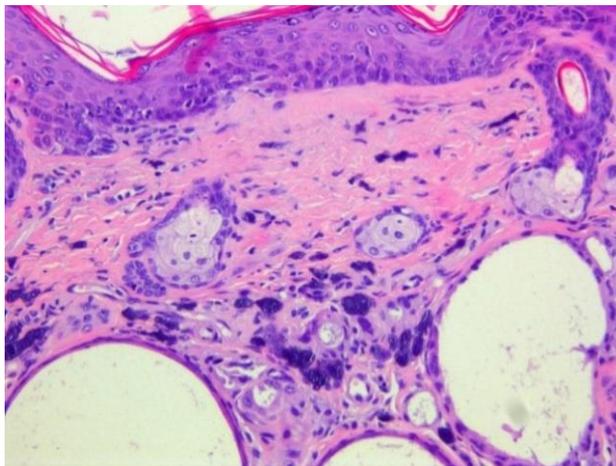


Fig. 56. Detalle de elastosis. (H.E- 200x)

GRUPOS TRATADOS

II. GRUPO INGENOL MEBUTATO 3 DÍAS

A. ESTUDIO CLINICO-MACROSCÓPICO

Alrededor de las **30 sesiones** de irradiación el **eritema**, que inicialmente era pasajero, persistía una vez finalizada la irradiación y pasaba a una tonalidad violácea.



Fig. 57. Eritema permanente.

Las **arrugas cutáneas** observadas al cabo de 30 sesiones se extendían por toda la superficie de los animales mostrando un marcado **patrón geométrico**, con presencia de **arrugas longitudinales** que se extendían por toda la superficie cutánea y **a partir de la sesión 50** se apreciaba **engrosamiento irregular**.



Fig. 58. Arrugas con patrón geométrico.

Al finalizar el período de irradiación, tras 65 sesiones, el área media de lesión fue de $0,44 \text{ cm}^2$, siendo en todos los casos de extensión mínima.

Los ratones mostraban una piel engrosada y marcadamente **arrugada** con pequeñas **lesiones de tipo eritemato-escamosas** así como **lesiones nodulares**.



Fig. 59. Pequeñas lesiones papulares y nodulares.

Los ratones de este grupo fueron **tratados durante 3 días consecutivos** con el fármaco ingenol mebutato. Tras el tratamiento el área de lesión era de $2,18 \text{ cm}^2$, presentando

diferencias estadísticamente significativa con respecto al área medida del grupo control.

En esta etapa el 100% de los ratones no mostraba remisión de las lesiones.

La piel presentaba **lesiones escamosas** con costras amarillentas, así como otras **lesiones de tipo tumorales y ulceradas**.



Fig. 60. Erosión de la piel tras el tratamiento con ingenol mebutato.

Tras 10 días desde el final de la irradiación se desarrollaban lesiones tumorales y de superficie ulcerada.

Transcurrido un mes sin tratamiento el área de lesión era de 0,41 cm², mostrando diferencias estadísticamente significativas con el grupo control, con una reducción del área media de las lesiones del 100% con respecto al área en la etapa previa.



Fig. 61. Superficie del lomo cubierta de lesiones tumorales vegetantes.



Fig. 62. Quiste sobre el que se desarrolla una lesión nodular.

B. ESTUDIO MICROSCÓPICO

Destacaba la presencia de **hiperplasia epidérmica** de manera generalizada y zonas de **piel displásica** en todos los animales del grupo.

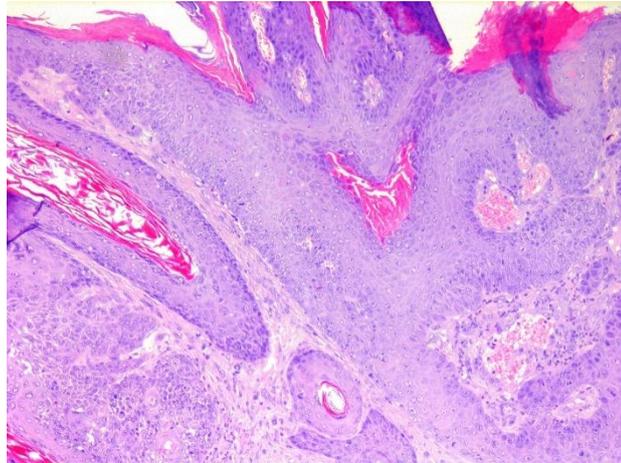


Fig. 63. Detalle de áreas de displasia (H.E. 200x.)

El **8,3%** de los animales desarrolló **carcinomas *in situ***, en los que se apreciaba la membrana basal intacta y cuya superficie aparecía cubierta por numerosas capas de queratina y **el 16,7%** presentó **carcinomas microinvasores**.

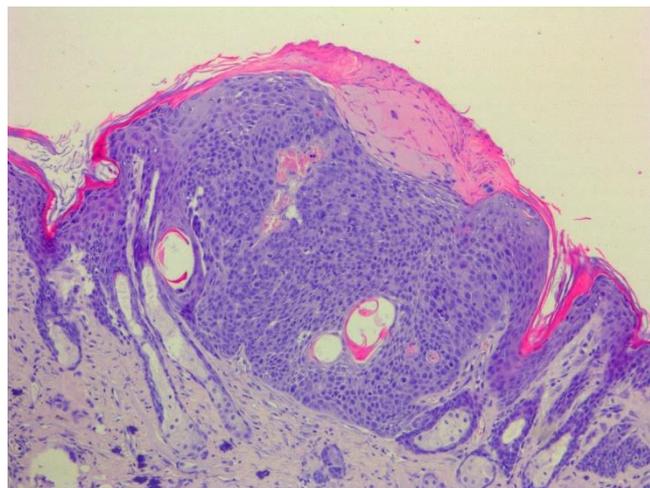


Fig. 64. Carcinoma *in situ*. (H.E. 200x.)

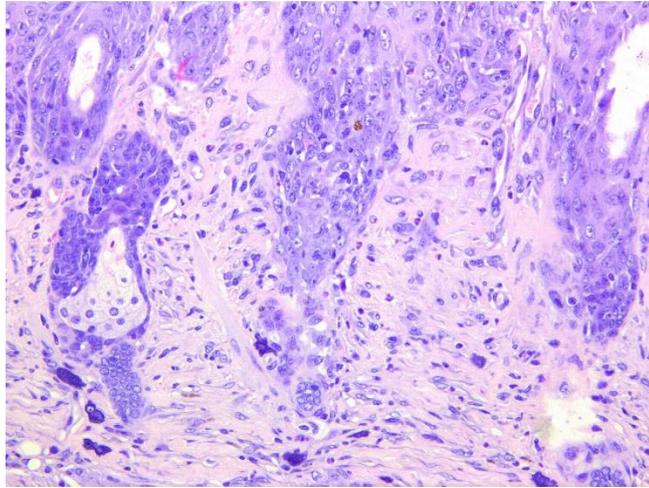


Fig. 65. Carcinoma con microinvasión. (H.E. 312,5x.)

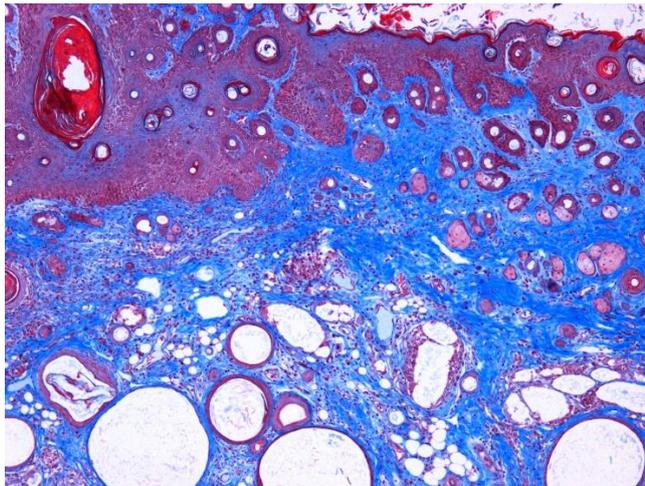


Figura 66. Reacción desmoplásica alrededor de un carcinoma de células escamosas. (Tricrómico de Masson, 312,5x.)

En este grupo la presencia de **carcinomas invasores fue de 75%** de los animales, siendo todos ellos tumores de tipo carcinoma espinocelular.

III. GRUPO PACLITAXEL 1% (P/P) CON 5% GES DURANTE 3 SEMANAS

A. ESTUDIO CLINICO-MACROSCÓPICO

Desde el inicio del experimento todos los animales presentaban **eritema** cutáneo difuso que desaparecía al cabo de unos minutos.

A partir de la sesión 30 de irradiación la mayoría de ratones de este grupo mostraba **eritema cutáneo** de carácter permanente y también se podían observar múltiples **arrugas cutáneas**.



Fig. 67. Eritema permanente.

En la sesión 50 la piel expuesta mostraba un marcado **engrosamiento** irregular.



Fig. 68. Engrosamiento irregular.

Tras finalizar las 65 de sesiones de irradiación el área de lesiones correspondía a $0,64\text{cm}^2$.

Todos los ratones desarrollaban lesiones, la mayoría presentaba numerosas pápulas **eritemato-escamosas** y **lesiones nodulares** sobre una piel con arrugas marcadas formando un **patrón reticular destructivo**.



Fig. 69. Detalle de lesiones de extensión mínima.

Tras 10 días desde el inicio del tratamiento se observaban **lesiones tumorales** que en ocasiones estaban **ulceradas**

Al finalizar las 3 semanas de tratamiento con paclitaxel 1% con GES 5% el área de lesión fue de 1,51 cm², que mostraba diferencias estadísticamente significativas respecto a las del grupo ingenol mebutato (II).

En el 100% de los casos no se observó remisión de las lesiones aunque la progresión lesional fue muy leve, ocurriendo incremento del tamaño de las lesiones.



Fig. 70. Lesiones papulares de gravedad moderada y lento crecimiento.

Tras un mes de finalizar el tratamiento el área media de lesión en el lomo de los ratones fue de 1,90 cm² y como en el período anterior también observamos diferencias estadísticamente significativas con respecto al área de lesión del grupo ingenol mebutato (II) en la misma etapa.

Un **8%** de los animales mantuvo las **lesiones sin crecimiento**, mientras que el **92%** mostraba **lesiones estables con crecimiento** progresivo de las mismas y con erosión superficial.

En este período predominaban las lesiones de **aspecto tumoral maligno**.



Fig. 71. Lesiones eritemato-escamosas en grandes placas con múltiples lesiones nodulares erosivas.

B. ESTUDIO MICROSCÓPICO

Todos los animales de este grupo presentaban **hiperplasia** epitelial con frecuente **disqueratosis**, que alternaban con otras zonas de epidermis normal.

El **25%** de los animales presentaba áreas de **carcinoma *in situ***, el **8,3%** **carcinomas microinvasores** y el **66,7%** **carcinomas espinocelulares**.

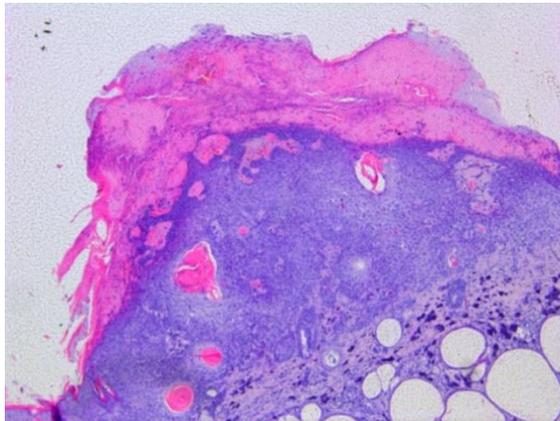


Fig. 72. Carcinoma *in situ*. (H.E. 200x.)

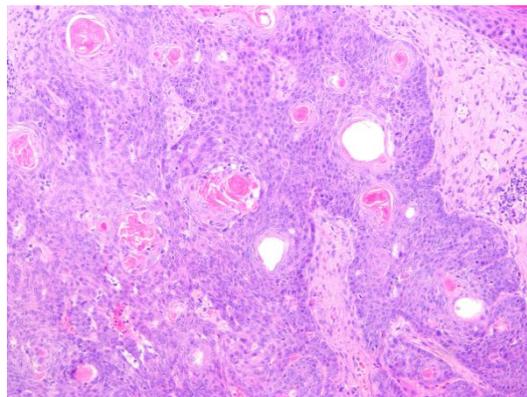


Fig. 73. Detalle de atipias celulares y la formación de numerosos globos córneos. (H.E. 200x.)

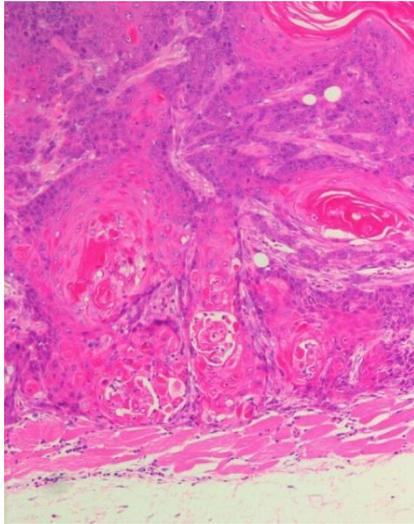


Fig.74. Carcinoma espinocelular. Invasión dérmica que alcanza el músculo adyacente. (H.E. 200x.)

IV. GRUPO PACLITAXEL 1% (P/P) CON 5% GES DURANTE 6 SEMANAS

A. ESTUDIO CLINICO-MACROSCÓPICO

Durante las primeras semanas de irradiación la piel mostró **pérdida de laxitud**, mostrando **arrugas longitudinales** a partir de la **sesión 30** de irradiación, que se hacían más prominentes y adquirían un **marcado patrón geométrico**.

Desde la **sesión 50** se evidenció un **engrosamiento irregular** en la piel del lomo de los ratones, así como aumento del patrón geométrico y de las arrugas.



Fig. 75. Evolución de arrugas con marcado patrón geométrico entre las sesiones 30 y 50 de irradiación.

Tras las **65 sesiones de irradiación** las lesiones se extendían sobre un área de $0,73 \text{ cm}^2$.

El 100% de las lesiones desarrolladas ocuparon una extensión mínima.

La piel de los ratones mostraba múltiples lesiones **eritemato-escamosas**, lesiones **papulares** de pequeño tamaño, lesiones **nodulares** y **tumorales** aisladas que ya mostraban **ulceración** central; así como frecuentes cuernos cutáneos.



Fig. 76. Lesión de tipo nodular con superficie ulcerada de aspecto crateriforme y bordes elevados.



Fig.77. Lesión nodular con cuerno cutáneo.

Al finalizar el tratamiento el área de lesión era de 1,44cm².

El 100% de los ratones no experimentó variación en cuanto al tamaño de las lesiones tras la aplicación del tratamiento.

Las lesiones en este momento eran de **tipo eritemato-escamoso y tumoral** con frecuente **superficie ulcerada**.



Fig. 78. Lesiones queratósicas.

Trascurrido un mes desde la última dosis de tratamiento el área lesionada creció hasta los 2,47 cm², con diferencias estadísticamente significativas respecto al área media de lesión de los ratones del grupo ingenol mebutato (II) en esta misma etapa.

El 100% de los ratones presentaba lesiones estables que experimentaron crecimiento con una ocupación de la totalidad de la superficie del lomo.

Destacaban las lesiones de **tipo tumoral** de hasta 1cm de diámetro y **superficie necrosada**.



Fig. 79. Múltiples lesiones tumorales confluentes con costras fibrino-necróticas.

B. ESTUDIO MICROSCÓPICO

Como en los otros grupos anteriores, todos los animales presentaron zonas de **hiperplasia epidérmica** e intensa **hiperqueratosis**.

El **27,3%** de los ratones presentó **carcinomas *in situ***, el **18,2%** desarrolló **carcinomas microinvasivos**, siendo uno de ellos de aspecto exofítico y digitiforme y el **54,5%** desarrolló **carcinomas espinocelulares**.

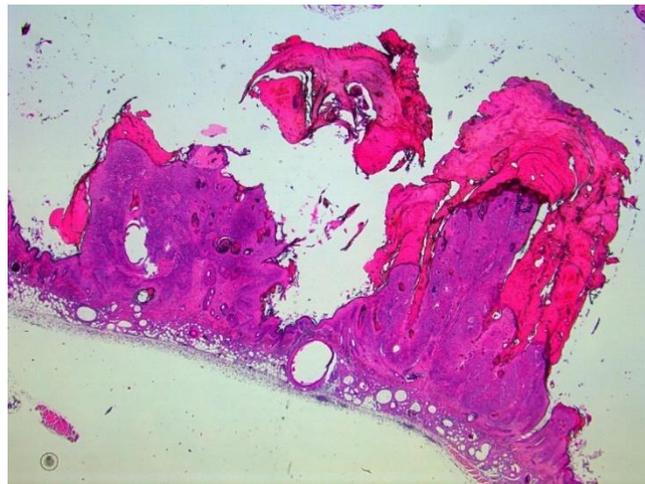


Fig. 80. Carcinoma exofítico con intensa hiperqueratosis. (H.E. 125x.)

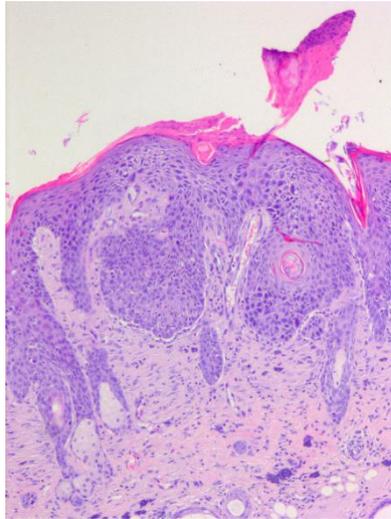


Fig. 81. Carcinoma microinvasor. (H.E. 200x.)

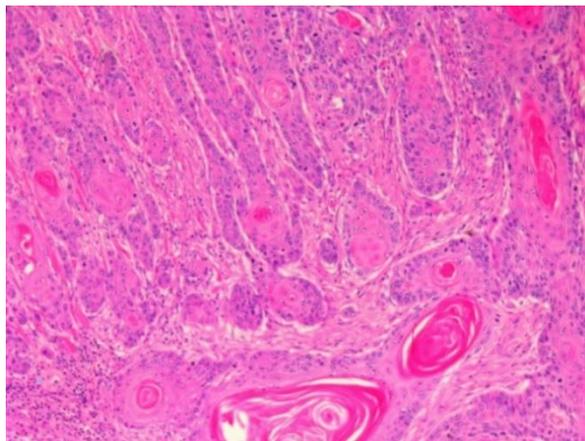


Fig. 82. Detalle de carcinoma con grandes globos córneos. (H.E. 312,5x.)

V. GRUPO PACLITAXEL 1% (P/P) CON 1,2% GES 3 SEMANAS

A. CLINICO-MACROSCÓPICO

Tras las **primeras sesiones de irradiación** los ratones desarrollaban **eritema** que desaparecía transcurridos varios minutos. Hacia la **sesión 30** los ratones de este grupo mostraban **eritema permanente** y **telangiectasias**, así como arrugas cutáneas que conformaban un **patrón geométrico** en el lomo expuesto a la radiación.

Trascurridas 50 sesiones de irradiación se apreciaba **engrosamiento cutáneo irregular** y en cinco animales la presencia de pequeñas lesiones **papulares**.



Fig. 83. Lesión de tipo papular.

Al finalizar la irradiación, el área de lesión ocupaba $0,91\text{cm}^2$.

El 90% de estas lesiones alcanzaba una extensión mínima y el 10% restante era de grado medio.

Las lesiones que se observaban correspondían predominantemente a múltiples pápulas de pequeño tamaño, en ocasiones acompañadas de lesiones de mayores dimensiones que presentaban un aspecto escamoso, erosivo y nodular, sobre una piel con **arrugas** muy marcadas.



Fig. 84. Pápulas en la superficie del lomo sobre piel engrosada.



Fig. 85. Lesiones nodulares.

Tras **10 días de tratamiento** se apreciaban **lesiones tumorales** cuya superficie se **ulceraba**.

Al finalizar el tratamiento el área afectada fue de $0,54 \text{ cm}^2$, con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo tratado con ingenol mebutato (II) en este período.

Observamos una **remisión del 100%** del área de las lesiones en el **9% de los ratones**; **del 75%** en el **18%** y **del 50%** en otro **18%**, mientras que en el **55%** restante **no se produjo remisión**.

Las lesiones en este punto eran de **tipo nodular** con costras **eritemato-escamosas** y **erosivas** en su superficie y **tumorales** que en 7 ratones eran de aspecto **vegetante**.



Fig. 86. Lesiones queratósicas y nodulares.



Fig. 87. Lesiones nodulares y exofticas.

Después de un mes sin tratamiento, el área de la zona afectada creció hasta los 2,63 cm², siendo esta área estadísticamente significativa con la presentada por el grupo tratado con ingenol mebutato en la misma etapa.

Todos los animales experimentaron crecimiento de las lesiones con presencia de **tumores nodulares de gran tamaño,** con la superficie erosionada recubierta por **costras.**

B. ESTUDIO MICROSCÓPICO

Asimismo la piel de todos los animales de este grupo mostró zonas de **hiperplasia** con aumento del número de capas en la epidermis y acumulación de células descamadas.

El **18,2%** de los ratones no desarrolló lesiones neoplásicas malignas, aunque sí mostraron áreas de **displasia**.

En el **9,1%** observamos zonas de ***in situ***, en otro **9,1%** **carcinomas de crecimiento exofítico**, en el **18,2%** **carcinomas de tipo microinvasor** y en el **45,4%** de los ratones del grupo **espinocelulares**.

Entre estos carcinomas espinocelulares 2 mostraron **invasión muscular**.

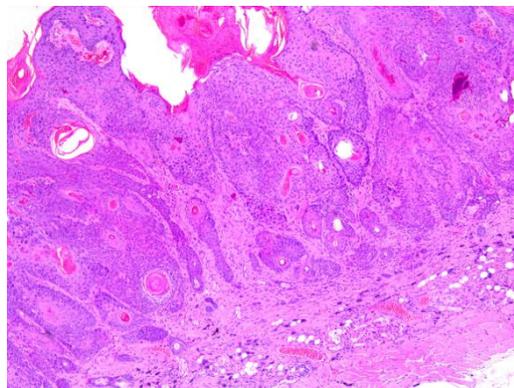


Fig. 88. Carcinoma microinvasor. (H.E. 200x.)

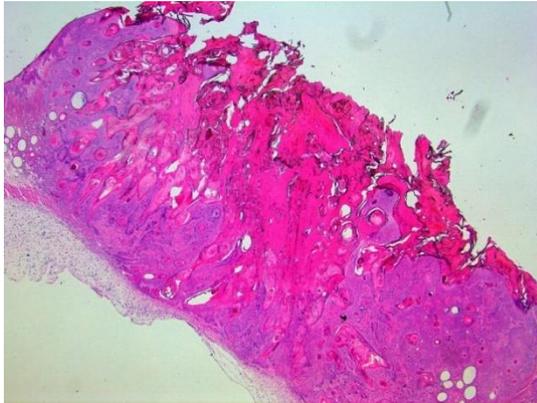


Fig. 89. Carcinoma espinocelular que invade el tejido muscular adyacente. (H.E. 125x.)

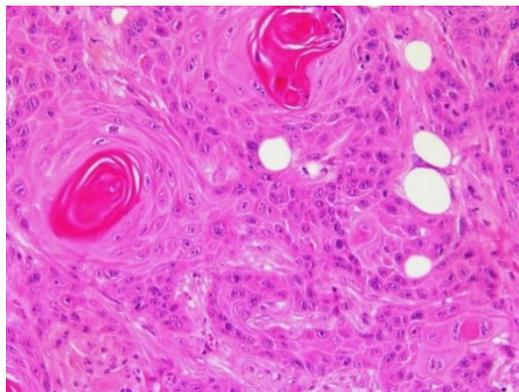


Fig. 90. Detalle de carcinoma con citoplasma granular. (H.E. 500x.)

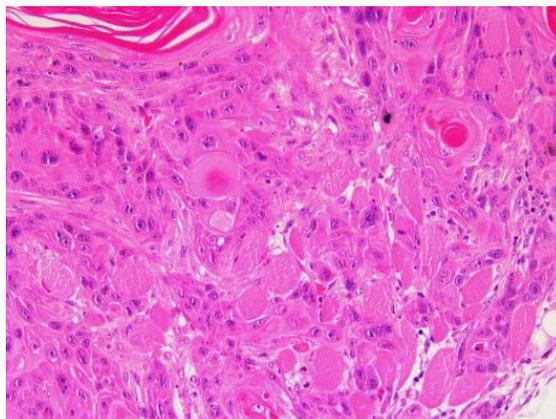


Fig. 91. Carcinoma con invasión muscular. (H.E. 500x.)

VI. GRUPO PACLITAXEL 1% (P/P) CON 1,2% GES 6 SEMANAS

A. CLINICO-MACROSCÓPICO

Desde el **inicio de la irradiación**, los ratones de este grupo mostraban **eritema pasajero** que se incrementaba hasta convertirse en **eritema permanente** con **telangiectásias** a partir de la **sesión número 30** y progresivo **engrosamiento cutáneo irregular** hasta la sesión 50.



Fig. 92. Lesiones leves sobre piel con eritema de carácter permanente.

Al finalizar el periodo de irradiación el área dañada por la radiación fue de 0,72 cm².

Las lesiones eran de extensión mínima en el 100% de los animales.

Los ratones en este momento presentaban la piel engrosada, con arrugas muy marcadas y **lesiones eritemato-escamosas** y queratósicas **nodulares**.

Tras 10 días de tratamiento se observaban las primeras **lesiones tumorales** y **ulceradas**.

Tras las 6 semanas de tratamiento, la zona afectada alcanzó los 1,44 cm², área con diferencias estadísticamente significativas respecto a las desarrolladas en la misma etapa con el tratamiento con ingenol mebutato (II).

El 10% de los ratones presentaba una remisión del 50% del área de lesión mientras que el 90% restante no experimentó remisión.

La piel mostraba **erosión** y presencia de **costras** en su mayoría de pequeño tamaño sobre toda la superficie expuesta, así como **lesiones tumorales**. Uno de los animales presentó una gran lesión de 2 cm de diámetro cuya superficie estaba **ulcerada**.



Fig. 93. Lesiones papulares de extensión media.



Fig. 94. Lesión tumoral de bordes elevados y úlcera central, de aspecto crateriforme.

Tras un periodo de post-tratamiento de 1 mes, el área de lesión fue de 3,13 cm², mostrando diferencias estadísticamente significativas respecto al área medida en la misma etapa tanto en el grupo control como en el tratado con ingenol mebutato.

El 67% de ratones desarrolló crecimiento de las lesiones remanentes, mientras que en el 33% restante no mostró crecimiento.



Fig. 95. Tumoración voluminosa.

B. ESTUDIO MICROSCÓPICO

En este grupo se observan **carcinomas *in situ*** en el **33,3%** de los ratones y **carcinomas espinocelulares** de carácter invasor en el **66,7%** restante. Dentro de este grupo algunos tumores mostraron características invasoras alcanzando las **capas musculares profundas** y otros mostraban un marcado **carácter desmoplásico**.

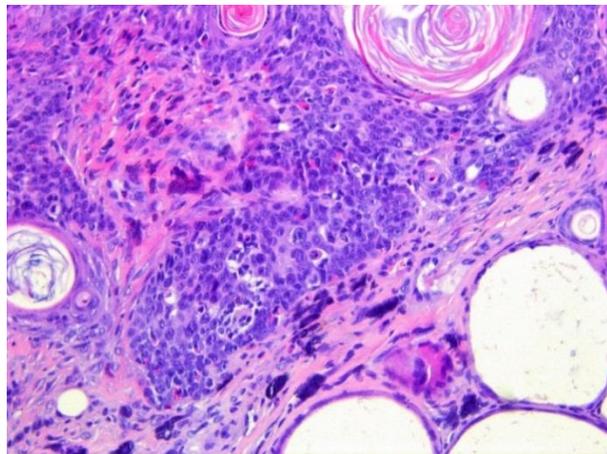


Fig. 96. Carcinoma *in situ*. (H.E. 500x.)

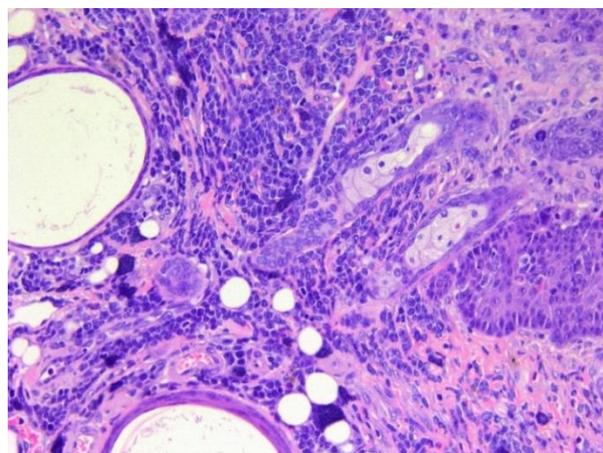


Fig. 97. Carcinoma invasor. (H.E. 500x.)

A. Tiempo de presentación de cada tipo de lesión.

I. Durante la irradiación (sesiones).

Tiempo de presentación de lesiones (<u>sesiones</u>)	Control (I)	Ingenol mebutato (II)	Paclitaxel 5% GES 3 semanas (III)	Paclitaxel 5% GES 6 semanas (VI)	Paclitaxel 1,2 GES 3 semanas (V)	Paclitaxel 1,2 GES 6 semanas (VI)
Eritema pasajero	1	1	1	1	1	1
Eritema permanente-telangiectasias	30	30	30	30	30	30
Patrón geométrico-Arrugas cutáneas	30	30	30	30	30	30
Engrosamiento irregular	50	50	50	50	50	50
Lesiones eritematoso-escamosas	50	65	65	65	50	65
Lesiones nodulares >1mm	50	65	65	65	50	65
Lesiones tumorales	>65	>65	>65	65	>65	>65
Lesiones ulceradas	>65	>65	>65	65	>65	>65

Tabla nº 1. Tiempo de aparición de las lesiones durante la irradiación.

II. Durante el tratamiento (días).

Tiempo de presentación de lesiones (<u>días</u>)	Control (I)	Ingenol mebutato (II)	Paclitaxel 5% GES 3 semanas (III)	Paclitaxel 5% GES 6 semanas (VI)	Paclitaxel 1,2 GES 3 semanas (V)	Paclitaxel 1,2 GES 6 semanas (VI)
Lesiones tumorales	10	10	10	-	10	10
Lesiones ulceradas	10	10	10	-	10	10

Tabla nº 2. Tiempo de aparición de las lesiones durante el tratamiento.

B. Área de afectación animal por grupos en cada período.

1. Tablas de áreas de lesión

I. Tras la irradiación

TRAS 65 SESIONES DE IRRADIACIÓN			
	Área total (cm ²)	Área media (cm ²)	Desviación estándar
Control (I)	12,41	1,13	0,80
Ingenol mebutato (II)	4,42	0,44	0,27
PACLIT. 5% GES 3 sem. (III)	6,42	0,64	0,37
PACLIT. 5% GES 6 sem. (IV)	7,29	0,73	0,32
PACLIT. 1,2% GES 3 sem. (V)	9,08	0,91	0,83
PACLIT. 1,2% GES 6 sem. (VI)	6,49	0,72	0,35
Total	46,13	0,77	0,57

Tabla nº 3. Áreas de lesiones tras la irradiación.

ANOVA Inter-grupos					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
TRAS IRRADIACIÓN	2,876	5	,575	1,897	,110*

* $p > 0,05$. Diferencia estadísticamente no significativa

Tabla nº 4. ANOVA tras la irradiación.

II. Tras el tratamiento

TRAS EL TRATAMIENTO			
	Área total (cm ²)	Área media (cm ²)	Desviación estándar
Control (I)	13,48	1,04	0,61
Ingenol mebutato (II)	26,18	2,18	0,65
PACLIT. 5% GES 3 sem. (III)	18,12	1,51	0,89
PACLIT. 5% GES 6 sem. (IV)	14,36	1,44	0,76
PACLIT. 1,2% GES 3 sem. (V)	5,95	0,54	0,37
PACLIT. 1,2% GES 6 sem. (VI)	14,44	1,44	0,78
Total	94,27	1,37	0,83

Tabla nº 5. Áreas de lesiones tras el tratamiento.

ANOVA Inter-grupos					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	p
TRAS TRATAMIENTO	17,691	5	3,538	7,873	,0005*

*p<0,05. Diferencias estadísticamente significativas.

Tabla nº 6. ANOVA tras el tratamiento.

GRUPO (A)	GRUPO (B)	Diferencia de medias (A-B)	Error típico	P	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
I	II	-1,14*	0,27	0,00	-1,68	-0,61
	III	-0,47	0,27	0,08	-1,01	0,06
	IV	-0,56	0,28	0,05	-1,12	0,01
	V	0,50	0,27	0,08	-0,05	1,05
	VI	-0,41	0,28	0,15	-0,97	0,16
II	I	1,14*	0,27	0,00	0,61	1,68
	III	,672*	0,27	0,02	0,13	1,22
	IV	,59*	0,29	0,04	0,01	1,16
	V	1,64*	0,28	0,00	1,08	2,20
	VI	,74*	0,29	0,01	0,16	1,31
III	I	0,47	0,27	0,08	-0,06	1,01
	II	-,67*	0,27	0,02	-1,22	-0,13
	IV	-0,08	0,29	0,77	-0,66	0,49
	V	,97*	0,28	0,00	0,41	1,53
	VI	0,07	0,29	0,82	-0,51	0,64
IV	I	0,56	0,28	0,05	-0,01	1,12
	II	-,59*	0,29	0,04	-1,16	-0,01
	III	0,08	0,29	0,77	-0,49	0,66
	V	1,05*	0,29	0,00	0,47	1,64
	VI	0,15	0,30	0,62	-0,45	0,75
V	I	-0,50	0,27	0,08	-1,05	0,05
	II	-1,64*	0,28	0,00	-2,20	-1,08
	III	-,97*	0,28	0,00	-1,53	-0,41
	IV	-1,05*	0,29	0,00	-1,64	-0,47
	VI	-,90*	0,29	0,00	-1,49	-0,32

VI	I	0,41	0,28	0,15	-0,16	0,97
	II	-,74*	0,29	0,01	-1,31	-0,16
	III	-0,07	0,29	0,82	-0,64	0,51
	IV	-0,15	0,30	0,62	-0,75	0,45
	V	,90*	0,29	0,00	0,32	1,49

*La diferencia es estadísticamente significativa al nivel $p < 0,05$. Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos: I con II y del II con todos.

Tabla nº 7. Comparación inter-grupos tras el tratamiento.

III. Tras el período post-tratamiento

TRAS 1 MES DE OBSERVACIÓN SIN TRATAMIENTO			
	Área total (cm ²)	Área media (cm ²)	Desviación estándar
Control(I)	18,83	1,71	0,50
Ingenol mebutato (II)	4,06	0,41	0,37
PACLIT. 5% GES 3 sem. (III)	18,99	1,89	0,93
PACLIT. 5% GES 6 sem. (IV)	24,74	2,47	0,91
PACLIT. 1,2% GES 3 sem. (V)	26,35	2,63	1,16
PACLIT. 1,2% GES 6 sem. (VI)	34,46	3,13	2,73
Total	127,44	2,05	1,58

Tabla nº 8. Áreas de lesiones tras 1 mes sin tratamiento.

ANOVA Inter-grupos					
	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	P
TRAS DESCANSO	46,646	5	9,329	4,938	,001*

*p< 0,05 deferencias estadísticamente significativas

Tabla nº 9. ANOVA tras el período post-tratamiento.

GRUP O (A)	GRUP O (B)	Diferencia de medias (A-B)	Error típico	p	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
I	II	1,30*	0,60	0,03	0,10	2,51
	III	-0,19	0,60	0,76	-1,39	1,01
	IV	-0,76	0,60	0,21	-1,97	0,44
	V	-0,92	0,60	0,13	-2,13	0,28
	VI	-1,42*	0,59	0,02	-2,60	-0,25
II	I	-1,31*	0,60	0,03	-2,51	-0,10
	III	-1,49*	0,61	0,02	-2,73	-0,26
	IV	-2,07*	0,61	0,00	-3,30	-0,84
	V	-2,23*	0,61	0,00	-3,46	-1,00
	VI	-2,73*	0,60	0,00	-3,93	-1,52
III	I	0,19	0,60	0,76	-1,01	1,39
	II	1,49*	0,61	0,02	0,26	2,73
	IV	-0,57	0,61	0,35	-1,81	0,66
	V	-0,74	0,61	0,24	-1,97	0,50
	VI	-1,23*	0,60	0,04	-2,44	-0,03
IV	I	0,76	0,60	0,21	-0,44	1,97
	II	2,07*	0,61	0,00	0,84	3,30
	III	0,57	0,61	0,35	-0,66	1,81
	V	-0,16	0,61	0,79	-1,39	1,07
	VI	-0,66	0,60	0,28	-1,86	0,54
V	I	0,92	0,60	0,13	-0,28	2,13
	II	2,23*	0,61	0,00	1,00	3,46
	III	0,74	0,61	0,24	-0,50	1,97
	IV	0,16	0,61	0,79	-1,07	1,39

	VI	-0,50	0,60	0,41	-1,70	0,71
VI	I	1,42*	0,59	0,02	0,25	2,60
	II	2,73*	0,60	0,00	1,52	3,93
	III	1,23*	0,60	0,04	0,03	2,44
	IV	0,66	0,60	0,28	-0,54	1,86
	V	0,50	0,60	0,41	-0,71	1,70

*La diferencia es estadísticamente significativa al nivel $p < 0,05$. Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos: I con II y el VI y del II con todos.

Tabla nº 10. Comparación inter-grupos tras el período post-tratamiento.

IV. Resumen de los 3 períodos

	TRAS IRRADIACIÓN		TRAS TRATAMIENTO		POST-TRATAMIENTO	
	X	S	X	S	X	S
Control(I)	1,13	0,80	1,04	0,61	1,71	0,50
Ingenol mebutato (II)	0,44	0,27	2,18	0,65	0,41	0,37
PACLIT. 5% GES 3 sem. (III)	0,64	0,37	1,51	0,89	1,90	0,93
PACLIT. 5% GES 6 sem. (IV)	0,73	0,32	1,44	0,76	2,47	0,91
PACLIT. 1,2% GES 3 sem. (V)	0,91	0,83	0,54	0,37	2,64	1,16
PACLIT. 1,2% GES 6 sem. (VI)	0,72	0,35	1,44	0,78	3,13	2,73
Total	0,77	0,57	1,37	0,83	2,06	1,58

X: área media, s: desviación estándar

Tabla nº 11. Resumen de las áreas de lesiones por etapas.

V. Total

COMPARACIÓN DE MEDIA TOTAL POR GRUPOS				
	Media	Error típ.	Intervalo de confianza 95%	
			Límite inferior	Límite superior
Control(I)	1,309	,174	,961	1,657
Ingenol mebutato (II)	1,018	,182	,653	1,383
PACLIT. 5% GES 3 sem. (III)	1,395	,182	1,030	1,760
PACLIT. 5% GES 6 sem. (IV)	1,599	,182	1,234	1,964
PACLIT. 1,2% GES 3 sem. (V)	1,369	,182	1,004	1,734
PACLIT. 1,2% GES 6 sem. (VI)	1,852	,192	1,468	2,237

Tabla nº 12. Áreas totales de lesión.

2. Gráfico de área media de lesión

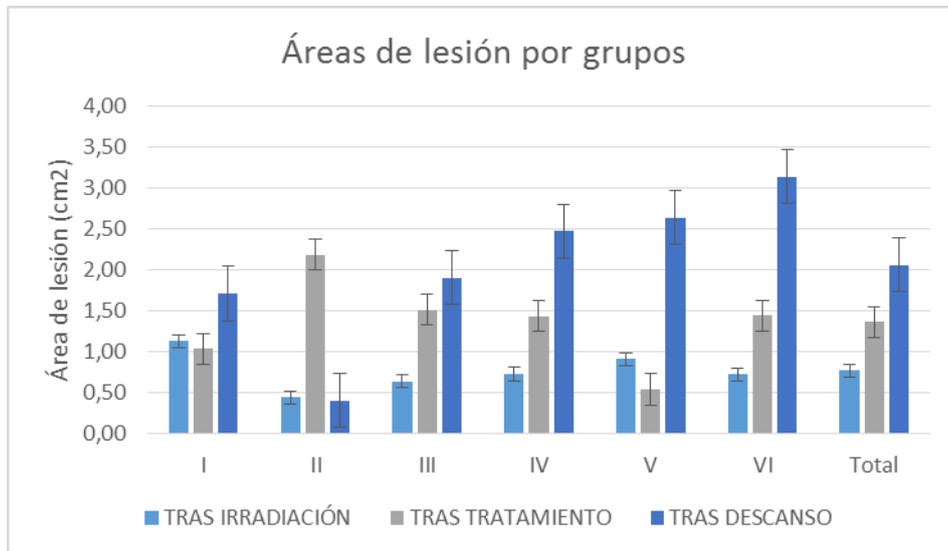


Gráfico nº 1. Área media de lesión por grupo en las 3 etapas con barras de error típico.

C. Resumen de las lesiones de cada grupo en cada etapa

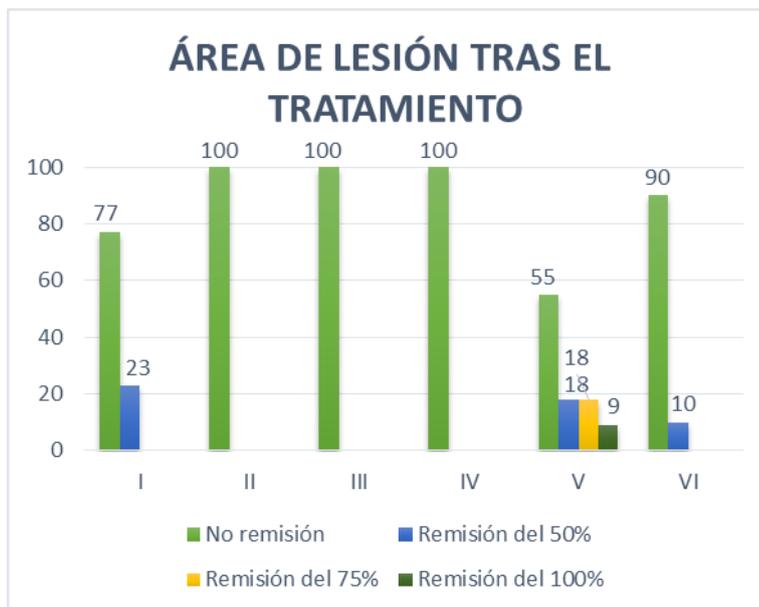
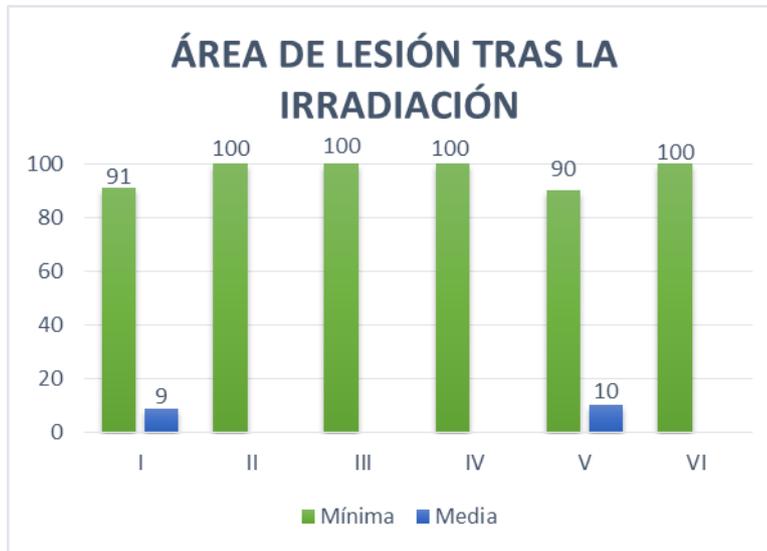
1. Tabla de estado de las lesiones

Grupo	Extensión de las lesiones tras el período de irradiación*	Evolución de las lesiones tras el tratamiento (o tras 1 mes de observación en el control)	Evolución de las lesiones al mes de finalizar el tratamiento
Control (I)	91% mínima 9% media	77% No remisión 23% Remisión del 50%	100% Lesiones remanentes con crecimiento
Ingenol mebutato (II)	100% mínima	100% No remisión	100% No lesión
Paclit. con 5% 3 sem. (III)	100% mínima	100% No remisión	92% Lesiones remanentes con crecimiento 8% Lesiones remanentes sin crecimiento
Paclit. con 5% 6 sem. (IV)	100% mínima	100% No remisión	100% Lesiones remanentes con crecimiento
Paclit. con 1,2% GES 3 sem. (V)	90% mínima 10% media	55% No remisión 18% Remisión 50% 18% Remisión 75% 9% Remisión 100%	100% Lesiones remanentes con crecimiento
Paclit. con 1,2% GES 6 sem. (VI)	100% mínima	90% No remisión 10% Remisión 50%	67% Lesiones remanentes con crecimiento 33% Lesiones remanentes sin crecimiento

*Extensión: mínima 0-3,3cm², media 3,4-6,6 cm² y máxima mayor de 6,7cm².

Tabla nº 13. Evolución de las lesiones por etapas.

2. Gráfico de estado de las lesiones por etapas



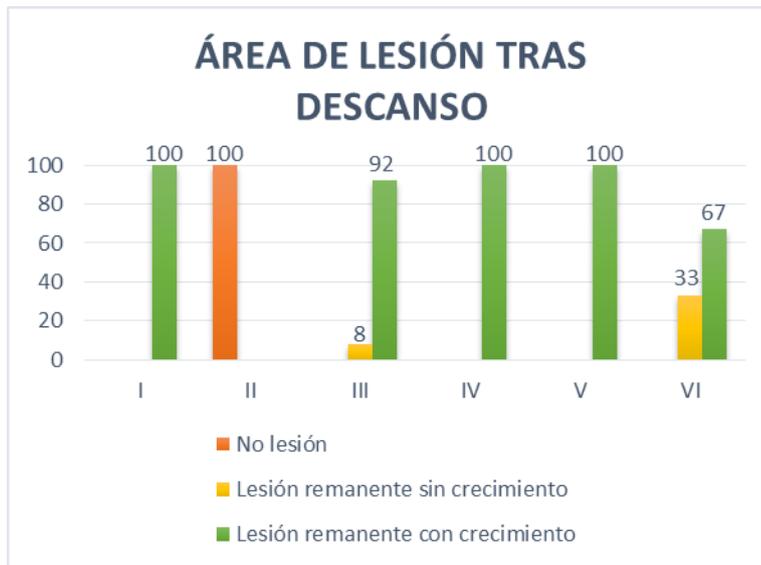


Gráfico nº 2, 3 y 4. Estado de las lesiones en las 3 etapas.

D. Incidencia de lesiones microscópica por grupos

1. Tabla de incidencia de lesiones

Se considera incidencia el porcentaje de ratones con presencia de al menos una lesión de la malignidad máxima en el área observada:

	Control (I)	Ingenol mebutato (II)	Paclit. 5% GES 3 sem. (III)	Paclit. 5% GES 6 sem. (IV)	Paclit. 1,2% GES 3 sem. (V)	Paclit. 1,2% GES 6 sem. (VI)
Hiperplasia	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Displasia/ Carcinoma <i>in situ</i>/ Carcinoma microinvasor	7,7%	25%	33,35	45,5%	54,6%	33,3%
Carcinoma Espinocelular Invasor	92,3%	75%	66,7%	54,5%	45,4	66,7%

Tabla nº 14. Incidencia de lesiones microscópicas.

2. Gráfico de lesiones microscópicas

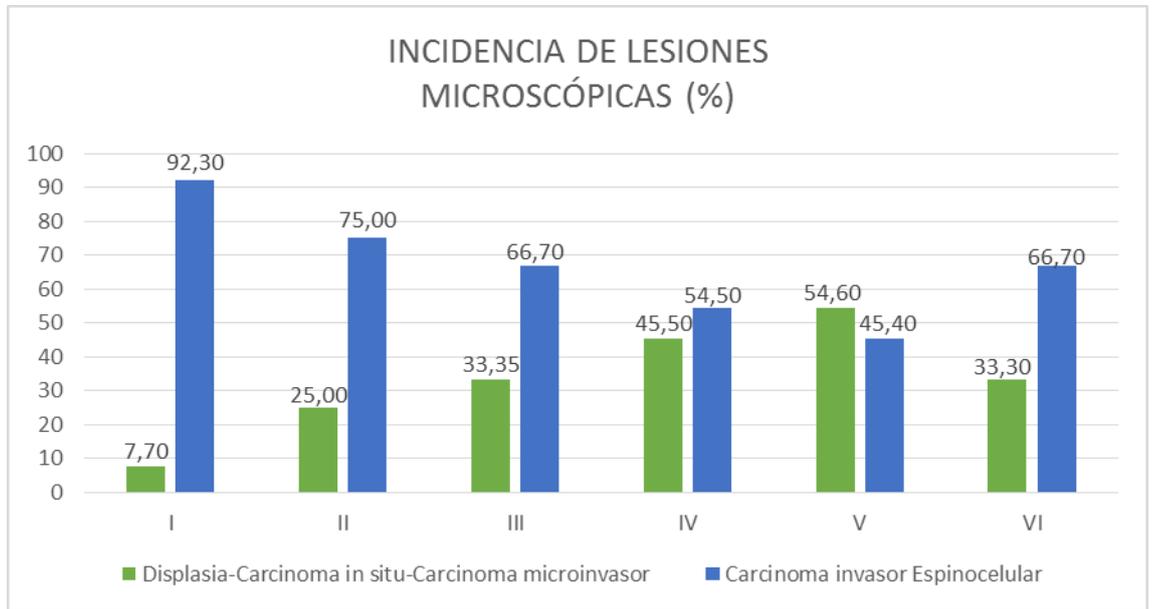


Gráfico nº 5. Lesiones microscópicas.

C. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

I. PCNA

En las figuras 98, 99 y 100, se muestran unos cortes marcados con anticuerpo anti-PCNA de la piel de los animales de cada grupo. Puede observarse el intenso marcaje de los núcleos celulares, que presentan una coloración marrón oscura. Debido a que todos los animales fueron irradiados, observamos un aumento de células proliferantes en capas basales y suprabasales, pero el número de células positivas y la intensidad del marcaje fue menor en los grupos tratados que en el control.

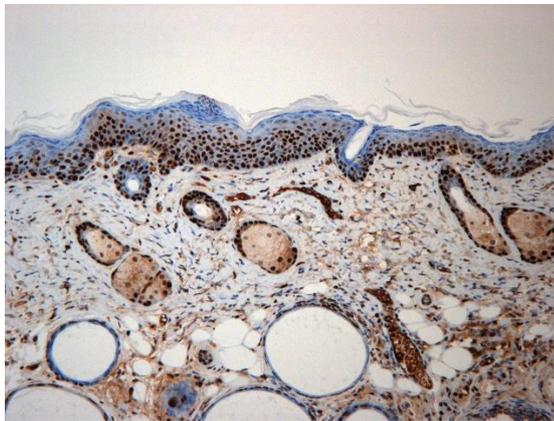


Fig. 98. Hiperplasia epidérmica en un animal del grupo III (Paclitaxel 1% con 5% GES 3 semanas). Obsérvese la marcada positividad para PCNA de la mayoría de las células del estrato basal y capas suprabasales. (PCNA 200x.)

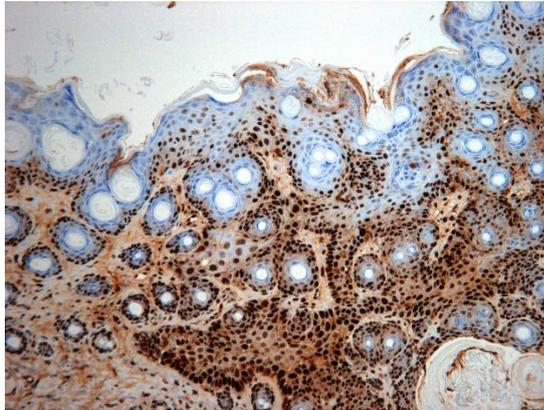


Fig. 99. Periferia de un carcinoma de células escamosas de un animal del grupo control. (PCNA 312,5x.)



Fig. 100. Periferia de un carcinoma *in situ* del grupo IV (Paclitaxel 1% con 5% GES 6 semanas). (PCNA 200x.)

II. MMP-9

La expresión positiva de MMP-9 fue observada principalmente en el citoplasma de las células del estroma y células epiteliales proliferantes, y se presentaba como gránulos pardos (Fig. 101,102 y 103). En las zonas alejadas de las lesiones, como en la piel del vientre de los animales, no había marcaje. En el caso de los carcinomas microinvasores, carcinomas in situ y displasia de grado III, el marcaje solía ser de tipo severo, mientras que en los tumores infiltrantes, existía un marcaje moderado o leve en el interior del tumor, que se hacía más intenso en la periferia (frente de invasión tumoral). No existían diferencias entre los distintos grupos.

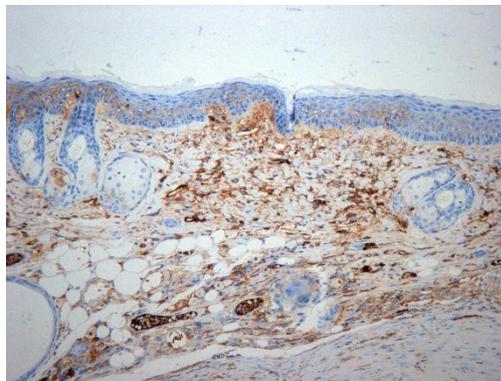


Fig 101. Marcaje leve de MMP-9 en un caso de hiperplasia cutánea en un animal del grupo III (Paclitaxel 1% con 5% GES 3 semanas). (MMP9 200x.)

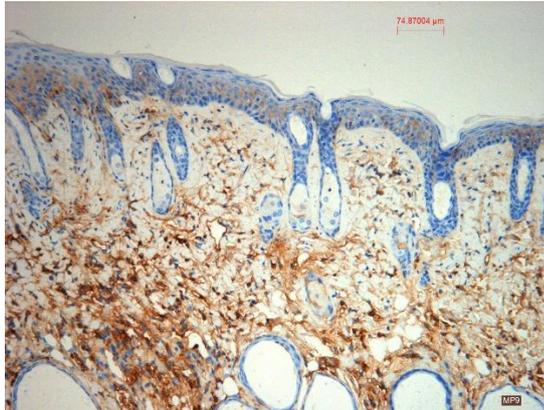


Fig. 102. Positividad moderada para MMP-9 en un animal del grupo V (Paclitaxel 1% con 1,2% GES 3 semanas) con hiperplasia cutánea. (MMP-9 200x.)

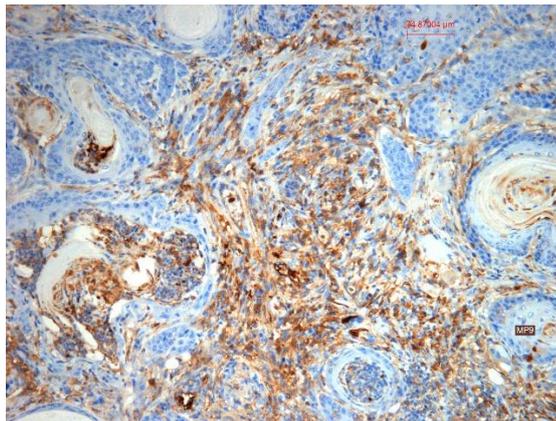


Fig. 103. Destrucción de la matriz extracelular mediada por MMP-9 en un carcinoma de células escamosas del grupo control. (MMP9 340x.)

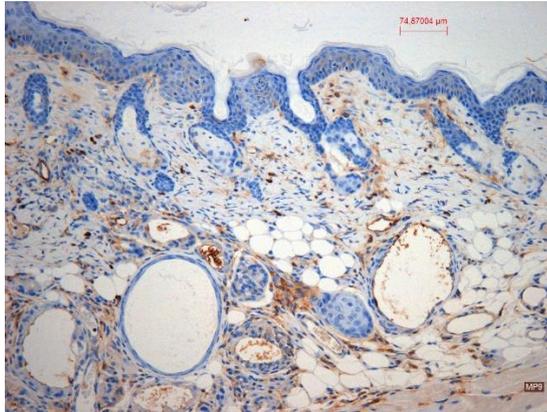


Fig. 104. Marcaje leve de MMP-9 en piel ligeramente engrosada de la periferia de la zona irradiada. Grupo II (Ingenol mebutato). (MMP9 200x.)

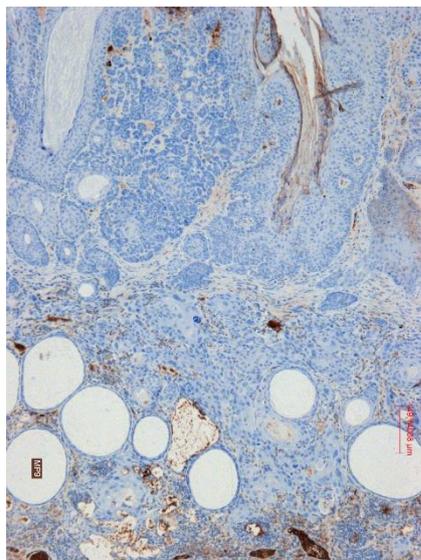


Fig. 105. Marcaje prácticamente negativo con MMP-9 de un carcinoma de células escamosas en un animal del grupo III (Paclitaxel 1% con 5% GES 3 semanas). (MMP9 312,5x.)

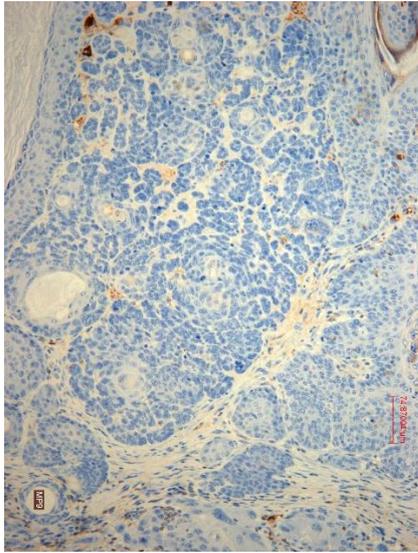


Fig. 106. Detalle del caso anterior. (MMP9 340x.)

III. TIMP-1

En todos los casos, TIMP-1 presentaba un patrón de marcaje citoplasmático y nuclear, siendo positivas tanto células tumorales (epiteliales) como las del tejido conectivo (mesenquimales). En general, el marcaje con este anticuerpo fue leve, aunque en los grupos tratados con paclitaxel se observó un ligero incremento de su expresión (Fig. 107 y 108).

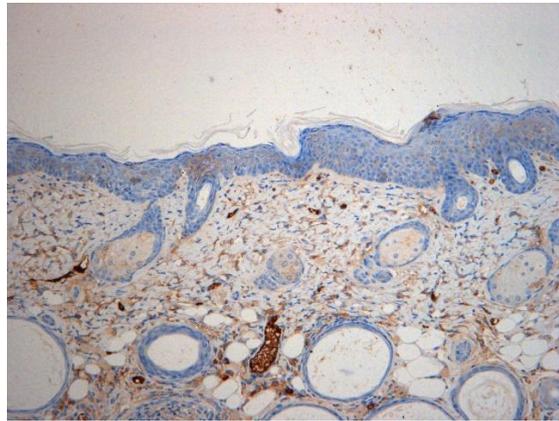


Fig. 107. Positividad moderada para TIMP-1 en un caso de hiperplasia cutánea en un animal del grupo III (Paclitaxel 1% con 5% GES 3 semanas. (TIMP1 200x.)

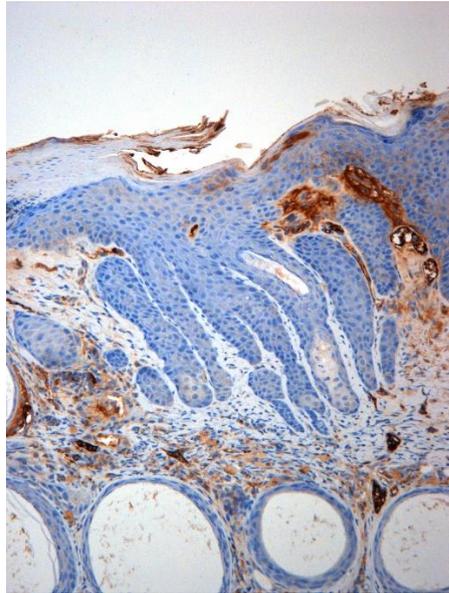


Fig. 108. Marcaje moderado con TIMP-1 en un animal del grupo IV (Paclitaxel 1% con 5% GES 6 semanas). (TIMP1 200x.)

VII. DISCUSIÓN

La piel sufre a lo largo de la vida un proceso continuo de envejecimiento, debido a la disminución progresiva por parte del organismo de su capacidad de respuesta frente al estrés fisiológico que se denomina **envejecimiento intrínseco o fisiológico**. Además, al ser el órgano que separa al cuerpo del medio ambiente sufre un proceso adicional de **envejecimiento extrínseco**, debido principalmente a la radiación solar. Los efectos adversos de la radiación UV en la piel han sido estudiados desde la década de 1890. Sin embargo, no fue hasta la década de 1980 cuando se aclaró que la radiación UV aceleraba el envejecimiento de la piel, y se acuñó el término "**fotoenvejecimiento**" (Kligman, 1982). En 1992 se determinó que existía suficiente evidencia como para considerar la radiación solar como principal agente causante del **cáncer de piel** (De Gruijl, 1994).

Curiosamente, a partir del primer tercio del siglo XX, comienza a cambiar la idea mantenida durante los últimos veinticinco siglos sobre el importante papel que la piel blanca había desempeñado en el modelo de belleza humana entre la población del hemisferio norte. Este cambio fue debido fundamentalmente al conocimiento de los efectos beneficiosos del sol sobre algunos procesos patológicos de la piel (lupus vulgar, viruela, psoriasis, etc.) que llevaron a la concesión del Premio Nobel de Medicina y Fisiología en el año 1903 a Niels

Finsen (Vicente, 1999); lo que unido a la reducción progresiva de la jornada laboral de hasta un tercio de las horas de la jornada semanal, llevó a un aumento de actividades al aire libre y el consiguiente aumento de horas de exposición solar de la población general (Giordano, 2003), así como a la labor de la famosa diseñadora Coco Chanel sobre el vanguardismo del bronceado cutáneo, de forma que la exposición solar pasó a considerarse como la consecución de mayor libertad individual y por tanto, algo socialmente deseable. De este modo y progresivamente, la piel bronceada pasó a considerarse como un nuevo estándar de belleza (Vicente, 1999).

Por otra parte, los mensajes enviados desde la propia comunidad científica eran contradictorios. Un claro ejemplo corresponde a una de las afirmaciones publicada en la revista Lancet en 1910: “un rostro bronceado es un buen indicador de salud” (Qiu, 2013). Por lo que todo esto ha llevado a un aumento de la exposición solar con motivos **estéticos y recreativos** principalmente en personas jóvenes, de modo que a finales del siglo XX el empleo de fuentes de radiación ultravioleta artificial para la obtención de un bronceado más rápido se estableció como práctica estética ampliamente extendida (Camacho, 2001). No obstante, durante las últimas décadas se ha ido generando de forma paulatina un nuevo cambio social, gracias al cúmulo progresivo de conocimientos,

en el sentido de que la exposición solar y, por tanto, el bronceado pueden comportar un grave riesgo.

Es por tanto fácil de entender que actualmente el fotoenvejecimiento cutáneo represente uno de los procesos más frecuentes en patología humana, y que el cáncer cutáneo sea la neoplasia maligna humana más frecuente (Matsumura, 2002). Por otra parte, también es lógico que la prevalencia del cáncer cutáneo en las sociedades occidentales haya aumentado exponencialmente en las últimas décadas; así, en los Estados Unidos, en el año 2013, se diagnosticaron más de un millón de casos nuevos de cáncer cutáneo no melanoma y 53.000 melanomas (Jemal, 2013).

Además, supone uno de los motivos de consulta médica más frecuentes. Aunque su pronóstico es excelente tras la cirugía, excepto el melanoma, su manejo clínico y terapéutico representa la dedicación de un alto porcentaje del presupuesto sanitario en el mundo occidental (Yaar, 2007; Jemal, 2012), por lo que se ha convertido en un tema de enorme interés social y sanitario (muy especialmente en el campo de la dermatología), además de las importantes implicaciones económicas que comporta (Kawada, 2011).

Uno de los principales efectos de la exposición crónica a las radiaciones solares es la aparición de queratosis actínica, que se trata de una de las neoplasias intraepiteliales más frecuentes,

especialmente en personas de piel clara (Salasche, 2000), y constituye una fase previa al desarrollo del carcinoma de células escamosas, de ahí el creciente interés en el estudio de su progresión y en el desarrollo de sustancias capaces de frenar esta evolución o incluso revertir la fotocarcinogénesis (Rossi, 2007).

Todo ello ha provocado en las sociedades occidentales un aumento de la preocupación sobre dicho fenómeno, tanto con motivos estéticos como clínicos y como consecuencia se han incrementado las consultas médicas, demandando a la comunidad científica un profundo conocimiento de los procesos patológicos de las radiaciones solares sobre la piel, lo que ha provocado el desarrollo de multitud de **estudios y modelos de investigación** centrados en el **fotoenvejecimiento**.

Sin embargo, existen importantes problemas para la implantación de los modelos de investigación en seres humanos, que corresponden no sólo a dificultades de tipo metodológico, relacionados con la larga y lenta evolución del desarrollo neoplásico, como sobre todo a las de tipo ético. Esto explica el progresivo desarrollo ocurrido durante las últimas décadas de modelos de fotoenvejecimiento tanto “in vitro” como fundamentalmente en animales de laboratorio. El objetivo principal de los mismos ha estado dirigido al conocimiento último de los mecanismos de producción y evolución de los

cambios que tienen lugar en la piel tras la exposición prolongada a las radiaciones ultravioleta, así como a poder ensayar los posibles efectos beneficiosos de diversas sustancias con fines terapéuticos (Yaar, 2007).

En este sentido, se han realizado estudios con distintas especies animales: minipig (Kligman, 1982), ratas (Nakamura, 1968), cobayas (Kreuzmann, 1990) e incluso peces (*Xiphophorus*, medaka y pez cebra) (Kurita, 2004).

No obstante, los animales más utilizados corresponden a ratones, tanto con pelo como sin él, debido a que estos animales desarrollan fotoenvejecimiento y carcinomas escamosos de características similares a las de los humanos; pero su empleo no está exento de limitaciones, como que su epidermis es más fina que la de los humanos. Se han utilizado ratones con distintas variaciones genéticas, como C3H/HeN, C3H/HeJ y Balb/c (Kyung, 2011), a partir de 1980 comenzaron a emplearse ratones *hairless* y hacia 1996 los principales estudios de fotoenvejecimiento empleaban ratones **SKH-1 *hairless* albinos**, que son más sensibles a las radiaciones UV por lo que estos animales se han convertido en el modelo animal más empleado en la actualidad. En concreto los ratones *hairless* SKH-1 deben su falta de pelo a una mutación en el gen *Hr*, y a pesar de la falta de pelo conservan los folículos, aunque éstos son atróficos (Hankodo, 2015).

Para la realización de nuestro estudio elegimos como modelo animal al ratón *hairless* SKH-1, desarrollado por la Universidad de Temple (Philladelphia) en 1986. Estos animales son considerados como modelo de elección para este tipo de estudios, por ser animales albinos y sin pelo, presentando por tanto una piel muy sensible a los efectos de las radiaciones ultravioleta y un menor período de latencia de presentación de las lesiones, además de ser animales eutímicos, es decir inmunocompetentes, y por su fácil manejo y bajo coste.

Como **primer objetivo** en nuestro estudio nos planteamos desarrollar un **modelo de fotoenvejecimiento y carcinogénesis cutáneos** mediante el empleo de RUV, para lo que nos basamos en los resultados obtenidos en los estudios previos de nuestro grupo de investigación (Cano Gómez, 2010; 2014; Gil Ortega, 2014; Ruiz Sánchez, 2014).

Para ello utilizamos 72 ratones SKH-1, hembras de cuatro semanas de edad, a las que expusimos a radiación UV mediante la lámpara Philips Type HB 554/01/A, 100 W-R35, que emite en un espectro de 220-425 nm y un pico máximo de 364 nm (98,6% UVA y 1,4% UVB).

Los ratones fueron expuestos a 65 sesiones de irradiación de 60 minutos de duración 4 veces por semana. Para ello los colocamos en jaulas de PVC con separadores individuales para cada ratón y cubiertos de una malla de celosía metálica a una

distancia de 20 cm entre la piel y el foco de irradiación, siendo la radiación recibida por cada animal al final del experimento de 1.371,5 J/cm².

Para el estudio de las lesiones macroscópicas los animales fueron anestesiados mediante inhalación de isoflurano y fotografiados junto a papel milimetrado en las sesiones 0, 30, 50 y 65 de exposición. Esta medida se repitió al mes y a los dos meses de finalizar la irradiación en el grupo control y en el resto de grupos al terminar el período de tratamiento así como después de un mes de post-tratamiento.

Aunque durante muchos años se creyó que el fotodaño sobre la piel era irreversible, se ha demostrado que en la finalización temprana de la exposición a la radiación alarga la fecha de aparición de tumores (Kligman, 1989; De Gruijl, 1991), de ahí que midiéramos las lesiones desarrolladas sobre los animales tanto al finalizar el tratamiento como tras un mes de observación.

Los animales, pertenecientes a todos los grupos, fueron sometidos a RUV y mostraron todo el espectro clínico y patológico del fotoenvejecimiento que comienza con el desarrollo de eritema desde la primera sesión, así como telangiectásias y arrugas, pérdida de laxitud, sequedad cutánea, engrosamiento cutáneo y lesiones escamosas y nodulares (Magliano, 2014) y que pueden evolucionar hasta lesiones

neoplásicas de los queratinocitos a partir de la 60 sesión de irradiación.

En la patogenia de estas lesiones, se han implicado varios mecanismos fundamentales como consecuencia de la acción de las radiaciones a su paso a través de los tejidos. Nosotros, siguiendo los trabajos de (Cano Gómez, 2010; Gil Ortega, 2014; Ruiz Sánchez, 2014), hemos considerado tres grupos fundamentales:

En primer lugar, como consecuencia de la alteración de los queratinocitos epidérmicos que lleva a la degradación del ácido araquidónico de las membranas celulares, se liberan metabolitos mediadores de la inflamación (prostaglandinas, interleuquinas, cininas, etc.). Éstos, parecen ser los responsables de los cambios vasculares de la piel sometida a irradiación (expresada inicialmente por eritema cutáneo) a través de la regulación de la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular y de la migración de células sanguíneas a la dermis (Svobovova, 2006). También los neutrófilos al activarse producen mieloperoxidasa, que cataliza la producción de ROS, mientras que los monocitos y los macrófagos fagocitan los restos tisulares. Por otra parte, las células de la inflamación segregan factores quimiotácticos y factores de crecimiento que promueven un mayor reclutamiento de células inflamatorias y la reparación de tejidos dañados (Wilgus, 2003).

Un segundo mecanismo corresponde a la producción de distintos tipos de radicales libres que van a ser responsables de la degradación de las proteínas dérmicas (colágeno, elastina, etc.), fundamentales en la producción de elastosis solar o actínica, que llevan clínicamente a la formación de arrugas cutáneas e incluso las mutaciones que pueden abocar en neoplasias (Scharffetter-Kochanek, 2000; Halliday, 2005).

Y el tercer mecanismo correspondería a la absorción directa de la energía por cromóforos de la epidermis (ADN, ARN, melanina, ácido urocánico, lípidos y proteínas) que van a dar lugar a la formación de fotoproductos, especialmente dímeros de pirimidina que absorben diferentes longitudes de onda específicas (Young, 1997). Éstas, al liberarse posteriormente originan reacciones fotoquímicas con producción de daño genético directo y de mutaciones que constituyen la base de la fotocarcinogénesis, y que fundamentalmente se ha relacionado con las longitudes de onda corta de las RUV B y A (Brash, 1997; Young, 1998).

También se produce daño oxidativo directo por efecto de las reacciones de fotosensibilización endógena en relación con estas longitudes de onda mayores de la RUV A (Burren, 1998). Este daño celular va a generar, a su vez, la liberación de diversos mediadores químicos de la inflamación con las acciones descritas en primer lugar junto a la acción moduladora sobre

otros tipos celulares como queratinocitos, células de Langerhans, fibroblastos, etc.

En nuestro modelo, las primeras alteraciones clínicas que se presentaban tras la irradiación de los animales del grupo I correspondían a la presentación de **eritema difuso**, observado en todos los animales de los distintos grupos. Se desarrollaba en toda la zona del dorso de los animales y ocurría desde la primera sesión. Era de carácter pasajero durante las primeras sesiones, aunque a partir de la sesión 15 se volvía de carácter permanente y de color rojo violáceo presentando aspecto reticular o telangiectásico característico. El eritema consiste en la respuesta cutánea aguda más evidente y conocida tras la exposición a las radiaciones UV. Está justificada por el primer mecanismo antes descrito como consecuencia directa del daño vascular dérmico.

No obstante, el mecanismo íntimo no está bien establecido, pues no se conocen con precisión los cromóforos responsables, pero parece que junto al daño directo de la RUVB y la RUVA de onda corta sobre el ADN, se sumaría el daño oxidativo indirecto secundario a las reacciones endógenas de fotosensibilidad, además de la posible acción del óxido nítrico como causa de la vasodilatación que según el estudio de Suschek (2006), es producido por los queratinocitos después de la irradiación UVB.

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

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

Asimismo, el aumento de los niveles cutáneos basales de histamina disminuye dentro de las primeras 24 horas, lo que indica la presencia de otros mediadores, como las prostaglandinas y el ácido araquidónico, que están elevadas a las 6 horas y alcanzan un pico máximo entre las 18 y 24 horas

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

También se ha demostrado que después de la irradiación UV, los inhibidores de las prostaglandinas, como la indometacina, reducen la intensidad de la fase inicial de eritema por RUV B hasta 24 horas; sin embargo, la fase más tardía se mantiene sin cambios (Ibbotson, 1996). Asimismo, el ácido araquidónico y las prostaglandinas E2 y F2 α muestran niveles elevados a las 6 horas de la exposición, alcanzando un pico máximo entre 18 y 24 horas, cuando la reacción inflamatoria está en su apogeo, y regresan a valores basales a las 48 horas, momento en el que el eritema ha disminuido parcialmente. Por otro lado, se ha comprobado la presencia en la piel irradiada de bradiquinina en las primeras fases de la inflamación (Black, 1978).

Además se ha descrito que tanto la RUVA como la RUVB producen cambios en la dermis, como consecuencia de la degranulación de las células cebadas que ocurre durante las primeras 24 horas tras la irradiación, seguido por una rápida recuperación hasta la normalidad. Además se ha observado un

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

En nuestro modelo, los cambios microscópicos más llamativos en estas áreas cutáneas correspondían al aumento y dilatación de la red capilar, que mostraba frecuentes dilataciones y un aspecto tortuoso, así como aumento de la sustancia intercelular que originaban el ensanchamiento de la dermis papilar, estos hechos creemos que explican el eritema que presentaban clínicamente los animales.

En patología humana, las siguientes alteraciones cutáneas tras el eritema corresponden al bronceado por aumento de la pigmentación melánica. Se debe a la oxidación de la melanina y a la migración de los melanosomas desde su localización perinuclear hasta las dendritas periféricas, y su transferencia hasta el citoplasma de los queratinocitos y otras células vecinas (Hönigsmann, 2002). En los animales de nuestro estudio, sin embargo no pudimos observar el bronceado ya que son

animales albinos en los que no funciona el sistema de la melanogénesis.

Otro efecto observado tras la irradiación correspondió al endurecimiento cutáneo también denominado “hardening” consistente en el engrosamiento de la capa cornea y el estrato de Malpighio (acantosis). Aunque clásicamente se consideraba que las exposiciones aisladas a RUV A no aumentaban el espesor de la epidermis, las exposiciones repetidas y continuas pueden hacerlo, como hemos observado en nuestro estudio, en el que todas las zonas cutáneas expuestas a las radiaciones experimentaron hiperplasia de los queratinocitos, alcanzando gran espesor del epitelio en algunas zonas. Este fenómeno representa un mecanismo de protección frente a las radiaciones UV. En este modelo, a partir de las 25 sesiones toda la zona cutánea del dorso mostraba engrosamiento irregular de aspecto granular difuso que se acompañaba con frecuencia de superficie escamosa y un marcado patrón geométrico de la piel.

Las siguientes alteraciones desarrolladas correspondían a arrugas cutáneas, que se observaban a partir de las 32 sesiones. Inicialmente eran de disposición longitudinal en todo el dorso de los animales y alternaban con otras zonas cutáneas de engrosamiento irregular. Estas lesiones se mantenían durante todo el experimento y se acompañaban de engrosamiento nodular difuso y progresivo; además, en las zonas con lesiones

neoplásicas, las arrugas se disponían en forma radial a los tumores.

En nuestro modelo en estas áreas destacaba microscópicamente en la dermis el engrosamiento marcado, tanto de la papilar, por aumento y disposición tortuosa de los capilares sanguíneos y de la red capilar subpapilar, como de la dermis reticular, y sobre todo la desestructuración del entramado fibrilar. También observamos con frecuencia, áreas irregulares de fibrosis, con múltiples focos de infiltrados de linfocitos y células plasmáticas.

La mayor alteración de la piel en el fotoenvejecimiento, según la bibliografía, corresponde al depósito de material elástico anormal, que corresponde a la denominada **elastosis solar**. La radiación UV provoca en la dermis una reacción molecular en cadena, que origina un trastorno del metabolismo con aumento de metaloproteinasas de la matriz que estimulan la producción de colagenasa, gelatinasa y estromelisin-1 de los fibroblastos y queratinocitos. El resultado es la desorganización del colágeno y de la elastina, así como otros componentes de la matriz extracelular dérmica. La exposición repetida a la radiación UV hace que la reparación de la matriz dérmica, sea cada vez más deficiente, con un efecto acumulado sobre la estructura y organización del colágeno (Kyung, 2011). Cuando la piel está sometida a ciclos repetidos de exposición a la RUV, se

hace visible a simple vista en forma de flacidez de la piel y formación de arrugas (Kang, 2003).

Bernstein (1995) demostró en ratones, que la elastosis solar está acompañada por un aumento de elastina y fibrilina ARNm y la regulación positiva de la actividad del promotor de la elastina. En las alteraciones microscópicas observadas en nuestro modelo, destacaban los fenómenos de desorganización de la estructura general así como la disposición del entramado de las fibras colágenas y elásticas, distinguiéndose tres grados de disposición: uno, en el que predominaban las fibras mal organizadas, dispuestas preferentemente de forma individualizada, que se conoce como elastosis solar grado I; otro, en el que las fibras con estas características alternaban con zonas en las que se disponían en cúmulos irregulares y compactos de elastina, ligeramente basófilos o grado II; y por último, en el que observamos un predominio marcado de los cúmulos compactos de elastina o de grado III.

La radiación UV también es la responsable del incremento de la actividad catalítica de diversas metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP), con lo que se favorecería en principio, el recambio de las proteínas y glucosaminoglicanos dañados por las radiaciones. Además, la agresión actínica acelera la infiltración de leucocitos neutrófilos en el seno de la dermis, que secretan una elastasa de amplio espectro, muy

activa en el proceso de degradación de diversas moléculas de la matriz extracelular: elastina, fibronectina y diversos glucosaminoglicanos (Rijken, 2004; 2005).

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

Existen TIMP naturales y sintéticos, como algunos derivados de tetraciclinas. Los TIMP endógenos son proteínas que se secretan en respuesta a una sobreproducción de MMPs. TIMP-1 es más potente que TIMP-2 y TIMP-3 frente a MMP-1, MMP-3 y MMP-9. En este sentido, algunas sustancias naturales como la melatonina han demostrado capacidad para inhibir la

expresión de las MMPs (especialmente la 2 y la 9) y favorecer la activación de los TIMP en diversos tipos de cáncer.

Los TIMPs son considerados como elementos anti-invasivos y anti-metastásicos en el cáncer. Por este motivo, decidimos realizar el marcaje inmunohistoquímico de TIMP-1 en los tumores desarrollados en los animales de nuestro estudio.

Por otra parte, la liberación de esta elastasa por los neutrófilos requiere la previa activación de receptores específicos presentes en la membrana plasmática de estos leucocitos, en especial los conocidos con el nombre de β -integrinas. Diversos estudios han demostrado que los ligandos más característicos de estos receptores son citosinas (IL-8, TNF- α) liberadas como consecuencia de la radiación UV (Shapiro, 2002; Chua, 2006).

Estudios realizados durante los últimos años han permitido identificar enzimas que incluyen átomos metálicos (Zn) en su molécula, conocidas como MMP, antes denominadas colagenasas, elastasas, etc. Esta actividad de degradación también incluye algunas serinproteasas, e incluso proteasas inespecíficas, y depende de la intensidad de la agresión de la RUV. Los fibroblastos no sólo sintetizan proteínas poco funcionales, sino que también incrementan los niveles de MMP; algunas células sanguíneas, como los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos también liberan MMP en el

especio extracelular dérmico. Además, se ha demostrado que algunas MMP degradan la fibrilina de las microfibrillas que rodean la elastina (Muto, 2007; Rijken, 2009).

El primer estudio encontrado en la bibliografía sobre la producción de elastosis en un ratón sin pelo (de la cepa albina Ng/) corresponde al de Berger en 1980. También hemos encontrado descrito en la bibliografía, entre los cambios inducidos por la radiación UV en la dermis de ratones SKH-1, alteraciones de las fibras elásticas, degradación del colágeno y glicosaminoglicanos, asociados con la alteración de la actividad de las metaloproteinasas de la matriz. De modo que los ratones expuestos de forma crónica a la radiación UV desarrollaban arrugas, como importantes pliegues longitudinales en el dorso como las que describimos en los animales de nuestro estudio.

Asimismo, otros estudios han demostrado que la expresión de MMPs por parte de los fibroblastos puede ser una consecuencia de la actividad del **óxido nítrico (NO)**. Este radical gaseoso es una molécula mensajera multifuncional formada a partir de la L-arginina por enzimas como la óxido nítrico sintetasa (iNOS). Los fibroblastos dérmicos que expresan MMPs también se hallan sometidos a la influencia de las moléculas mensajeras que liberan los queratinocitos irradiados y también se ha comprobado que los queratinocitos expuestos a la radiación UV sintetizan y liberan NO, el cual es capaz de

dispersar la síntesis de melaninas por los melanocitos (Reelfs, 2004).

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

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

Diversos estudios experimentales con modelos animales han confirmado que la porción más corta y más energética del espectro UV (UVB) es responsable de la desestructuración del tejido conectivo dérmico observado en la piel fotoenvejecida. Más recientemente, se ha demostrado que los rayos UVA y la radiación infrarroja contribuyen de manera significativa al

fotoenvejecimiento, produciendo, entre otros cambios, elastosis severa. Debido a que las tres bandas de ondas amplias están inseparablemente unidos en la luz solar terrestre, todos son motivo de preocupación en el fotoenvejecimiento de la piel humana (Kligman, 1989).

Las siguientes alteraciones macroscópicas relevantes, desarrolladas a partir de las 40 sesiones de irradiación correspondían a las lesiones eritemato-escamosas, que se solían disponer en placas irregulares, con el centro de aspecto erosivo y los bordes sobreelevados recubiertas por costras fibrino-hemorrágicas. También se observaban, en toda la superficie cutánea del dorso áreas de engrosamiento cutáneo irregular de aspecto queratósico, firmes al tacto, e incluso con fijación a tejidos subyacentes.

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

Las lesiones neoplásicas eran manifiestas a las 60 sesiones de irradiación. Estas lesiones eran generalmente múltiples, la mayoría desarrolladas sobre las zonas de engrosamiento queratósico y muchas estaban ulceradas con bordes irregulares

y engrosados. Con menos frecuencia, las lesiones tumorales adoptaban un aspecto verrucoso con la porción central deprimida recubierta de costra queratósica. Microscópicamente correspondían a múltiples áreas de carcinoma “in situ”, así como focos de carcinoma microinvasor o carcinomas de células escamosas.

En los estudios centrados en el desarrollo de queratosis actínica con ratones *hairless*, se consigue generar estas lesiones en periodos más cortos (30 sesiones de irradiación) (Burns, 2012).

En estudios previos de nuestro grupo de trabajo (Gil Ortega, 2014; Ruiz Sánchez, 2014) también observamos que hacia la sesión 60 de irradiación el 100% de los animales del grupo sometido exclusivamente a irradiación presentaba todo el espectro del proceso neoplásico.

En nuestro estudio, en los animales del grupo control las lesiones epiteliales malignas eran muy frecuentes, pues afectaban al 92% de los animales al final del mismo y al contrario que en la patología humana, en este modelo de carcinogénesis cutánea experimental, no se observaron carcinomas de células basales ni melanomas, correspondiendo todas a carcinomas espinocelulares.

La alta incidencia de carcinomas en el grupo control demuestra la eficacia del modelo experimental desarrollado,

que consideramos como un modelo idóneo para el estudio del fotoenvejecimiento cutáneo y la fotocarcinogénesis. La radiación UV se considera un carcinógeno de tipo completo, ya que actúa tanto como iniciador de la carcinogénesis a través de la mutación del ADN, como promotor del crecimiento neoplásico a través de los procesos inflamatorios secundarios a la exposición a la RUV acumulativa (Ismail, 2011). La Agencia de Investigación del cáncer de la OMS, incluyó a las radiaciones ultravioleta en el grupo 1 de agentes carcinógenos (Landrigan, 2011).

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

El PCNA es una proteína ácida nuclear no histona, molécula de 36-KDa con 261 aminoácidos con alto contenido glutámico y aspartato (Almendral, 1987) que funciona como molécula accesoria de la ADN polimerasa y que se requiere en el proceso de la síntesis del ADN en la fase S del ciclo celular. Esta proteína fue descubierta en 1978 mediante el estudio de anticuerpos en pacientes con lupus eritematoso (Miyachi, 1978) y funciona como adyuvante de la síntesis de DNA (Bravo, 1987; 1992). El PCNA se asocia fuertemente con regiones donde está ocurriendo síntesis de ADN y se correlaciona con otros marcadores de proliferación celular como Ki67 y mitosis, expresándose en células que se encuentran en proliferación activa. Se ha encontrado que la reacción inmunohistoquímica con este marcador es útil en la predicción de agresividad en algunos tumores con una tasa de proliferación alta (Kelman, 1997; Ben-Ihzak, 2002).

Casi todas las mutaciones originadas experimentalmente por la RUV A y B se localizan en las pirimidinas adyacentes, y alrededor de dos tercios son mutaciones distintas (Brash, 1991). El tercio restante también son generadas por las radiaciones ultravioleta, pero probablemente surjan a partir de la producción de ROS (Wondrak, 2006).

Los **radicales libres** o especies reactivas de oxígeno son moléculas en las que existen electrones desapareados en su

orbital externo. Las radiaciones UV son el principal mecanismo externo al organismo que provoca la formación de estas especies reactivas. Estos radicales libres reaccionan con moléculas de la matriz extracelular como el colágeno y la elastina provocando su oxidación y la fibrosis en los vasos dérmicos. Además afectan a la expresión de genes de transducción de señales implicados en la proliferación y la apoptosis celular lo que conduce a la carcinogénesis (Magliano, 2014).

Uno de los mecanismos moleculares implicados en el cáncer cutáneo es el intercambio de las bases nitrogenadas T por G, originando dímeros de pirimidina (T-T). Estos intercambios se observan raramente con las UVB u otros carcinógenos, por lo que se considera que sean consecuencia de la RUV A (Halliday, 2005), presente en la radiación utilizada en nuestro estudio.

La radiación UVA es extremadamente cancerígena pues penetra más profundamente en el interior de los tejidos cutáneos, causando degradación de la dermis. Esta degradación tiene lugar por la activación de citoquinas y enzimas colagenasas, elastasas, etc. Dichas enzimas aceleran aún más la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que provocan daños en el ADN (de Gruijl, 1993; 2000; 2002).

Además se ha descrito que puede dar lugar a alteraciones genómicas, como translocaciones cromosómicas.

Por otro lado, la radiación UVB interactúa con la epidermis, causando la activación de las enzimas que alteran el ADN, lo que conduce a patologías como la inflamación, la degradación de la elastina, la proliferación celular, etc. Es más cancerígena que la radiación UVA en la inducción experimental de carcinoma de células escamosas. El impacto de la radiación UVB puede deducirse claramente de las mutaciones puntuales características de p53 que se encuentran en el SCC humano y el BCC (Gupta, 2014).

El segundo objetivo de nuestro trabajo correspondía al estudio de los efectos de la **aplicación de ingenol mebutato y paclitaxel** sobre las lesiones desarrolladas.

En el tratamiento del fotoenvejecimiento se han utilizado una serie de **antioxidantes** naturales cuyo empleo de forma tópica puede contrarrestar el daño producido por las radiaciones UV sobre la piel, los de origen vegetal consisten sobre todo en polifenoles, como los flavonoides o los estilbenos y terpenos como los carotenoides (Magliano, 2014) que también han sido ensayados previamente en otros estudios de nuestro grupo de investigación. Asimismo, algunas especies **botánicas** como la uña de gato, granada, uva, soja, café, regaliz o el té verde han demostrado retrasar la aparición de carcinomas al

administrar sus extractos a ratones expuestos a radiación UV (Menter, 2014).

El tratamiento de este tipo de lesiones cutáneas puede estar dirigido a la eliminación de una **lesión aislada** o al tratamiento de toda una **zona de la piel**.

Entre las terapias dirigidas a una lesión aislada se engloban un grupo de técnicas de **tipo físico** entre las que destacan la cirugía micrográfica de Mohs, el curetaje y la electrodesecación. Las lesiones también pueden ser destruidas mediante criocirugía, láser de CO₂, radioterapia o terapia fotodinámica (Marini, 2008).

Además existen una serie de **fármacos** para el tratamiento tópico de las lesiones pre-cancerosas o queratosis actínica, que afectan a toda una zona de la piel, entre las que destacan el 5-Fluorouracilo, el imiquimod y el diclofenaco. En este sentido, y al tratarse de tratamientos tópicos se esperaba que la absorción fuera mínima, y por tanto que sus efectos se limitaran a las alteraciones en la piel, no obstante todos ellos pueden provocar efectos no deseados a nivel sistémico (Kircik, 2016).

Otra batalla contra la que tienen que luchar los tratamientos tópicos para esta patología consiste en la falta de adhesión por parte de los pacientes. En ésta intervienen múltiples factores como la percepción por parte del paciente del bajo riesgo que comportan estas lesiones, la aparición de

efectos no deseados asociados al tratamiento, las múltiples aplicaciones diarias requeridas por algunos productos y, la que consideran los expertos como más relevante, la larga duración de la mayor parte de los tratamientos que provoca el abandono de la terapia. Se estima que en los tratamientos tópicos que exceden las 5 semanas de duración se aumenta exponencialmente la tasa de abandono (Shergill, 2013).

Tras la irradiación y el tratamiento, el período de observación se fijó en nuestro trabajo en un mes, aunque otros autores han empleado períodos más prolongados, existiendo estudios en que los animales son observados durante 8 y hasta 21 semanas (Cozzi, 2012) o incluso un año (Stockfleth, 2015), asegurándose así la eficacia del fármaco en la prevención de la recidiva de los tumores.

En nuestro estudio hemos utilizado el **ingenol mebutato (Grupo II)** aplicado de forma tópica durante 3 días, ya que es el fármaco con menor duración de tratamiento por lo que se podría esperar que fuera el tratamiento de elección para los pacientes. Su mecanismo de acción rápido es una de las principales ventajas frente a otros tratamientos que precisan la aplicación a lo largo de varias semanas o incluso meses, lo que puede provocar su abandono. Además, no pasa a la circulación sistémica, incluso cuando las áreas tratadas son amplias y se

encuentran ulceradas, por lo que sus efectos adversos se limitan a la zona de lesión (Anderson, 2009; Le, 2009).

Para ejercer su acción este fármaco, atraviesa el estrato córneo gracias a la Glicoproteína-P y actúa en la dermis e hipodermis mediante un doble mecanismo (Aditya, 2013). En primer lugar, hay una rápida toxicidad celular que es detectable una hora después de su aplicación y conduce a la muerte celular dentro de las 24 horas siguientes. En segundo lugar, se produce una citotoxicidad mediada por anticuerpos, que se dirige a las células epidérmicas displásicas restantes y se liberan radicales libres de oxígeno, entre otros agentes líticos, que provocan la destrucción de éstas (Ogbourne, 2004; Rosen, 2012). A las 48 horas de la aplicación se observa una fuerte tinción de **Ki67** que sugiere la rápida replicación de los queratinocitos (Cozzi, 2012). Este rápido mecanismo de destrucción celular explica el gran aumento del área de lesión que se produce durante el tratamiento, y que alcanza el máximo nivel el cuarto día tras el inicio del tratamiento (Hofbauera, 2014).

En este sentido, los ratones del grupo tratado con ingenol mebutato **quintuplicaron el área media de lesión** con respecto a la etapa previa y ésta fue significativamente mayor que en el resto de los grupos tras el tratamiento (2,18cm²). Esto pone de manifiesto la rápida afectación de la piel. Esta reacción puede llegar a ser muy antiestética, provocando su rechazo por parte

de los pacientes que pueden preferir tratamientos más prolongados con un mecanismo de eliminación más progresivo. Sin embargo, la piel recupera la normalidad en torno al mes de tratamiento (Anderson, 2014), mostrando una enorme reducción del área media de lesión (0,41 cm²) tanto en comparación con su estado en el período previo como al compararlo con el mismo período entre el resto de los grupos. Por lo que, al final del estudio, los ratones tratados con ingenol mebutato (II) fueron los que presentaron mejor respuesta clínica.

La utilización de este fármaco se centra fundamentalmente en el tratamiento de las lesiones premalignas o queratosis actínica, para evitar su evolución y desarrollo de neoplasias malignas. Además, al ser capaz de atravesar el estrato córneo y alcanzar la dermis, se considera que puede presentar también efecto sobre los carcinomas de células escamosas que ya hayan infiltrado la dermis. En este sentido, desde el punto de vista del estudio microscópico, el grupo tratado con este fármaco desarrolló carcinoma espinocelular de tipo invasor en 9 animales (75%) y en los 3 restantes observamos lesiones precancerosas de distinto grado desde displasia hasta carcinoma microinvasor.

Este efecto parece ser debido a su actuación a nivel del **gen TP53** mediante la reducción de clones celulares con

alteraciones en dicho gen habiéndose descrito una reducción de estas mutaciones en un 70% (Cozzi, 2013).

Las **alteraciones de TP53** son las principales mutaciones desarrolladas en las especies expuestas a este tipo de radiación; de modo que en el 50% de los carcinomas de células escamosas en humanos se ha podido demostrar esta modificación (Yaar, 2002; Chen, 2008). En animales de experimentación, tales mutaciones a nivel de TP53 se producen precozmente en el curso de la irradiación UV, antes de que la atipia nuclear sea evidente y los tumores puedan ser detectados (Ananthaswamy, 1998); asimismo, también ha sido descrita en la piel humana dañada por el sol crónicamente (Nakazawa, 1994). Estas observaciones sugieren que las mutaciones en TP53 son un primer paso importante en la desregulación del crecimiento celular epidérmico en la vía que conduce a su malignización.

El gen TP53 es un supresor tumoral que participa en la apoptosis, el control de la proliferación celular y la respuesta de la piel al daño solar. Si el ADN en una célula epidérmica tiene un daño irreparable, la proteína p53 puede inducir la muerte celular. Sin embargo, si la RUV causa una mutación en este gen y lo vuelve afuncional, la célula dañada continúa reproduciéndose y degenera en una neoplasia. De este modo, la positividad inmunohistoquímica para p53 se incrementa a medida que las lesiones neoplásicas epidérmicas van progresando (Arévalo-

Suarez, 2006). Esta mutación es un proceso que se desarrolla en múltiples pasos: inicialmente se produce un cambio de C por T o de CC por TT, se produce la proliferación celular y finalmente la progresión a CCE (Benavides, 2009; Handoko, 2015).

En el estudio se realiza el estudio inmunohistoquímico de p53 pero no se obtiene expresión de dicha proteína en los distintos grupos estudiados.

El otro agente que hemos utilizado en el tratamiento de las lesiones en nuestro estudio fue **paclitaxel**. Se trata de una molécula capaz de inhibir la mitosis de células tumorales que además presenta actividad antiangiogénica y antiinflamatoria (Ehrlich, 2004); así como capacidad de inhibir la síntesis de colágeno y la hiperplasia de fibroblastos (Huang, 2015). Por estas propiedades, ha sido utilizado en la clínica por vía intravenosa en una amplia gama de enfermedades oncológicas (que no incluye el cáncer cutáneo no-melanoma). Dada su elevada toxicidad, se han investigado variaciones en la molécula para reducir el perfil de efectos adversos (Yared, 2012), como su formulación junto a albúmina, o bien encapsulado o en micelas (Han, 2006; Hennenfent, 2006; Ma, 2013).

También se ha estudiado su utilización en el tratamiento de **patologías no tumorales** de tipo inflamatorio, fibrótico, así como de tipo isquémico para el recubrimiento de stents arteriales (Zhang, 2014).

En patologías cutáneas se ha ensayado en conejos para el tratamiento de escaras hipertróficas mediante su inyección directa sobre las lesiones, consiguiendo la reducción de la hiperplasia de los fibroblastos, el depósito de colágeno y la microangiogénesis (Huang, 2015).

La **psoriasis** ha sido otra patología diana de los estudios con paclitaxel, en la que se ha ensayado en forma de micelas que, administradas por vía intravenosa, conseguía una mejoría del paciente con relativamente buena tolerancia (Ehrlich, 2004; Zhang, 2014) o por medio de la aplicación tópica de nanoemulsiones de paclitaxel mediante el uso de parches dérmicos en ratas (Khandavilli, 2007) o en forma de cremas (Kilfoyle, 2012; Paolino, 2012).

En la revisión bibliográfica realizada sólo hemos encontrado referencia a un estudio “in vitro” realizado por Paolino (2012). En éste se ensayaba la aplicación de paclitaxel sobre **líneas celulares de carcinoma de células escamosas**, y demostraba su capacidad de inhibir su proliferación y provocar la muerte celular. Al tratarse el paclitaxel de una molécula muy hidrofóbica, se acumula en el estrato córneo y no penetra a capas más profundas de la piel como la dermis, donde debe ejercer su efecto. Para conseguir su penetración hasta la dermis en este estudio el paclitaxel era encapsulado en partículas coloidales (Paolino, 2012).

Por lo que nuestro trabajo sería el primer trabajo “in vivo” en el que se ha ensayado la aplicación de paclitaxel en **animales de experimentación** para el tratamiento de la **queratosis actínica y su evolución a carcinoma de células escamosas**.

En nuestro estudio, el paclitaxel ha sido utilizado en forma líquida formulado junto al polímero **Gantrez®** para su aplicación sobre la zona lesionada mediante un pincel. Esta sustancia posee propiedades adhesivas que permiten un mayor tiempo de contacto del principio activo con la piel a tratar.

El Gantrez® también ha sido empleado en inmunoterapia para la formulación del alérgeno en los que actúa como adyuvante mediante dos mecanismos: aumentando la captura del alérgeno por las células presentadoras de antígeno (CPAs) y activando directamente las células del sistema inmune (Ferrer, 2012).

Asimismo, en la revisión bibliográfica realizada hemos encontrado referencia a su utilización en estudios “in vitro” junto a una sustancia de carácter hidrofóbico que contiene una molécula de aluminio. Con esta sustancia se han tratado, mediante terapia fotodinámica, lesiones cancerosas en tejido mamario y no cancerosas en lesiones formadas por fibroblastos cutáneos (Muelhmann, 2014).

El paclitaxel fue utilizado en nuestro estudio en los ratones de los grupos **III con 5% GES tópico durante 3 semanas**,

IV con 5% GES 6 semanas, V con 1,2% GES 3 semanas y VI con 1,2% GES 6 semanas.

En los animales que iban a ser tratados con paclitaxel se observó una extensión media de sus lesiones entre 0,64 y 0,91 cm² al finalizar la irradiación. Tras la aplicación de los tratamientos, el **grupo III (5% GES 3 semanas)** mostraba un aumento de la extensión media de las lesiones (1,51 cm²), que era mayor que en el resto de grupos, y al finalizar el correspondiente mes de descanso, fue el grupo que presentaba **una menor área media de lesión (1,89 cm²)**.

Un efecto similar, aunque provocado en menos tiempo de tratamiento, fue observado en el grupo tratado con ingenol mebutato (II). Ante estos hechos consideramos que ambas moléculas producen el desarrollo de reacciones antiestéticas durante el tratamiento, que en el caso de paclitaxel es más progresiva y de menor magnitud aunque tras un mes desde la aplicación no supera la tasa de eliminación conseguida con ingenol mebutato (II), obteniéndose un área media final de lesión de 0,41 cm² en éste y de 1,89 cm² en el grupo de paclitaxel que mejor respuesta clínica mostraba (III).

A pesar de que clínicamente mostraron mayor área de lesión los grupos tratados con paclitaxel, y por tanto peor resultado estético; la ventaja residía en que a nivel **microscópico**

las lesiones más graves se presentaron en los grupos Control (I) y el de Ingenol mebutato (II).

Desde el punto de vista microscópico, entre los animales de los grupos que en nuestro estudio fueron tratados con paclitaxel, los pertenecientes a los grupos **III (5% GES 3 semanas)** y **VI (1,2% GES 6 semanas)**, mostraron resultados similares, desarrollando carcinomas invasores 8 (66,7%) de los animales; teniendo en cuenta que los ratones del grupo VI se expusieron al fármaco el doble de tiempo que los del grupo III.

Finalmente el grupo **V (1,2% GES 3 semanas)** fue el que mostraba mejor respuesta a nivel microscópico, al desarrollar carcinoma invasor sólo en 5 (45,4%) de los ratones, lo que supone una reducción de la incidencia de tumores a la mitad respecto a los desarrollados por los animales del grupo control.

Tradicionalmente, nuestro grupo de investigación ha estudiado la fotocarcinogénesis en varios modelos durante el período de irradiación (Ruiz Sánchez, 2014), tras el cual los animales eran sacrificados, obteniendo tasas de reducción de carcinomas invasores respecto al control elevadas (reducción hasta del 77%). Probablemente en nuestro modelo no hayamos observado tal efecto debido al período de estudio tras la irradiación más prolongado (7 ó 10 semanas, según la duración del tratamiento) que permitió la progresión tumoral de aquellas lesiones precancerosas ya iniciadas.

Otro de los estudios de nuestro grupo de investigación, realizado por Gil Ortega (2014), analizó los efectos de los extractos de aceite de almendras dulces y de aceite de crisálida sobre un modelo similar de fotoenvejecimiento, con los que lograba la reducción de la incidencia de carcinoma invasor en torno al 17 y 30%, respectivamente; de manera similar a los estudios de Cano Gómez (2014) que lograba la reducción del 40% mediante la aplicación de ácido carnósico y rosmarínico y de Belmar Ruiz (2014) que alcanzaba el 90% de reducción de CCE mediante la aplicación de extracto de granada. Puesto que en dichos trabajos se emplearon sustancias naturales, y en el presente estudio se utiliza un fármaco de origen semisintético, y por consiguiente de mayor pureza, consideramos que este hecho justifica la mayor capacidad de paclitaxel para detener el proceso de progresión neoplásica de las células con daño actínico.

En nuestro trabajo, de modo similar a lo observado en los distintos modelos desarrollados por nuestro equipo, todas las neoplasias malignas desarrolladas correspondían a carcinomas de células escamosas, en las que no podíamos distinguir entre los carcinomas basocelulares y los espinocelulares.

Actualmente en el proceso patológico del fotoenvejecimiento se le otorga gran trascendencia a las alteraciones que ocurren a nivel de la **dermis**, es decir, a la

elastosis solar o actínica. En ellas se han implicado la actuación de las enzimas, las **metaloproteinasas de la matriz (MMPs)** cuyas funciones y papel en la progresión del cáncer han sido estudiadas con gran interés en los últimos años. También algunos estudios clínicos han señalado aspectos prometedores respecto a la expresión de inhibidores de MMP, aunque con resultados muy limitados. En este sentido, la utilización de agentes de origen natural como drogas frente a MMP para evitar la proliferación del cáncer cutáneo no melanoma provocado por la exposición solar crónica a las radiaciones solares ha supuesto una innovación en el tratamiento farmacológico clásico de esta enfermedad. La degradación de la matriz extracelular (MEC) se produce por la actividad de diversas enzimas proteolíticas (proteasas), conocidas como metaloproteinasas (MMPs). La gran familia de las MMPs puede dividirse en 8 clases atendiendo a su estructura. La característica común a todas ellas es la presencia de un pre-dominio N-terminal al que sigue un pro-dominio que guarda una fuerte asociación con el zinc y el calcio y otros dominios catalíticos. Otro aspecto común en la estructura de las MMPs es el dominio para el enlace de colágeno, implicado en la unión al colágeno, elastina, ácidos grasos, etc. Por otra parte, además de en los mecanismos de progresión del cáncer, las MMPs están

relacionadas con un gran número de aspectos patológicos (Fisher, 1998; 2002; 2008).

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

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

La expresión y la activación de enzimas proteolíticas es necesaria para la invasión y metástasis de los tumores malignos (Franchi, 2002). Las MMPs son una familia de enzimas proteolíticas que tienen la capacidad de degradar la matriz extracelular (especialmente el colágeno tipo IV), por lo que su papel es crítico en la progresión tumoral, angiogénesis y metástasis de muchos tumores humanos (Ohashi, 2000). Entre las diferentes técnicas que pueden ser empleadas para la detección y cuantificación de dichas enzimas, la inmunohistoquímica presenta ciertas ventajas, entre las que se encuentran la correlación directa con la morfología y la posibilidad de su estudio desde tejidos incluidos en parafina. Sin embargo, existen algunas desventajas, como la imposibilidad de distinguir entre enzimas latentes y activas, que sí es posible realizar con enzimografía (Curran, 1999). En nuestro estudio, el marcaje con MMP-9 fue severo en el caso de los carcinomas microinvasores, carcinomas in situ y displasia de grado III, mientras que en los tumores infiltrantes, existía un marcaje moderado o leve en el interior del tumor, que se hacía más intenso en la periferia (frente de invasión tumoral). Según algunos autores (Gupta, 2014), la mayor actividad de estas enzimas se daría en estadios iniciales de la carcinogénesis, para descender posteriormente. Esta podría ser la explicación de los resultados observados en nuestro estudio. Algunos trabajos han

demostrado la relación entre la expresión de MMP-9 y la agresividad de diversos tumores epiteliales, hecho que podría ser utilizado como factor pronóstico y terapéutico (Katayama, 2004). Sin embargo, la literatura científica no es clara aún al respecto. Así, mientras algunos autores coinciden con la teoría que acabamos de comentar, en otros estudios, como el de Poswar (2013) no encuentran diferencias significativas en la expresión de MMP-9 en muestras de carcinomas espinocelulares cutáneos humanos, al compararlas con basocelulares y lesiones de queratosis actínica y en otros, como el de Werner (2002), la mayor expresión de MMP-9 se observó en tumores evolucionados, pudiendo establecerse una correlación entre agresividad (fenotipo invasor) y el marcaje. De hecho, en dicho estudio, la sobreexpresión de MMP-9 se relacionaba estadísticamente con la metástasis linfática y el estadio clínico.

En definitiva, son necesarios más estudios para indagar en los mecanismos íntimos de la relación entre la producción de MMPs y los procesos de invasión y metástasis, pero parece que el mecanismo de acción principal sería la promoción de la angiogénesis, que se ve favorecida por el microambiente idóneo que provoca la degradación de la matriz extracelular (Franchi, 2002).

Existen **inhibidores de los MMPs** naturales (**TIMP**) y sintéticos, como algunos derivados de tetraciclinas. Los TIMP endógenos son proteínas que se secretan en respuesta a una sobreproducción de MMPs. TIMP-1 es más potente que TIMP-2 y TIMP-3 frente a MMP-1, MMP-3 y MMP-9. En este sentido, algunas sustancias naturales como la melatonina han demostrado capacidad para inhibir la expresión de las MMPs (especialmente la 2 y la 9) y favorecer la activación de los TIMP en diversos tipos de cáncer.

Debido al papel inhibitorio de los TIMPs sobre las MMPs, éstos son considerados como moléculas anti-invasivas y anti-metastásicas, por lo que han sido múltiples los estudios que se han realizado para intentar correlacionar la expresión de unos y otras. Algunos de ellos han demostrado cómo su inhibición o aumento de producción, podía hacer aumentar o disminuir respectivamente, la capacidad de invasión de los tumores estudiados (Alexander, 1992; Ahonen, 1998). Sin embargo, otros trabajos sugieren que los TIMPs podrían tener propiedades similares a los factores de crecimiento, que les proporcionarían papeles muy distintos en la progresión tumoral a los aceptados clásicamente (Gomez, 1997). En el caso particular de los tumores cutáneos, el papel de los TIMPs no es conocido en profundidad. En algunos experimentos de microarrays se ha detectado una baja expresión de RNAm de

TIMP en muestras de carcinomas espinocelulares, al compararlos con la piel normal (Haider, 2006). Sin embargo, *in vitro*, en un estudio realizado por Sand et al. (2012), no se detectó expresión de TIMP en una línea celular de SCC ni en queratinocitos sanos. En el estudio realizado por Poswar (2013) se comparó la expresión inmunohistoquímica de TIMP-3 en diferentes tumores cutáneos derivados de queratinocitos. Estos autores, aunque observaron un aumento de TIMP-3 en los tumores más agresivos, no pudieron establecer una correlación estadísticamente significativa con la MMP-9, concluyendo que TIMP-3 no juega ningún papel importante como antagonista de MMP-9 en tumores cutáneos no melanocíticos. En nuestro estudio, la expresión de TIMP-1 fue muy débil y escasa, por lo que tampoco consideramos que estas moléculas intervengan de manera importante en el proceso de carcinogénesis en nuestro modelo.

Teniendo en cuenta su papel como inhibidores de los MMPs, los TIMPs son considerados como elementos anti-invasivos y antimetastásicos del cáncer.

Los estudios realizados por Gil Ortega y Ruiz Sánchez, (2014) los resultados de la inmunotinción con MMP-9 en los grupo Control desarrollaban menor intensidad que los animales tratados, al igual que en anteriores estudios realizados con grupos de ratones más amplios (Poswar, 2013). Además, los

resultados de TIMP mostraban mayor marcaje para los grupos tratados que para los controles, con diferencias estadísticamente significativas en ambos trabajos.

Estos resultados sugieren que la inhibición de la carcinogénesis y de la progresión tumoral experimentada por los animales tratados con paclitaxel, podría deberse a la estimulación, por parte de ésta, de la producción de TIMP en el estroma tumoral.

Con respecto a la expresión de PCNA, los estudios previos de nuestro grupo como el de Belmar Ruiz (2014) mostraban en los animales de los grupos tratados una disminución del marcaje (39%, 19% y 20%) con respecto a la obtenida por el Control.

Estos resultados nos indican que los extractos estudiados contribuían 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. En nuestro trabajo, estudio, debido a que todos los animales fueron irradiados, observamos un aumento de células proliferantes en capas basales y suprabasales en todos los casos, pero el número de células positivas y la intensidad del marcaje fue menor en los grupos tratados que en el control.

Basándonos en los resultados obtenidos, podemos concluir que los distintos tratamientos a base de paclitaxel

consiguen reducir la incidencia de carcinomas con respecto al Control e incluso en comparación con el tratamiento estándar a base de ingenol mebutato. Concretamente el tratamiento con **paclitaxel 1,2% GES aplicado diariamente durante 3 semanas (V) fue el que consiguió mejores resultados**. Por lo que consideramos que este agente puede suponer una alternativa terapéutica de gran interés a la utilizada actualmente en la clínica.

VIII. CONCLUSIONES

1ª La exposición crónica, 65 sesiones, a radiación ultravioleta provocó todo el espectro lesional del fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis cutáneos.

2ª La aplicación de ingenol mebutato originó la reducción del 3% del área media de las lesiones cutáneas de los ratones de este grupo, así como una disminución del 17% de la incidencia de carcinoma de células escamosas.

3ª Entre los grupos tratados con paclitaxel ocurrió reducción de la incidencia de lesiones neoplásicas malignas que oscilaba entre el 55 y el 67%; siendo el paclitaxel+1,2% GES aplicado durante 3 semanas, el que originó la mayor reducción (47%) de la incidencia de carcinomas escamosos respecto al grupo control.

4ª En nuestro estudio la extensión clínica de las lesiones cutáneas no se correlaciona con la gravedad de las mismas.

5ª El estudio inmunohistoquímico mostró disminución de la expresión de PCNA en las lesiones cutáneas de los animales tratados con ingenol mebutato y paclitaxel, y por tanto, de la proliferación celular. La mayor expresión de metaloproteinasa 9 fue observada en los carcinomas in situ y microinvasores, independientemente del grupo de estudio, lo que sugiere una

mayor actividad de estas enzimas en estadios iniciales de la carcinogénesis. El inhibidor de metaloproteinasas TIMP-1 parece tener poca relevancia en el proceso neoplásico en nuestro modelo.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel, E.L., Angel, J.M., Kiguchi, K., & Digiovanni, J. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: Fundamentals and applications. *Nat Protoc.* 2009; 4(9): 1350–62.

Abello, R., Buitrado, C., Prate, C. M., Devizio, W. & Barkar, S.K. Effect of a mouthrinse containing triclosan and a copolymer on plaque formation in the absence of oral hygiene. *Am J Dent.* 1990;3:57-61.

Abraxane ficha técnica. Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios [acceso 1 Mar 2016]. Recuperado de: http://ec.europa.eu/health/documents/community.../anx_130850_es.pdf

Aditya, S., & Gupta, S. Ingenol mebutate: A novel topical drug for actinic keratosis. *Indian Dermatol Online J.* 2013; 4(3):246-249.

Afaq, F., & Mukhtar, H. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Exp Dermatol.* 2006; 15(9), 678–84. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00466.x>

Ahonen, M., Baker, A.H., Kahari, V.M. Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res.* 1998; 58: 2310–2315.

Aldara ficha técnica. Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios [acceso 1 Mar 2016]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000179/WC500023122.pdf

Alexander, C.M., Werb, Z. Targeted disruption of the tissue inhibitor of metalloproteinases gene increases the invasive behavior of primitive mesenchymal cells derived from embryonic stem cells in vitro. *J Cell Biol.* 1992; 118: 727–739.

Almendral,, J.M.; Huebsch, D.; Blundell, P .A.; Macdonald-Bravo, H.; Bravo, R.. Cloning and sequence of the human nuclear

protein cyclin: homology with DNA-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U.S.A. Proceed.* 1987; 84(6), 1575-1579.

Alomar, A. Queratosis actínica: un proceso ancestral, nuevos conceptos y enfoques terapéuticos. *Actas Dermosifil.* 2014; 105(9): 809–12. Recuperado de:
<http://doi.org/10.1016/j.ad.2014.06.002>

American Cancer Society. [Internet]. What are basal and squamous cell skin cancers? *American Cancer Society.* 2014-[citado 8 Mar 2016]. Recuperado de:
<http://www.cancer.org/cancer/skincancer-basalandsquamouscell/detailedguide/skin-cancer-basal-and-squamous-cell-what-is-basal-and-squamous-cell>

Ananthaswamy, H.N., Fourtanier, A., Evans, R.L., Tison, S., Medaisko, C., Ullrich, S.E., & Kripke, M.L. p53 mutations in hairless SKH-hr1 mouse skin tumors induced by a solar simulator. *Photochem Photobiol.* 1998; 67(2): 227-32.

Andersen, S.M., Rosada, C., Dagnaes-Hansen, F., Laugesen, I.G., de Darkó, E., Dam, T.N., & Stenderup, K. Topical application of valrubicin has a beneficial effect on developing skin tumors. *Carcinogenesis.* 2010; 121(1-2):

376-82. Recuperado de:

<http://doi.org/10.1093/carcin/bgq122>

Anderson L, Schmieder GJ, Werschler WP, Tschen EH, Ling MR, Stough DB, et al. Randomized, double-blind, double-dummy, vehicle-controlled study of ingenol mebutate gel 0.025% and 0.05% for actinic keratosis. *J Am Acad Dermatol*. 2009;60:934-43.

Anderson, L., Jarratt, M., Schmieder, G., Shumack, S., Katsamas, J., & Welburn, P. Tolerability and Pharmacokinetics of Ingenol Mebutate 0.05% Gel Applied to Treatment Areas up to 100cm² on the Forearm(s) of Patients with Actinic Keratosis. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2014;7(12):19–29.

Arévalo-Suarez, F., Alfaro-Lozano, A. Queratosis actínica y presencia de p53: Hallazgos histopatológicos. *Dermatol peru*. 2006; 16(5), 139–142.

Avci, P., Sadasivam, M., Gupta, A., De Melo, W.C., Huang, Y.Y., Yin, R., & Hamblin, M.R. Animal models of skin disease for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2013;8(3): 331–55. Recuperado de:
<http://doi.org/10.1517/17460441.2013.761202>

Avila Acevedo, J.G., Espinosa González, A.M., De Maria Campos, D.M., Benitez Flores, J.C., Hernández Delgado, T., Flores Maya, S., & García Bore, A.M. Photoprotection of Buddleja cordata extract against UVB-induced skin damage in SKH-1 hairless mice. *BMC Complement Altern Med.* 2014;14: 1 – 9. Recuperado de: <http://doi.org/10.1186/1472-6882-14-281>

Baliga, M.S., & Katiyar, S.K. Chemoprevention of photocarcinogenesis by selected dietary botanicals. *Photochem Photobiol Sci.* 2006; 5:243-53.

Barrera Vigo, M.V., y Herrera, E. Tratamiento quimioterápico tópico de la queratosis actínica y el cáncer cutáneo no melanoma: Situación actual y perspectivas. *Actas Dermosifil.* 2007; 98(8): 556–62. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0001-7310\(07\)70133-3](http://doi.org/10.1016/S0001-7310(07)70133-3)

Becker, J.C., Houben, R., Schrama, D., Voigt, H., Ugurel, S., & Reisfeld, R.A. Mouse models for melanoma: a personal perspective. *Exp Dermat.* 2010; 19(2), 157–64. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00986.x>

Belmar Ruiz, M.J. Estudio del Efecto de Polifenoles Vegetales sobre un Modelo de Fotoenvejecimiento en Ratones SKH1. [Tesis doctoral]. Murcia: Universidad de Murcia. Facultad de Medicina;2014.

Benavides, F., Oberyszyn, T. M., VanBuskirk, A. M., Reeve, V. E., & Kusewitt, D. F. The hairless mouse in skin research. *J Dermatol Sci.* 2009; 53(1): 10-8.

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

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

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

Bernstein, E.F., Chen, Y.Q., Tamai, K., Shepley, K.J., Resnik, K.S., Zhang, H. et al. Enhanced elastin and fibrillin gene

expression in chronically photo-damaged skin. *J Invest Dermatol.* 1994; 103:182–6.

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

Bhandari, P.R., Pai, V. Could ingenol mebutate be useful in managing nonmelanoma skin cancers? *Indian J Cancer.* 2015;52(2):249-250. Recuperado de:
<http://www.indiancancer.com>

Bhattacharyya, T.K., Higgings, N.P., Sebastian, J.S., & THOMAS, J.R. Comparison of Epidermal Morphologic Response to Commercial Antiwrinkle Agents in the Hairless Mouse. *Dermatol Surg.* 2009;35:1109–1118.

Binic, I., Lazarevic, V., Ljubenovic, M., Mojsa, J., & Sokolovic, D. Skin ageing: natural weapons and strategies. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 827248. Recuperado de:
<http://doi.org/10.1155/2013/827248>

Biniek, K., Levi, K., & Dauskardt, R. H. Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(42), 17111–6. Recuperado de: <http://doi.org/10.1073/pnas.1206851109>

BIONANOPLUS. Drug Delivery Technologies. España [Internet]. Navarra: Drug Delivery Platforms NANO-GES; 2016[consulta el 25 de abril de 2016]. Recuperado de: <http://www.bionanoplus.com/drug-delivery-platforms/nano-ges/>

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

Bologna, J.L., Schaffer, J.V., Duncan, K.O., & Ko, C.J. Photodermatoses. *Dermatology Essentials*. 2014; 73, 718-73.

Borrego Hernando, L. Problema clínico. *Jano*. 2008; 1685: 34-38. Recuperado de: www.jano.es

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

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

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

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

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

Burns, E.M., Tober, K.L., Riggensbach, J.A., Schick, J.S., Lamping, K.N., Kusewitt, D.F., et al. Carcinogenesis. 2012;34(2):370–377.

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

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

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

Cano Gómez, A., Gómez García, F. J., Álvarez Sánchez, N., Sánchez-Pedreño Guillén, P., & Vicente Ortega, V. Modelo de fotocarcinogénesis cutánea en ratones SKH-1 por radiación ultravioleta. *Rev Esp Patol*. 2010; (4), 191–5.

Recuperado de:

<http://doi.org/10.1016/j.patol.2010.07.007>

Cano Gómez, A. Modelo Experimental de Fotoenvejecimiento: Efectos de Polifenoles. [Tesis doctoral]. Murcia: Universidad de Murcia. Facultad de Medicina;2014.

Carell, T., Burgdorf, L.T., Kundu, L.M., & Cichon, M.: The mechanism of action of DNA photolyases. *Curr Opin Chem Biol.* 2001; 5:491-498.

Chang, C., Murzaku, E., Penn, L., et al. More skin, more sun, more tan, more melanoma. *Am J Public Health.* 2014; 104:92-9.

Chen, J., & Roo, D.R. Genetically engineered mouse models for skin research: taking the next step. *J Dermatol Sci.* 2008; 52(1): 1–12.

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

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

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

Consejos de la AEMPS sobre protección solar. 24 de junio de 2015. Recuperado de:
http://www.aemps.gob.es/cosmeticosHigiene/cosmeticos/docs/proteccion_solar.pdf

Costa, C., Scalvenzi, M., Ayala, F., Fabbrocini, G., & Monfrecola, G. How to treat actinic keratosis ? An update. *J Dermatol Case Rep.* 2015; 9(2):29–35. Recuperado de:
<http://doi.org/10.3315/jdcr.2015.1199>

Cozzi, S.-J., Ogbourne, S.M., James, C., Rebel, H.G., de Gruijl, F.R., Ferguson, B., & Suhrbier, A. Ingenol Mebutate Field-Directed Treatment of UVB-Damaged Skin Reduces Lesion Formation and Removes Mutant p53 Patches. *J Invest Dermatol.* 2012; 132(4), 1263–71. Recuperado de:
<http://doi.org/10.1038/jid.2011.418>

Cozzi, S.-J., Le, T.T., Ogbourne, S.M., James, C., & Suhrbier, A. Effective treatment of squamous cell carcinomas with ingenol mebutate gel in immunologically intact SKH1 mice. *Arch Dermatol Res.* 2013; 305(1), 79–83.

Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/s00403-012-1270-0>

CR-UK. Cancer Research UK Policy Statement Sunbeds. In:
Cancer Research UK. 2009. Recuperado de:
<http://scienceblog.cancerresearchuk.org/2009/07/29/sunbeds-acknowledged-as-cancer-risk/comment-page-1/>

Curran, S., Murray, G.I. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 1999, 189: 300-308.

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

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

De Gruijl, F.R., van der Leun, J.C. Estimate of the wavelength dependency of ultraviolet carcinogenesis in humans and its relevance to the risk assessment of a stratospheric ozone depletion. *Health Physics.* 1994; 67:1-8.

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

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

Dickinson, S.E., Olson, E.R., Zhang, J., Cooper, S. J., Melton, T., Criswell, J., & Bowden, G.T. p38 MAP Kinase Plays a Functional Role in UVB-Induced Mouse Skin Carcinogenesis. *Mol Carcinog.* 2012; 50(6), 469–478.
Recuperado de: <http://doi.org/10.1002/mc.20734.p38>

Diffey, B.L. When should sunscreen be reapplied? *J Am Acad Dermatol.* 2001; 45: 882-885.

Divins, M.J. Protección solar. *Farmacia Profesional.* 2009; 23(3):26-32.

Divya, S.P., Wang, X., Pratheeskumar, P., Young, S., Roy, R.V., Kim, D., et al. *Toxicol Appl Phharmacol.* 2015;284:92-99)

Ehrlich, A., Booher, S., Becerra, B., Borris, D.L., Figg, W. D., Turner, M.L., & Blauvelt, A. Micellar paclitaxel improves severe psoriasis in a prospective phase II pilot study. *J Am*

Acad Dermatol. 2004; 50(4), 533–40. Recuperado de:
<http://doi.org/10.1016/j.jaad.2003.09.018>

Feng, L., Wang, Z. Chemopreventive Effect of Celecoxib in Oral Pre-cancers an Cancers. *Laryngoscope* 2006; 116(10): 1842-1845.

Ferrándiz, C., Fonseca-Capdevila, E., García-Diez, A., Guillén-Barona, C., Belinchón-Romero, I., Redondo-Bellón, P., y Senán, R. Adaptación española de la Guía europea para la evaluación y tratamiento de la queratosis actínica. *Actas Dermosifil.* 2014; 105(4), 378–93. Recuperado de:
<http://doi.org/10.1016/j.ad.2013.11.013>

Ferrer, M., Sanz, M.L., Gastaminza, G., del Pozo, V., de Souza, J., e Irache, J.M. Nuevas formas farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades alérgicas. *An Sist Sanit Navar.* 2012; 35 (1): 41-51.

Fisher, G.J., & Voorhees, J.J. Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce Ap-1-regulated matrix

metalloproteinases that degrade human skin in vivo. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 1998; 3(1): 61-68.

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

Fischer, T.W., Zmijewski, M.A., Wortsman, J., & Slominski, A. Melatonin maintains mitochondrial membrane potential and attenuates activation of initiator (casp 9) and effector caspases (casp 3/casp 7) and PARP in UVR exposed HaCaT keratinocytes. *J Pineal Res.* 2008; 44(4): 397-40.

Fischer, K.E., Sacharidou, A., Stratman, A.N., Mayo, A.M., Fisher, S.B., & Mahan, R.D. MT1-MMP- and Cdc42-dependent signaling co-regulate cell invasion and tunnel formation in 3D collagen matrices. [J Cell Sci.](#) 2009;122(24):4558-69.

Fitzpatrick, T.B., Pathak, M.A., & Jimbow, K. Role light in human skin color variation. *Am J Phys Anthropol.* 1975;43(3):393-408

Flores, S., Gorouhi, F., & Maibach, H. I. Animal Models. En: Textbook of Aging Skin. Springer Berlin Heidelberg. 2010: 781-5.

Fourtanier, A., Moyal, D., & Seité, S. Sunscreens containing the broad-spectrum UVA absorber, Mexoryl SX, prevent the cutaneous detrimental effects of UV exposure: a review of clinical study results. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2008; 24(4), 164–74. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/j.1600-0781.2008.00365.x>

Franchi, A., Santucci, M., Masini, E., Sardi, I., Paglierani, M., Gallo, O. Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck. *Cancer.* 2002; 95: 1902-1910.

Gangjee, A., Yu, J., Jean E. Copper, J.E., & Smith, C.D. Discovery of Novel Antitumor Antimitotic Agents That Also Reverse Tumor Resistanc. *J Med Chem.* 2007; 50(14).

García-Cao, I., García-Cao, M., Tomás-Loba, A., Martín-Caballero, J., Flores, J. M., Klatt, P., & Serrano, M. Increased p53 activity does not accelerate telomere-driven ageing.

EMBO Rep. 2006; 7(5), 546–52. Recuperado de:

<http://doi.org/10.1038/sj.embor.7400667>

Gil-Ortega, A. Efectos del extracto de crisálida de la seda sobre el fotoenvejecimiento cutáneo inducido por RUV en ratones SKH1/CRL. [Tesis doctoral]. Murcia: Universidad de Murcia. Facultad de Medicina;2014.

Gilaberte, Y., y González, S. Novedades en fotoprotección. *Actas Dermosifil.* 2010; 101: 659-72.

Giordano, A., Calvani, M., Petillo, O., Carteni, M., & Melone, M.R., Peluso, G. Skeletal muscle metabolism in physiology and in cancer disease. *J Cell Biochem.* 2003;90(1):170-86.

Glogau, R., Kane, M., Beddingfield, F., Somogyi, C., Lei, X., Caulkins, C., & Gallagher, C. On a botulinum toxin A: a metaanalysis of duration of effect in the treatment of glabellar lines. *Dermatol Surg.* 2012; 38(11): 1794-1803.

Goldsmith, L.A. Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin. New York: Oxford University Press, 1991.

Gomez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, H., Thorgeirsson, U.P. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997; 74: 111–122.

Gómez, F.J., Vicente, V., Álvarez, N, Yáñez, J, Alcaraz, M, y Ortiz, L. Modelo experimental de fotoenvejecimiento cutáneo por radiación ultravioleta A. *Rev Esp Patol.* 2007; 40(2): 103-8.

Gonzalvez Bosquet, L. Exposición solar. Beneficios, riesgos y prevención. *Of.* 2006; 25 (5):48-54.

Gorden, K.B., Gorski, K.S., Gibson, S.J., Kedl, R.M., Kieper, W.C., Qiu, X., et al. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J Immunol.* 2005; 174: 1259-1268.

Green, A.J. Possible effects of sunlight on human lymphocytes. *J Epidemiol.* 1999; Dec: 9(6 Supp):S48-57. Review.

Grether-Beck, S., Marini, A., Jaenicke, T., & Krutmann, J. Photoprotection of human skin beyond ultraviolet radiation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2014;

30(2-3), 167–174. Recuperado de:

<http://doi.org/10.1111/phpp.12111>

Guillermo, R.F., Zhang, X., Kaushik, R.S., Zeman, D., Ahmed, S.A., Khalifa, S., et al. Dose-response on the chemopreventive effects of sarcophine-diol on UVB-induced skin tumor development in SKH-1 hairless mice. *Mar Drugs*. 2012; 10(9): 2111-2125.

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

Hachiya, A., Sriwiriyanont, P., Fujimura, T., Ohuchi, A., Kitahara, T., Takema, Y., & Boissy, R.E. Mechanistic effects of long-term ultraviolet B irradiation induce epidermal and dermal changes in human skin xenografts. *Am J Pathol*. 2009; 174(2), 401–13. Recuperado de:
<http://doi.org/10.2353/ajpath.2009.070500>

Haider, A.S., Peters, S.B., Kaporis, H., Cardinale, I., Fei, J., Ott, J., et al. Genomic analysis defines a cancerspecific gene expression signature for human squamous cell carcinoma and distinguishes malignant hyperproliferation from

benign hyperplasia. *J Invest Dermatol.* 2006; 126: 869–881.

Halliday, G.M. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. *Mutat Res.* 2005; 571(1): 107-120.

Han, L., Guo, J., Zhang, L., Wang, Q., & Fan, X. Pharmacokinetics and biodistribution of polymeric micelles of paclitaxel with Pluronic P123. *Acta Pharmacol Sin.* 2006; 27 (6): 747–753.

Handoko, H.Y., Ferguson, B., & Walker, G.J. Mouse Models for Actinic Keratosis and Squamous Cell Carcinoma. *Curr Probl Dermatol.* 2015; 46, 42–48. Recuperado de: <http://doi.org/10.1159/000366534>

Haque, T., Rahman, K.M., Thurston, D.E., Hadgraft, J., & Lane, M.E. Topical therapies for skin cancer and actinic keratosis. *Eur J Pharm Sci.* 2015; 77, 279–289. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.06.013>

Harvey, I., Frankel, S., Marks, R., Shalom, D., & Nolan-Farrell, M. Non-melanoma skin cancer and solar keratoses II

analytical results of the South Wales Skin Cancer Study. *Br J Cancer*. 1996; 74(8), 1308–12. Recuperado de:
<http://doi.org/10.1038/bjc.1996.535>

Hennenfent, K.L., & Govindan, R. Novel formulations of taxanes: a review. Old wine in a new bottle? *Ann Oncol*. 2006; 17: 735–749.

Hofbauera, G., Anlikerb, M., Boehnckec, W., Brandd, C., Brauna, R., Gaidee, O., et al. Swiss clinical practice guidelines on field cancerization of the skin. *Swiss Medical Weekly*. 2014;144: 1-19.

Holick M.F. The cutaneous photosynthesis of previtamin D: a unique photoendocrine system. *J Invest Dermatol*. 1981; 76: 51-58.

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

Honeyman, J. Efectos de las radiaciones Ultravioleta en la piel. *Rev Per Derm*. 2002; 12(2):1-15.

Hönigsmann, H. Erythema and pigmentation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2002;18(2):75-81.

- Huang, L., Wang, G., Jia, Z., Chen, J., Wang, G., & Wang, X.
Paclitaxel reduces formation of hypertrophic scars in the rabbit ear model. *Therapeut Clin Risk Manag.* 2015;11:1089–1095.
- Hughes, M.C., Williams, G.M., Baker, P., et al. Sunscreen and prevention of skin aging: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2013; 158:781-790.
- Hung, C.F., Fang, C.L., Al-Suwayeh, S.A., Yang, S.Y., & Fang, J.Y.
Evaluation of drug and sunscreen permeation via skin irradiated with UVA and UVB: comparisons of normal skin and chronologically aged skin. *J Dermatol Sci.* 2012;68(3):135-48.
- Iannacone, M.R. Iannacone, Hughes, M.C. & Green, A.C. Effects of sunscreen on skin cancer and photoaging. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2014;30:55-61.
Recuperado de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/phpp.12109/epdf>

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

Imokawa, G., & Ishida, K. Biological Mechanisms Underlying the Ultraviolet Radiation-Induced Formation of Skin Wrinkling and Sagging I: Reduced Skin Elasticity, Highly Associated with Enhanced Dermal Elastase Activity, Triggers Wrinkling and Sagging. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(4), 7753–7775. Recuperado de: <http://doi.org/10.3390/ijms16047753>

Irache, J.M., Huici, M., Konecny, M., Espuelas, S., Campanero, M.A., & Arbos, P. Bioadhesive properties of Gantrez nanoparticles. *Molecules.* 2005; 10(1), 126–45. Recuperado de: <http://doi.org/10.1517/17425247.2.2.205>

Jemal, A., Simard, E.P., Xu, J., Ma, J., & Anderson, R.N. Selected cancers with increasing mortality rates by educational attainment in 26 states in the United States, 1993-2007. *Cancer Causes Control.* 2013;24(3):559-65.

Jiang, W., Ananthaswamy, H.N., Muller, H.K., & Kripke, M.L. p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation.

Oncogene. 1999; 18(29), 4247–4253. Recuperado de:
<http://doi.org/10.1038/sj.onc.1202789>

Kambayashi, H., Yamashita, M., Otake, 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.

Kang, S., Chung, J.H., Lee, J.H., Fisher, G.J., Wa, Y.S., Duell, E.A., & Voorhees, J.J. Topical Nacetyl cysteine and genistein prevent ultravioletlight induced signaling that leads to photoaging in human. *J Invest Dermatol*. 2003; 120, 835-841.

Kasper, M., Jaks, V., Hohl, D., & Toftgård, R. Review series Basal cell carcinoma - molecular biology and potential new therapies. *J Clin Invest*. 2012; 122(2), 455–63. Recuperado de: <http://doi.org/10.1172/JCI58779>

Katayama, A., Bandoh, N., Kishibe, K., Takahara, M., Ogino, T., Nonaka, S., et al. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 634-640.

Kaur, I.P., Kapila, M., & Agrawal, R. Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing. *Ageing Res Rev.* 2007;6: 271–28.

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

Khalesi, M., Whiteman, D.C., Doi, S.A.R., Clark, J., Kimlin, M.G., & Neale, R. E. Cutaneous markers of photo-damage and risk of basal cell carcinoma of the skin: A meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013; 22(9), 1483–1489. Recuperado de: <http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-0424>

Khandavilli, S., & Panchagnula, R. Nanoemulsions as versatile formulations for Paclitaxel delivery: peroral and dermal delivery studies in rats. *J Invest Dermatol.* 2007; 127: 154-162.

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

Kilfoyle, B.E., Sheihet, L., Zhang, Z., Laohoo, M., Kohn, J., & Michniak-Kohn, B.B. Development of paclitaxel-

TyroSpheres for topical skin treatment. *J Control Release*. 2012; 163(1), 18–24. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.021>

Kircik, L., Sung, J.C., Stein-Gold, L., & Goldenberg, G. United States Food and Drug Administration Product Label Changes. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2016;9(1):39–48.

Kligman, L.H., Akin, FJ.; Kligman, A. M. Prevention of ultraviolet damage to the dermis of hairless mice by sunscreens. *J Invest Dermatol*. 1982; 78: 181–9.

Kligman, L.H. Intensification of Ultraviolet-induced Dermal Damage by Infrared Radiation. *Arch Dermatol Res*. 1982; 272:229-38.

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

Kolappaswamy, K., Williams, K.A., Benazzi, C., Sarli, G., McLeod Jr, C.G., Vucenik, I., & DeTolla, L. J. Effect of inositol hexaphosphate on the development of UVB-induced skin

tumors in SKH1 hairless mice. *Comp Med*. 2009; 59(2): 147.

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

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

Kyung-A, H., Bo-Rim Y., & Kyung-Chul, C. Molecular Mechanisms and In Vivo Mouse Models of Skin Aging Associated with Dermal Matrix Alterations. *Lab Anim Res*. 2011; 27(1), 1-8.

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

Lanni, J.S., Lowe, S.W., Licitra, E.J., Liu, J.O., & JACKS, T. p53-independent apoptosis induced by paclitaxel through an indirect mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94:9679–9683.

Le, T.T., Gardner, J., Hoang-Le, D., et al. Immunostimulatory cancer chemotherapy using local ingenol-3-angelate and synergy with immunotherapies. *Vaccine*. 2009;27:3053–62.

Lebwohl, M., Swanson, N., Anderson, L.L., Melgaard, A., Xu, Z., & Berman, B. Ingenol Mebutate Gel for Actinic Keratosis. *N Engl J Med*. 2012; 366(11), 1010–9. Recuperado de: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1111170>

Lesney, M. Nature's Pharmaceuticals Natural products from plants remain at the core of modern medicinal chemistry. *Today's Chemist at Work*. 2004; 5:26:32.

Liu, K., Yu, D., Cho, Y.-Y., Bode, A.M., Ma, W., Yao, K., & Dong, Z. Sunlight UV-induced skin cancer relies upon activation of the p38 α signaling pathway. *Cancer Research*. 2013; 73(7), 2181–8. Recuperado de: <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3408>

Lodyga, M., Polan, A., Skotarczak, K., Mazur, M., & Adamski, Z. Photoprotection : facts and controversies. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015; 98–112.

Longo, D.L., Fauci, A.S., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Jameson, J.L., Loscalzo, J., editores. Harrison principios de medicina interna. Vol 2. 18a ed. México: McGraw-Hill;1998.

López-Camarillo, C, Aréchaga Ocampo, E., López Casamichana, M, Pérez-Plasencia, C., Álvarez-Sánchez, E., & Marchat, L.A. Protein Kinases and Transcription Factors Activation in Response to UV-Radiation of Skin: Implications for Carcinogenesis. *Int. J Mol Sci.* 2012; 13, 142-172.

Lucena, S., Salazar, N., Gracia-Cazaña, T., Zamarrón, A., González, S., Juarranz, Á., & Gilaberte, Y. Combined Treatments with Photodynamic Therapy for Non-Melanoma Skin Cancer. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(11), 25912–25933. Recuperado de:
<http://doi.org/10.3390/ijms161025912>

Ma, P., & Mumpe, R.J. Paclitaxel Nano-Delivery Systems: A Comprehensive Review. *J Nanomed Nanotechnol.* 2013; 4(2): 100016.

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

Magliano, J. Antioxidantes de uso tópico en Dermatología.

Tendencias Medicina. 2014; 44(10): 91-96.

Maibach, H., & Honari, G. Dermatosis ambientales. San Francisco: Editorial Elsevier; 2015.

Marini, M., Remorino, M., y Noriega, G. Algoritmo de diagnóstico, tratamiento y seguimiento del carcinoma espinocelular (CEC). *Act Terap Dermatol*. 2008; 31: 104-106.

Matsumura, Y., & Ananthaswamy, H.N. Short-term and long-term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*. 2002; 4(26):1-22.

Mc Ardle, F., Rhodes, L.E., Parslew, R., Jack, C., Friedmann, P., & Jackson, M. Effects of oral vitamine E and beta-carotene supplementation on UVR-induced oxidative stress in human skin. *Am J Clin Nutr*. 2004; 80: pp. 1270-5.

Menter, J.M., Etemadi, A., Patta, A.M., & Scheinfeld, N. Topical AC-11 Abates While Applied Actinic Keratoses and Early Squamous Cell Cancers in Hairless Mice Exposed to

Ultraviolet A (UVA) Radiation. *Aperito J Dermatol.* 2014, 1:1.

Millsop, J.W., Sivamani, R.K., & Fazel, N. Botanical Agents for the Treatment of Nonmelanoma Skin Cancer. *Dermatol Res Pract.* 2013;837152.

<http://dx.doi.org/10.1155/2013/837152>

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

Mocchegiani, E., Costarelli, L., Guiacconi, R., Malavolta, M., Basso, A., Picenza, F., et al. Vitamin E-gene interactions in aging and inflammatory age-related diseases: Implications for treatment. A systematic review. *Ageing Res Rev.* 2014; 14: 81-101.

Moloney, S.J., Edmonds, S.H., Giddens, L.D., & Learn, D.B. The hairless mouse model of photoaging: evaluation of the relationship between dermal elastin, collagen, skin thickness and wrinkles. *Photochem Photobiol.* 1992; 56(4): 505-11.

Morton, C.A., Szeimies, R.M., Sidoroff, A., & Braathen, L.R. European guidelines for topical photodynamic therapy part 2: Emerging indications--field cancerization, photorejuvenation and inflammatory/infective dermatoses. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013; 27: 672-9.

Mpharm, M.J.G. Effect of microneedle treatment on the skin permeation of a nanoencapsulated dye. *J Pharm Pharmacol.* 2014; 64(11), 1592–602. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01557.x.EFFECT>

Muehlmann, L.A., Chiyin Ma, B., Figueiró Longo, J.P., Menezes AlmeidaS, M.F., & Bentes Azevedo, R. aluminum–phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:1199–1213.

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

- Muto, J., Kuroda, K., Wachi, H., Hirose, S., Tajima, S.
Accumulation of elafin in actinic elastosis of sun-damaged skin: elafin binds to elastin and prevents elastolytic degradation. *J Invest Dermatol.* 2007; 43: 38-43.
- Nakamura, K., & Johnson, W.C. Ultraviolet light induced connective tissue changes in the rat skin: A histopathologic and histochemical study. *J Invest Dermatol.* 1968; 51, 253-8.
- Nakazawa, H., English, D., Randell, P.L., Nakazawa, K., Martel, N., Armstrong, B.K., et al. UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(1):360-4. Recuperado de:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC42947/pdf/pnas01532-0376.pdf>
- Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(3): 173-182.
- Niezabitowski, A., Czajewski, K., Rys, J., Kruczak, A., Gruchala, A. et al. Prognostic evaluation of cutaneous malignant melanoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *J Surg Oncol.* 1999; 70(3):150-160.

Norris, P., Poston, R.N, Thomas, D.S., Thornhill, M. Hawk, J., & Haskard, D.O. The expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1), intercellular adhesion molecule1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in experimental cutaneous inflammation: a comparison of ultraviolet B erythema and delayed hypersensitivity. *J Invest Dermatol.* 1991; 96(5): 763-770.

Ogbourne, S.M., Suhrbier, A., Jones, B., Cozzi, S.J., Boyle, G.M., Morris, M., et al. Antitumor activity of 3-ingenyl angelate: plasma membrane and mitochondrial disruption and necrotic cell death. *Cancer Res.* 2004;64:2833–9.

Ohashi, K., Nemoto, T., Nakamura, K., Nemori, R. Increased expression of matrix metalloproteinase 7 and 9 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer.* 2000; 88: 2201-2209.

Opländer, C., & Suschek, C.V. The Role of Photolabile Dermal Nitric Oxide Derivates in Ultraviolet Radiation (UVR)-Induced Cell Death. *Int. J Mol Sci.* 2013; 14:191-204.

Osmola-Mankowska, A., Silny, W., Danczak-Pazdrowska, A., Olek-Hrab, K., Mankowski, B., Osmola, K., & Kubisz, L. The

sun - our friend or foe? *Ann Agric Environ Med.* 2012;
19(4), 805-9.

Paclitaxel Accord ficha técnica. Agencia Española del
Medicamento y Productos Sanitarios [acceso 1 Mar 2016].
Recuperado de:
http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/73010/FT_73010.pdf

Palomino Yamamoto, M. Fisiología dela Piel. *Rev Per Derm.*
2001;11(2):1-12.

Panretin ficha técnica. Agencia Española del Medicamento y
Productos Sanitarios [acceso 1 Mar 2016]. Recuperado de:
http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000279/WC500038711.pdf

Paolino, D., Celia, C., Trapasso, E., Cilurzo, F., & Fresta, M.
Paclitaxel-loaded ethosomes??: Potential treatment of
squamous cell carcinoma, a malignant transformation of
actinic keratoses. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012; 81(1),
102–112. Recuperado de:
<http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.02.008>

Pentland, A.P., Schoggins, J.W., Scott, G.A., Khan, K.N.M., & Han, R. Reduction of UV-induced skin tumors in hairless mice by selective COX-2 inhibition. *Carcinogenesis*. 1999; 20(10), 1939–44. Recuperado de: <http://doi.org/10.1093/carcin/20.10.1939>

Picato ficha técnica. Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios [acceso 1 Mar 2016]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002275/WC500135327.pdf

Pols, J.C., Van Der Williams, G.M., Pandeya, N., Logan, V., & Green, C. Prolonged Prevention of Squamous Cell Carcinoma of the Skin by Regular Sunscreen Use Short Communication Prolonged Prevention of Squamous Cell Carcinoma of the Skin by Regular Sunscreen Use. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006; 15(2), 2546–2548. Recuperado de: <http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0352>

Pons Gimier, L. Cosmética Antienvjecimiento. Atención Farmacéutica en Dermatología. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. 2008.

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

Prüss-üstün, A., Zeeb, H., Mathers, C., & Repacholi, M. Solar Ultraviolet Radiation: Global burden of disease from solar ultraviolet radiation. *World Health.* 2006; 55(13), 987–999. Recuperado de: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?!sisScript=iah/iah.xis&sr c=google&base=REPIDISCA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=176351&indexSearch=ID>

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

Quan, T., Qin, Z., Xia, W., Shao, Y., Voorhees, J.J. & Fisher, G.J. Matrix-degrading Metalloproteinases in Photoaging. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2009; 14(1): 20–24.

Real Decreto 1002/2002, de 27 de septiembre, por el que se regula la venta y utilización de aparatos de bronceado mediante radiaciones ultravioletas. (BOE núm. 243, de 10 octubre 2002). Recuperado de:

<http://www.boe.es/boe/dias/2002/10/10/pdfs/A35771-35774.pdf>

Real Decreto 2032/2009, de 30 de diciembre, por el que se establecen las unidades legales de medida. (BOE núm. 18, de 21 de enero de 2010). Recuperado de:

<https://www.boe.es/buscar/pdf/2010/BOE-A-2010-927-consolidado.pdf>

Real Decreto 486/2010, de 23 de abril, sobre la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a radiaciones ópticas artificiales. (BOE núm. 99, de 24 de abril de 2010).

Recuperado de:

<https://www.boe.es/buscar/pdf/2010/BOE-A-2010-6485-consolidado.pdf>

Rebel, H.G., Bodmann, C.A., van de Glind, G.C., & de Gruijl, F.R.

UV-induced ablation of the epidermal basal layer including p53-mutant clones resets UV carcinogenesis showing squamous cell carcinomas to originate from

interfollicular epidermis. *Carcinogenesis*. 2012; 33 (3):714–720.

Ribera Pibernat, P., & Fernández-Chico, N. Tratamiento de las queratosis actínicas. *FMC*. 2013;20(10):592-601.

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

Reyes, E., y Vitale, M.A. Avances en fotoprotección. Mecanismos moleculares implicados. *Piel*. 2013; 28(4), 235–247.

Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.piel.2012.04.011>

Rijken, F., Bruijnzeel, P.L., van Weelden, H., & Kiekens, R.C. Responses of black and white skin to solar-simulating radiation: differences in DNA photodamage, infiltrating neutrophils, proteolytic enzymes induced, keratinocyte activation, and IL10 expression. *J Invest Dermatol*. 2004; 122(6): 1448-1455.

Rijken, F., Kiekens, R.C., & Bruijnzeel, P.L. Skin infiltrating neutrophils following exposure to solar-simulated

irradiation could play an important role in photoaging of human skin. *Brit J Dermatol*. 2005;152(2):321-328.

Rijken, F., & Bruijnzeel, P.L. The pathogenesis of photoaging: the role of neutrophils and neutrophil-derived enzymes. *In J Investig Dermatol Symp Proc*. 2009; 14 (1): 67-72.

Rosen, R.H., Gupta, A.K., Tyring, S. Dual mechanism of action of ingenol mebutate gel for topical treatment of actinic keratoses: rapid lesion necrosis followed by lesion-specific immune response. *J Am Acad Dermatol*. 2012;66(3):486–93.

Rossi, R., Moira, M., & Torello, L. Actinic queratosis. Review. *Internat J Dermatol*. 2007; 46:895–904.

Ruiz Sánchez, V. Efectos de la Astaxantina en el fotoenvejecimiento cutáneo inducido en ratones SKH1/CRL por radiación UV. [Tesis doctoral]. Murcia: Universidad de Murcia. Facultad de Medicina; 2014.

Ruksha, T.G., Salmina, A.B., Sokolov, V.D., Maksimova, T.V., Anisimov, Y.A. Expression of peripheral benzodiazepine receptor, PCNA, and caspase-3 in cells of skin melanoma

and squamous cell carcinoma. *Bull Exp Biol Med.* 2007; 144(1): 77-79.

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: 744-748.

Salasche, S.J. Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42(1 Pt 2):4–7.

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

Samreen, J., & DeLouise, L.A. Understanding engineered nanomaterial skin interactions and the modulatory effects of ultraviolet radiation skin exposure. *WIRE: Nanomed Nanobiotechnol.* 2014;6:61-79.

- Sams, W.M., Smith, J.G., & Burk, P.G. The Experimental Production of Elastosis with Ultraviolet Light. *J Invest Dermatol.* 1964; 43(6): 467-471.
- Sand, M., Skrygan, M., Georgas, D., Sand, D., Hahn, S.A., Gambichler, T., et. Microarray analysis of microRNA expression in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Dermatol Sci.* 2012; 68: 119–126.
- Sánchez, F. 5 Consideraciones sobre la capa con el cáncer de piel. *Rev Med Chil.* 2006; 134, 1185–1190.
- Sánchez-Saldaña, L., Lanchipa, P., Pancorbo, J., Regis, A., & Sánchez, E. Fotoprotectores tópicos. *Rev Per Dermatol.* 2002; Vol, 12(2).
- Sayama, A., Soushin, T., Okada, T., Doi, K., & Nakayama, H. Morphological and Biochemical Changes During Aging and Photoaging of the Skin of C57BL/6J Mice. *J Toxicol Pathol.* 2010; 23(3), 133–9. Recuperado de: <http://doi.org/10.1293/tox.23.133>
- Scharffetter-Kochanek, K., Brenneisen, P., Wenk, J., Herrmann, G., Ma, W., Kuhr, L., Meewes, C., et al. Photoaging of the

skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol.* 2000;35(3):307-16.

Schmitt, J.V., & Miot, H.A. Actinic keratosis: a clinical and epidemiological revisión. *An Bras Dermatol.* 2012;87(3):425-34.

Schulz, J., Hohenberg, H., Pflucker, F., et al. Distribution of sunscreens on skin. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54 Suppl 1:S157-63.

Serna, J., Vitales, M., López, M.C., y Molina, A. Dermatología. *Farm Hosp.* 2002; 11(4), 841–842. Recuperado de: www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/CAP04.pdf

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

Sharfstein, J.M. A Spotlight on Sunscreen Regulation. *N Engl J Med.* 2015; Jul 9;373(2):101-3. Recuperado de: <http://doi.org/10.1056/NEJMp1002530>

Sharma, M.R., Werth, B., & Werth, V.P. Animal Models of Acute Photodamage: Comparisons of Anatomic, Cellular, and Molecular Responses in C57BL/6J, SKH-1, and Balb/c Mice. *Photochem Photobiol.* 2011; 87(3): 690-698.

Shaygannia, E., Bahmani, M., Zamanzad, B., & Rafieian-kopaei, M. A Review Study on *Punica granatum*. *J Evid Based Complementary Altern Med.* 2015; 19:1–7. Recuperado de: <http://doi.org/10.1177/2156587215598039>

Shergill, B., Zokaie, S., & Carr, A.J. Non-adherence to topical treatments for actinic keratosis. *Patient Prefer Adherence.* 2013;8:35-41.

Sirerol, J.A., Feddi, F., Mena, S., Rodriguez, M.L., Sirera, P., Aupí, M., & Estrela, J.M. Topical treatment with pterostilbene, a natural phytoalexin, effectively protects hairless mice against UVB radiation-induced skin damage and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* 2015; 85, 1–11. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.027>

Smetana, K., Gyorkey, F., Chan, P.K., Tan, E., Busch, H. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and human

malignant tumor nucleolar antigens (HMTNA) in nucleoli of human hematological malignancies. *Blut*. 1983; 46(3), 133-141.

Smolarek, A.K., So, J.Y., Thomas, P.E., Lee, H.J., Paul, S., Dombrowski, A., Wang, C.X., et al. 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;52(7): 514-525.

Solaraze ficha técnica. Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios [acceso 1 Mar 2016]. Disponible en: http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/73714/FichaTecnica_73714.html.pdf

Stockfleth, E., Sibbring, G.C., & Alarcon, I. New Topical Treatment Options for Actinic Keratosis: a Systematic Review. *Acta Derm Venereol*. 2016; 96(1):17–22.
Recuperado de: <http://doi.org/10.2340/00015555-2167>

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

Svobodová, A., Walterová, D., & Psotová, J. Influence of silymarin and its flavonolignans on H₂O₂-induced oxidative stress in human keratinocytes and mouse fibroblasts. *Burns*. 2006;32(8):973-9.

Swartz, M.H. Tratado de semiología anamnesis y exploración. Elsevier 6ª ed. Madrid;2010.p.137-195.

Thomas, C., Émile, J.-F., y Donadieu, J. J. Histiocitosis de Langerhans. *EMC – Pediatría*. 2007; 42(3):1-8.

Thomas, R. 2013. Sun Protection Using Sunscreens. *SkinTherapyLetter*. [consulta el 5 de abril de 2016]; 76(2)15-20. Recuperado de: <http://www.skintherapyletter.com/fp/2013/9.2/2.html>

Thurstan, S.A., Gibbs, N.K., Langton, A.K., Griffiths, C.E., Watson, R.E., & Sherratt, M.J. Chemical consequences of cutaneous photoageing. *Chem Cent J*. 2012; 6(1), 34. Recuperado de: <http://doi.org/10.1186/1752-153X-6-34>

Tierney, E., Barker, A., Ahdout, J., Hanke, C.W., Moy, R.L., & Kouba, D.J. Photodynamic therapy for the treatment of cutaneous neoplasia, inflammatory disorders, and photoaging. *Dermatol Surg*. 2009; 35: 725-746.

Togsverd-Bo, K., Lerche, C.M., Philipsen, P.A., Hædersda, I.M., & Wulf, H.C. Artificial daylight photodynamic therapy with "non-inflammatory" doses of hexyl aminolevulinate only marginally delays SCC development in UV-exposed hairless mice. *Photochem Photobiol Sci.* 2013;12(12):2130-6.

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

Trachuelo, M., Reyes, E., Jaén, P., Delgado, A., y Vitale, M. Regulación de la homeostasis de la barrera cutánea: implicaciones fisiopatológicas. *Piel. Formación continuada en dermatología.* 2015; 30 (10):667-680.

Tsatmali, M., Ancans, J., Yukitake; J. & Thody, A.J. Skin POMC Peptides: Their Actions at the Human MC-1 Receptor and Roles in the Tanning Response. *Pigm Cell Res.* 2000; 13(8):125-9.

U.S. Food and Drug Administration. Sunscreen drug products for over-the-counter human use. Recuperado

de: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2002-title21-vol5/pdf/CFR-2002-title21-vol5-sec352-10.pdf>

Uckun, F.M., Dibirdik, I., & Qazi, S. Prevention of UVB-induced skin inflammation, genotoxicity, and photocarcinogenesis in mice by WHI-P131, a dual-function inhibitor of Janus kinase 3 and EGF receptor kinase. *Arzneimittelforschung*. 2010; 60(4), 218–225. Recuperado de: <http://doi.org/10.1055/s-0031-1296276>

Valdivia Bonet, L. Fotobiología cutánea: generalidades. 2002. *Rev Per Derm*. 2002; 12(2).

Valladeau, J. Les cellules de Langerhans. *Med Sci*. 2006;22(2):144–8. Recuperado de: <http://www.erudit.org/revue/MS/2006/v22/n2/012382ar.html>

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

Vicente Ortega, V. El peligroso encanto de la belleza (Una aproximación a la patología de la pigmentación cutánea).

Discurso de Recepción Pública del Académico Electo en la Real Academia de Medicina y Cirugía de Murcia. *Anales de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Murcia*. 1999; 7- 41.

Von Zglinicki, T. Telomeres, telomerase and the cancer cell: an introduction. *Cancer Lett*. 2003;194(2):137-8.

WHO. Artificial Tanning Sunbeds Risks and Guidance. In. Geneva: World Health Organisation. 2003.

Wang, S.Q., & Tooley, I.R. Photoprotection in the era of nanotechnology. *Semin Cutan Med Surg*. 2011; 30: 210-213.

Weaver, B.A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell*. 2014;25(18):2677-81.

Weinberg, J.M. Topical therapy for actinic keratoses: current and evolving therapies. *Rev Recent Clin Trials*. 2006;1(1):53-60.

- Werner, J.A., Rathcke, I.O., Mandic, R. The role of matrix metallopro-teinasases in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Exp Metastasis*. 2002; 19: 275-282.
- Wilgus, T.A., Koki, A.T., Zweifel, B.S., Kusewitt, D.F., Rubal, P.A., & Oberyszyn, T.M. Inhibition of cutaneous ultraviolet light B-mediated inflammation and tumor formation with topical celecoxib treatment. *Mol Carcinog*. 2003; 38(2): 49-58.
- Winkelmann, R.K., Zollman, P.E., & Baldes, E.J. Squamous cell carcinoma produced by ultraviolet light in hairless mice. *J Invest Dermatol*. 1963; 40: 217–224.
- Wondrak, G.T., Jacobson, M.K., & Jacobson, E.L. Antimelanoma activity of apoptogenic carbonyl scavengers. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 316(2), 805-814.
- Workman, P., Aboagye, E.O. Balkwill, F., Balmain, A., Bruder, G., Chaplin, D.J., et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cáncer research. *Brit J Cancer*. 2010; 102:p155-157.

Yaar, M., Eller, M.S., & Gilchrest, B.A. Fifty years of skin aging. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2002; 7(1), 51–58.

Recuperado de: <http://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.19636.x>

Yaar, M., & Gilchrest, B.A. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br J Dermatol.* 2007;157(5):874-87.

Yared, J.A., & Tkaczu, K. Update on taxane development: new analogs and new formulations. *Drug Des Devel Ther.* 2012; 6:371–384.

Yentzer, B., Hick, J., Williams, L. et al. Adherence to a Topical Regimen of 5-Fluorouracil, 0.5% Cream for the Treatment of Actinic Keratoses. *Arch Dermatol.* 2009; 145(2):203-205.

Young, A.R. Chromophores in human skin. *Phys Med Biol.* 1997; 42(5), 789–802. Recuperado de: <http://doi.org/10.1088/0031-9155/42/5/004>

Young, A.R., Chadwick, C.A., Harrison, G.I., Nikaido, O., Ramsden, J., & Potten, C.S. The similarity of action spectra for thymine dimers in human epidermis and erythema suggests that DNA is the chromophore for erythema. *J*

Invest Dermatol. 1998; 111(6), 982–988. Recuperado de:
<http://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00436.x>

Zaidi, M.R., Day, C.-P., & Merlino, G. From UVs to Metastases: Modeling Melanoma Initiation and Progression in the Mouse. *J Invest Dermatol.* 2008; 128(10), 2381–2391. Recuperado de: <http://doi.org/10.1038/jid.2008.177>

Zhang, D., Yang, R., Wang, S., & Dong, Z. Paclitaxel: new uses for an old drug. *Drug Des Devel Ther.* 2014; 8, 279–84. Recuperado de: <http://doi.org/10.2147/DDDT.S56801>

Zimmerman, A., Bai, L., & Ginty, D.D. The gentle touch receptors of mammalian skin. *Science.* 2014; 346(6212), 950–4. Recuperado de: <http://doi.org/10.1126/science.1254229>

