



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Estudio de los Efectos de los Extractos
de *Punica granatum* y *Theobroma cacao*
sobre un Modelo de Fotocarcinogénesis
en Ratones SKH-1

D^a Antonia María López López

2019



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

**“Estudio de los efectos de los extractos de
Punica granatum y *Theobroma cacao* sobre un
modelo de fotocarcinogénesis en ratones SKH-1”**

Doctorando: Antonia M^a López López.

**Dirigido por: Fabio Camacho Alonso, Mariano
Sánchez Siles y Francisco José Gómez García.**

Tutor: Fabio Camacho Alonso

2019

“Estudio de los efectos de los extractos de *Punica granatum* y *Theobroma cacao* sobre un modelo de fotocarcinogénesis en ratones SKH-1”

RESUMEN

Introducción: El cáncer de piel no melanoma tiene una alta incidencia en la población mundial, y sus cifras aumentan cada año. Las radiaciones solares son la causa principal de este tipo de cáncer en humanos. Aunque la mayoría de estudios realizados sobre fotocarcinogénesis in vivo utilizan UVB como fuente de radiación, la RUVA también es carcinogénica a largo plazo.

Objetivos: Los extractos de granada y cacao han sido utilizados desde los orígenes de la humanidad con fines medicinales. Algunas de sus propiedades han sido propuestas recientemente como eficaces en la prevención de la fotocarcinogénesis y el fotoenvejecimiento, pero no han sido probados en modelos in vivo utilizando RUVA, por lo que éste es el propósito de nuestro trabajo.

Material y métodos: Utilizamos 27 ratones SKH-1/CRL hembras, que fueron divididos en tres grupos: Grupo 1 (control irradiado, n=9), Grupo 2 (ratones irradiados tratados con extracto de granada, n=9) y Grupo 3 (ratones irradiados tratados con extracto de cacao, n=9). Todos los animales fueron irradiados con la lámpara de bronceado cosmético Type HB 554/01/A que emite un 98,6% de UVA y un 1,4% UVB) 3 veces a la semana, durante una hora, con un total de 80 sesiones. Se realizó estudio macroscópico con la medida de áreas de lesión mediante análisis de imagen, así como estudio microscópico de la parte dorsal de la piel de los animales con Hematoxilina-Eosina para determinar el tipo y severidad de las lesiones, así como el estudio inmunohistoquímico con los marcadores PCNA, p53, MMP-9 y TIMP-1.

Resultados: Hemos observado una menor presencia de lesiones macroscópicas en los animales tratados con PGE ($p < 0.001$), menor incidencia de carcinomas escamosos invasores en ambos grupos tratados ($p < 0.001$ en PGE y $p < 0.05$ en CE), que además mostraban menor grado de proliferación celular que los del grupo control en el caso de PGE ($p < 0.001$). Observamos

mayor alteración de p53 en el grupo control que en los tratados ($p < 0.001$ con PGE y $p = 0.05$ con CE). No encontramos d.e.s entre los tres grupos respecto a TIMP-1 y MMP-9.

Conclusión: De forma global, nuestros resultados sugieren que el tratamiento oral con extracto de granada y de cacao a ratones SKH-1 protege frente a la fotocarcinogénesis cutánea provocada por la irradiación UVA, sobre todo el primero de ellos.

ABSTRACT

Introduction: Non-melanoma skin cancer (NMSC) has a high and increasing incidence all over the world. Solar radiation is the main aetiology for humans. Although most research into photocarcinogenesis uses UVB as a source of radiation, UVA is also carcinogenic in long term.

Objectives: Pomegranate (PGE) and cocoa (CE) extracts have been used for medicinal purposes for time immemorial. Recently, it has been claimed that some of their properties may be an effective preventative measure against photocarcinogenesis and photoaging, but to date in vivo models have not been tested using RUVA, the objective of the present work.

Materials and methods: We used 27 female SKH-1 / CRL mice, which were divided into three groups: Group 1 (irradiated control, $n = 9$), Group 2 (irradiated mice treated with pomegranate extract, $n = 9$) and Group 3 (irradiated treated mice with cocoa extract, $n = 9$). All animals were irradiated with the Type HB 554/01 / A cosmetic tanning lamp that emits 98.6% of UVA and 1.4% UVB) 3 times a week, for one hour, with a total of 80 sessions. A macroscopic study was performed with the measurement of lesion areas by image analysis, as well as a microscopic study of the dorsal part of the skin of animals with Hematoxylin-Eosin to determine the type and severity of the lesions, as well as the immunohistochemical study with PCNA, p53, MMP-9 and TIMP-1 markers.

Results: A lower incidence of lesions was observed in SKH-1 mice treated with PGE ($p < 0.001$), and lower incidence of invasive squamous carcinoma in both treatment groups ($p < 0.001$ for PGE and $p < 0.05$ for CE); the PGE group also showed a lower level of cell proliferation than the control group ($p < 0.001$). Significantly greater p53 alteration was observed in the control group than the treatment groups ($p < 0.001$ for PGE and $p = 0.05$ for CE). No significant differences were found in relation to TIMP-1 and MMP-9.

Conclusions: Taken together, the results suggest that oral feeding of PGE and CE to SKH-1 mice affords substantial protection against the adverse effects of RUVA, especially PGE.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, mi agradecimiento a mis directores y tutor, sin los cuales no habría sido posible esta tesis.

A mis amigos y compañeros, a los que ya considero amigos, con los que comparto penas y alegrías, risas y llantos. No me dejéis nunca. Los buenos siempre permanecen.

A mi abuelita Antonia, por estar, por quedarse, por estar pendiente de todo y de todos. Y a los que ya no están, Fajardo, Esteban y Trini, porque seguís dejando algo de vosotros cada día en mí. No hay día que no os recuerde y os sienta.

A mis hermanos, y cuñados que ya son mis hermanos, por aguantarme, por entenderme, por perdonarme una y otra vez; y por darme 3 sobrinos preciosos a los que adoro como si fueran mis hijos.

A mis padres, el máximo ejemplo de mi vida, a los que debo todo lo que soy y todo lo que tengo. Mi apoyo cada día y el coraje cuando el miedo me supera. Nunca me cansaré de agradecerlos todo.

A mi marido, compañero infatigable de viaje, refugio y consuelo de mi vida, por demostrarme que SIEMPRE está y estará, aunque no lo merezca.

A mis hijos, mi Julia y mi Lucas, motores de mi vida, por los que vivo y por los que moriría. Ojalá lleguen un día a leer esto y a darse cuenta de lo que significan para mí, la razón de esforzarme por el presente y el mañana, mi principal motivación. Por vosotros TODO.

A mi Virgencica de la Fuensanta, que me acompaña cada día en cada paso que doy... *“yo no sé qué tiene tu cara morena que lloran los ojos a su claridad...”*

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	9
1.1.	EL ÓRGANO DE LA PIEL.....	11
1.1.1.	MICROESTRUCTURA HISTOLÓGICA DE LA PIEL	11
1.1.2.	DIVERSIDAD FUNCIONAL DE LA PIEL	16
1.2.	LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA (RUV).....	18
1.2.1.	EFFECTOS DE LA RUV	20
1.2.2.	CLASIFICACIÓN DE LOS FOTOTIPOS CUTÁNEOS	22
1.2.3.	ASOCIACIÓN ENTRE LA RUV Y LAS LESIONES CUTÁNEAS.....	24
1.3.	CÁNCER CUTÁNEO	28
1.3.1.	LINFOMAS CUTÁNEOS DE CÉLULAS T	29
1.3.2.	MELANOMAS.....	29
1.3.3.	CÁNCER CUTÁNEO NO MELANOCÍTICO.....	32
1.4.	POLIFENOLES Y FLAVONOIDES	37
1.4.1.	EXTRACTO DE GRANADA (PUNICA GRANATUM).....	41
1.4.2.	EXTRACTO DE CACAO (CATEQUINAS DEL CACAO)	46
2.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	51
2.1.	JUSTIFICACIÓN.....	53
2.2.	OBJETIVOS.....	54
3.	METODOLOGÍA.....	57
3.1.	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	59
3.2.	GRUPOS EXPERIMENTALES.....	59
3.3.	EXPOSICIÓN A LA RUVA	59
3.4.	ANÁLISIS MACROSCÓPICO MORFOGENÉTICO DE LAS LESIONES	60
3.5.	MÉTODO ANATOMOPATOLÓGICO	61
3.6.	MÉTODO INMUNOHISTOQUÍMICO.....	62
3.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	62
4.	RESULTADOS	65
5.	DISCUSIÓN	79
6.	CONCLUSIONES	87
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	91
8.	ANEXOS.....	107

1. INTRODUCCIÓN

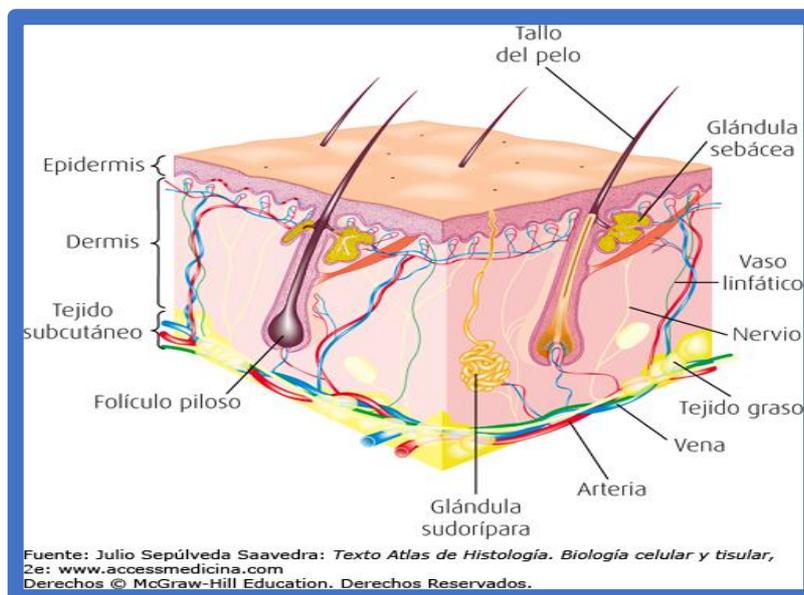
1.1. EL ÓRGANO DE LA PIEL

La piel es considerada el órgano más extenso y más pesado del organismo, es un órgano dinámico constantemente cambiante. En el ser humano ocupa aproximadamente 2 metros cuadrados, y su espesor varía entre los 0,5mm (en los párpados) y los 4mm (en el talón). Su peso aproximado es de 5kilos. También es conocido como sistema tegumentario. Desempeña gran variedad de funciones: protección frente a agresiones externas, impermeabilización, termorregulación, producción de vitamina D, absorción de radiación ultravioleta y detección de estímulos sensoriales (Huh y cols., 2018).

1.1.1. MICROESTRUCTURA HISTOLÓGICA DE LA PIEL

La biología estudia tres capas principales que, de superficie a profundidad, son: la epidermis, la dermis y la hipodermis. De la piel dependen estructuras llamadas anexos cutáneos, como son los pelos, las uñas, las glándulas sebáceas y las sudoríparas (Costin y Hearing, 2007) (Figura 1).

Figura 1: Microestructura cutánea.



La **epidermis** es la capa más externa, esencialmente celular y exenta de circulación sanguínea, por lo que depende de la dermis para la aportación de nutrientes. Su función esencial es la de barrera entre los dos medios, el externo y

INTRODUCCIÓN

el interno. Es un epitelio poliestratificado queratinizado del que surgen los folículos pilosebáceos, las glándulas sudoríparas y las uñas. Consta de cuatro tipos celulares: queratinocitos, melanocitos, células de Merkel de las terminaciones nerviosas y células fagocíticas de Langerhans. Los queratinocitos son las células mayoritarias, germinan en estrato basal de la epidermis y van ascendiendo formando los estratos espinoso, granuloso, lúcido(sólo en palmas y plantas) y córneo, a medida que se produce este ascenso, el queratinocito va aumentando el contenido en queratina hasta que la célula se aplana, muere y finalmente se desprende. Este ciclo o tiempo de tránsito epidérmico dura unos 30 días (Rippa y cols., 2019).

-Capa córnea: la más superficial de la epidermis. Está formada por células escamosas muertas, planas y delgadas que se desprenden continuamente, siendo sustituidas por otras. El citoplasma de estas células ha sido sustituido por una proteína hidrófoba, la queratina. Las uniones entre las células (los desmosomas), aparecen reforzados de manera que esta capa presenta una elevada resistencia a la erosión. El proceso por el cual las células más profundas de la epidermis se llenen de queratina y se desplacen hacia la superficie de la piel se denomina queratinización. En algunas enfermedades, el proceso de queratinización aumenta anormalmente produciendo una hiperqueratosis, caracterizada por una piel gruesa, poco elástica que se agrieta con facilidad.

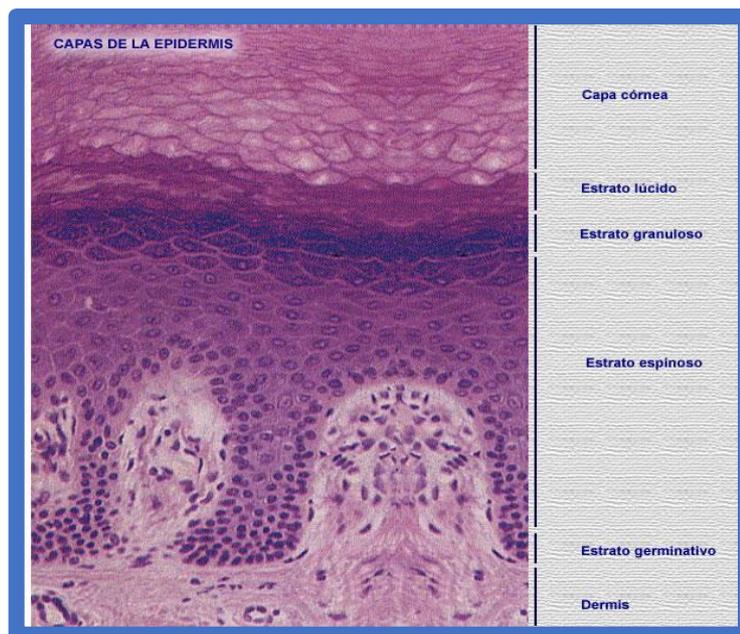
-Estrato o capa lúcida: los queratinocitos del estrato lúcido son diáfanos y se encuentran agrupados. Carecen de núcleo y el citoplasma está lleno de una sustancia gelatinosa, la eleidina, que se transformará en queratina. La eleidina es muy rica en lipoproteínas y cumple la función de impedir la entrada o salida de agua.

-Estrato granuloso: en esta capa se inicia el proceso de queratinización. Las células contienen unos gránulos que tiñen intensamente, rellenos de una sustancia llamada queratohialina, necesaria para la producción de queratina. Las células se distribuyen en dos o cuatro capas, y como han empezado a degenerar se observa en el citoplasma altas concentraciones de enzimas lisosomales, faltando ocasionalmente el núcleo.

-Estrato de células espinosas: consta de 8 a 10 capas de células de forma irregular con puentes intercelulares (los desmosomas) muy destacados. Las células de esta capa son ricas en ADN, necesario para la síntesis proteica que resultará en la producción de queratina. También llamada capa de Malpigio.

-Estrato basal: es una monocapa de células cilíndricas, siendo estas células las únicas que experimentan mitosis. A veces se le denomina estrato **germinativo**. A medida que se forman nuevas células, las primeras emigran o se desplazan hacia las capas superiores de la epidermis hasta que se desprenden de la superficie cutánea (Figura 2).

Figura 2: Capas de la epidermis.



Las células que migran desde el estrato germinativo tardan en descamarse alrededor de 4 semanas. Esto depende de la raza y género, así como también de la especie cuando se estudia en animales. La mayoría de los mamíferos comparte estas características estratales. Si la descamación está por debajo de 2 semanas o mayor de 4, se le considera patológico, y puede deberse a alteraciones congénitas.

INTRODUCCIÓN

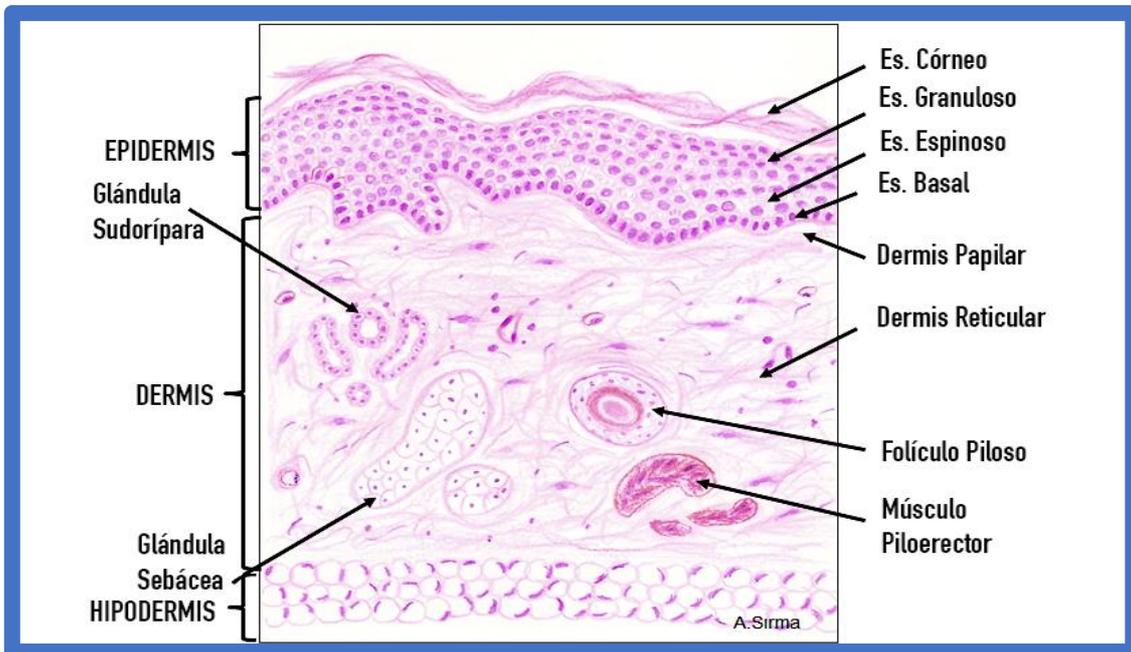
La tinción especial empleada en las técnicas histológicas es la de hematoxilina y eosina. Para el estudio de la epidermis a mayores rasgos se requieren estudios de microscopia electrónica. Otra tinción bajo microscopia óptica no muy usual es la tinción de Matoltsy y Parakkal.

La **Dermis** es la capa profunda de tejido conjuntivo denso de origen mesodérmico. Está constituida por tejido conectivo formado por la sustancia fundamental, fibras de colágeno y elastina en las que se encuentran los fibroblastos, vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. La sustancia fundamental está compuesta por glucosaminoglicanos, ácido hialurónico, condroitinsulfato y dermatansulfato, que embeben gran cantidad de agua formando un gel. Los elementos celulares de la dermis son los fibroblastos, mastocitos (células cavadas) y células fagocíticas (macrófagos, histiocitos). La dermis constituye el sostén de la epidermis. Puede dividirse en dos capas: papilar y reticular (Benedetto, 1998).

-Estrato papilar: compuesto por tejido conectivo laxo, fibras de colágeno tipo III, y asas capilares. Es la más superficial, limita superiormente con la epidermis y rodea a los anejos cutáneos.

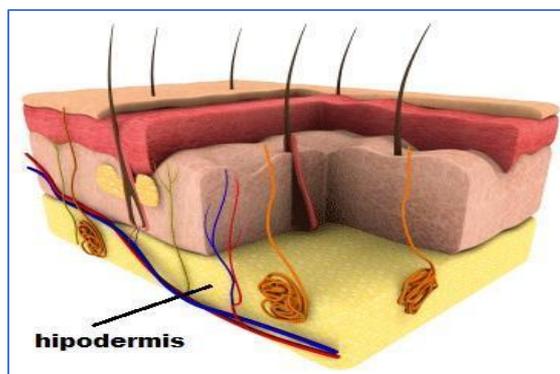
-Estrato reticular: compuesto por tejido conectivo denso, fibras de colágeno tipo I, fibras elásticas, en donde se encuentran microscópicamente mastocitos, reticulocitos y macrófagos. En su porción inferior se observa una capa de músculo liso que conforma al músculo piloerector. En la piel facial existe musculatura de tipo estriado en donde hay fijación de los músculos de la mímica de la dermis. Limita inferiormente con el tejido celular subcutáneo denominado también hipodermis o panículo adiposo (Figura 3).

Figura 3: Estratificación de la piel.



Hipodermis: o panículo adiposo o tejido subcutáneo, es la capa más interna de la piel y está formada por adipocitos llenos de lípidos y tejido conjuntivo laxo, lo cual le da funciones a la piel de regulación térmica y de movimiento a través del cuerpo. El grosor de esta capa difiere en función de la localización. Conecta la dermis con los tejidos subyacentes actuando a modo de aislante. Los componentes propios que integran el tejido subcutáneo son: ligamentos cutáneos, nervios cutáneos, grasa, vasos sanguíneos y linfáticos (Finlin y cols., 2019) (Figura 4).

Figura 4: Estructura de la hipodermis.



INTRODUCCIÓN

1.1.2. DIVERSIDAD FUNCIONAL DE LA PIEL

La función de la piel depende de su situación única entre el medio externo y el interno.

-PROTECCIÓN Y BARRERA DEL MUNDO EXTERNO. La piel, como órgano externo, se enfrenta a gran número de estímulos ambientales deseables o no (microorganismos, mecánicos, térmicos, radiaciones o químicos). Los estímulos de intensidad fisiológica son estimulantes y estabilizan la función. Los estímulos de intensidad distinta a la fisiológica se encuentran en primer lugar con los mecanismos de defensa y protección locales de la piel. Además, se pueden activar mecanismos de defensa generales. Cuando los mecanismos de defensa y protección de la piel son superados se producen lesiones. Las funciones protectoras de la piel son: 1. Defensa ante las infecciones por virus, bacterias y hongos; 2. Defensa frente a estímulos nocivos mecánicos; 3. Defensa frente a estímulos nocivos térmicos; 4. Defensa frente a las radiaciones nocivas con mecanismos de reparación enzimáticos; 5. Defensa frente a estímulos nocivos químicos (Berkey y cols., 2019).

-BARRERA RESPECTO AL MUNDO INTERIOR. La piel impide el intercambio incontrolado de sustancias entre el cuerpo y el entorno, por lo que resulta fundamental para la homeostasis; interna. Cuando se producen lesiones o defectos existe el riesgo de pérdida de líquido, electrolitos y proteínas con las consiguientes alteraciones del metabolismo o pérdidas de sangre.

-FUNCIÓN SENSITIVA. La piel tiene receptores sensitivos repartidos en toda su superficie que le permiten el reconocimiento del medio ambiente y la defensa ante los peligros. Los estímulos adecuados provocan las sensaciones de tacto, presión, temperatura y dolor y permite el reconocimiento de la intensidad y la procedencia del estímulo (palpación de un tumor cutáneo, picadura de insecto en la espalda, uña dentro del zapato, agua demasiado caliente). Los estímulos pueden desencadenar reacciones motoras voluntarias o involuntarias reflejas (Brink et al., 2019).

-FUNCIÓN DE COMUNICACIÓN Y EXPRESIÓN. La piel, como órgano superficial, desempeña un papel esencial en la comunicación psicosocial, sobre todo a nivel facial. Su aspecto sería valorado para obtener conclusiones acerca de su edad, estado anímico, carácter... pero también para descartar posibles enfermedades internas. La piel normal y patológica tiene una importante dimensión psicosocial.

-FUNCIÓN METABÓLICA Y DE RESERVA. La piel puede acumular agua en forma de edema y desecarse ante una gran pérdida de agua (exicosis). Cuando se produce una sobrealimentación se puede acumular un exceso de grasa en la piel (adiposidad), mientras que en la desnutrición se pierde dicho depósito (caquexia). A nivel metabólico destaca la síntesis fotoquímica de la vitamina D (si falta la luz solar se puede producir raquitismo). En los seres humanos el 90% de la vitamina D proviene de la piel y sólo el 10% de los alimentos. En primer lugar, el 7-dehidrocolesterol en la epidermis absorbe radiaciones con una longitud de onda <320nm y se convierte en provitamina D. La capa basal y espinosa contienen la mayor cantidad de provitamina D. En segundo lugar, la provitamina se isomeriza térmicamente para formar la vitamina D (coleciferol) en el hígado. En el riñón una segunda hidroxilación la transforma en el compuesto biológicamente activo, el calcitriol (Judistiani y cols., 2019).

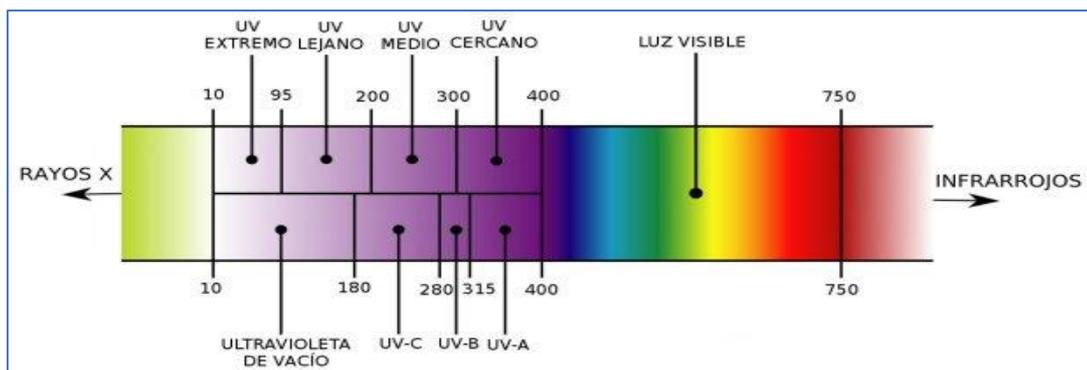
-ÓRGANO DE ALTA COMPLEJIDAD INMUNOLÓGICA. Participa en la vigilancia inmunológica. Dado que sus células: queratinocitos, linfocitos, fibroblastos, melanocitos y células de Langerhans, entre otras, sintetizan numerosas sustancias inmunológicamente activas, intervienen a modo de portero inmunológico en el reconocimiento y la internalización de antígenos, autorregulan el crecimiento y la diferenciación de sus componentes celulares, participan activamente en el tráfico linfocitario, y es uno de los órganos diana, en los intrincados mecanismos de la inflamación. Las sustancias inmunológicamente activas son interleuquinas, factores transformadores de crecimiento, factores estimuladores de colonias, interferones y citolisinas.

INTRODUCCIÓN

1.2. LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA (RUV)

Se denomina radiación ultravioleta o radiación UV a la radiación electromagnética cuya longitud de onda está comprendida entre los 400 nm y los 15 nm. Esta radiación es parte integrante de los rayos solares y produce varios efectos en la salud al ser una radiación entre no-ionizante e ionizante. La radiación UV puede dividirse en tres categorías: ultravioleta C (UVC) de onda corta (200-280 nm), ultravioleta B (UVB) de onda media (280 a 320 nm) y ultravioleta A (UVA) de onda larga (320-400 nm). La mayor parte de la radiación ultravioleta que llega a la Tierra lo hace en las formas UVC, UVB y UVA; principalmente en esta última, a causa de la absorción por parte de la atmósfera terrestre. Estos rangos están relacionados con el daño que producen en el ser humano: la radiación UVC (la más perjudicial para la vida) no llega a la tierra al ser absorbida por el oxígeno y el ozono de la atmósfera; la radiación UVB es parcialmente absorbida por el ozono y solo llega a la superficie de la tierra en un porcentaje mínimo, pese a que puede producir daños en los organismos vivos (Patra y cols., 2019).

Figura 5: El espectro de la radiación ultravioleta.



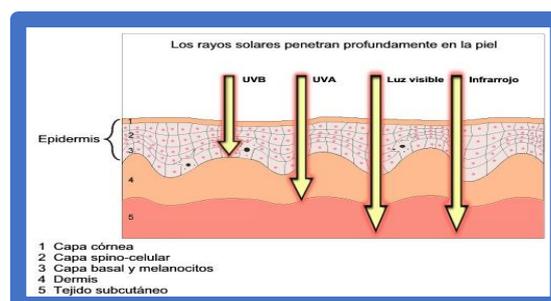
La UVC es incompatible con la vida y extremadamente perjudicial para la piel, debido a que estas ondas de luz tienen una enorme energía y pueden penetrar la piel hasta una profundidad de aproximadamente 60 a 80 micrómetros (μm) (Lautenschlager y cols., 2007).

La radiación UVB constituye alrededor del 5% de la radiación UV (Kullavanijaya y cols., 2005), y se cree que es la parte más activa de la radiación solar responsable de una gran variedad de enfermedades de la piel, incluyendo el cáncer de piel no melanoma y melanoma. La UVB penetra en la piel a una profundidad de aproximadamente 160-180 μm , y actúa principalmente en la capa basal de la epidermis. La radiación UVB es altamente mutagénica y puede inducir daño en el ADN, inmunosupresión, estrés oxidativo, agotamiento del sistema de defensa cutánea, envejecimiento prematuro de la piel, inflamación, arrugas, manchas, pérdida de elasticidad, y puede actuar como un iniciador de tumor, promotor de tumor y co-carcinógeno (Ichihashi y cols., 2003).

Los rayos UVA constituyen aproximadamente el 90-95% de la radiación solar que llega a la superficie de la tierra, y ya que su longitud de onda es más larga tienen gran capacidad de penetración en la de piel (1000 μm). Son capaces de atravesar las ventanas, la ropa ligera e incluso el parabrisas. Al contrario que la radiación UVB, es indolora y penetran hasta las capas más profundas de la dermis, donde generan radicales libres que provocan alteraciones celulares. La exposición a UVA conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), que pueden causar daño a nivel de las proteínas celulares, lípidos y ADN (Afaq y Catiyar, 2011).

Ambas, las radiaciones UVA y UVB, son las causantes de hasta el 90% de los cambios atribuibles al envejecimiento y, se vinculan fuertemente con el origen del melanoma y el cáncer de piel no melanoma, siendo consideradas en la actualidad como el carcinógeno ambiental más importante (Tanaka y cols., 2009) (Figura 6).

Figura 6: Penetración de los rayos UVA y UVB en la piel.



INTRODUCCIÓN

1.2.1. EFECTOS DE LA RUV

Podemos dividirlos en efectos beneficiosos y perjudiciales.

-EFECTOS BENEFICIOSOS.

-Acción calórica por los rayos infrarrojos.

-Acción antirraquítica, por la síntesis de vitamina D3 en la epidermis dependiente de la UVB. Esta vitamina tiene funciones hormonales, antiproliferativas y de diferenciación celular.

-Acción antidepresiva y de regulación de los ritmos circadianos. Modulación de la secreción de melatonina por la luz visible.

-Activación de los mecanismos antiinflamatorios

-Modulación de reacciones enzimáticas

-Destrucción de agentes patógenos

-Acción troficorregenerativa

-EFECTOS PERJUDICIALES

-Reacciones anormales a la luz solar o artificial. Divididos en los producidos a corto plazo: eritema solar, reacción de pigmentación y alteraciones inmunológicas; y aquellos que sólo se manifiestan después de muchos años de exposiciones solares exageradas y reiteradas: fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis.

-Inflamación: induce la liberación de óxido nítrico, estimula la liberación de neuropéptidos, estimula la proliferación y queratinización.

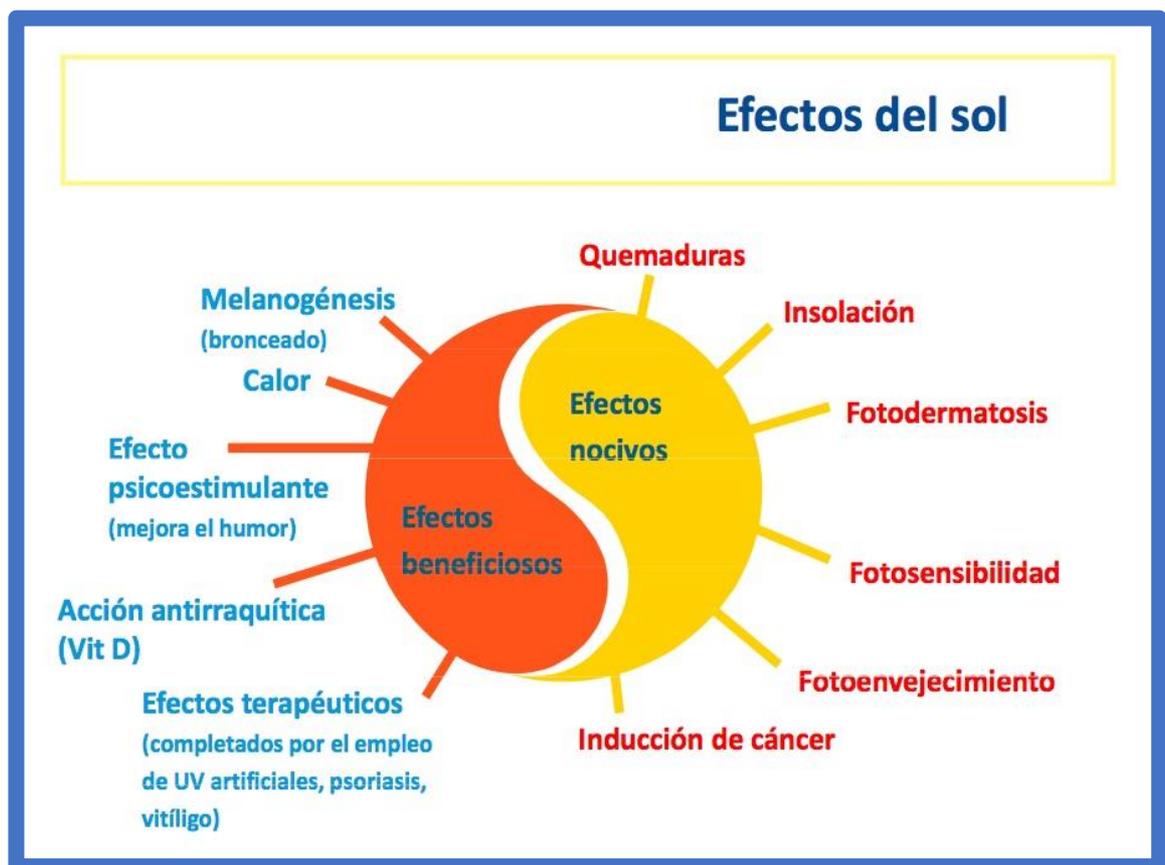
INTRODUCCIÓN

-Alteraciones inmunológicas: respuesta de hipersensibilidad retardada, por alteración de la presentación de antígenos por las células de Langerhans; y respuesta de rechazo de tumores malignos antigénicos inducidos por la RUV.

-Fotoenvejecimiento: cambios clínicos y microscópicos de la piel fotoexpuesta crónicamente.

-Fotocarcinogénesis: relacionada con un efecto acumulativo dosis-dependiente de la RUV y el tipo de piel y que lo relacionan con el cáncer de piel (Figura 7).

Figura 7: Efectos del sol sobre la piel.



INTRODUCCIÓN

Las consecuencias para la piel derivadas de la exposición excesiva al sol y del bronceado, son complejas, a destacar principalmente, las secuelas agudas, subagudas y crónicas (Diffey y Gies, 1998; Gilaberte y González, 2010) (Tabla 1).

Tabla 1: Efectos sobre la piel de la RUV.

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

1.2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS FOTOTIPOS CUTÁNEOS

El fototipo es la capacidad de la piel para asimilar la radiación solar. Su clasificación oscila entre I y VI según la escala Fitzpatrick, una clasificación numérica para el color de piel como un procedimiento de clasificar la respuesta de los diferentes tipos de piel a la luz ultravioleta (Fitzpatrick, 1975) (Tabla 2).

Tabla 2: Fototipos cutáneos.

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

El color de la piel, el pelo y los ojos, va a depender, en mayor o menor medida, de la cantidad de melanina y de su composición química (eumelanina, feomelanina, etc.) y ésta a su vez, del fenómeno de adaptación a las diferentes intensidades de las radiaciones UV ambientales en las áreas del hábitatoriginal (Holubar y Schmidt, 1998), En una menor proporción, de la hemoglobina de la sangre de los vasos de la dermis y de los carotenos de los alimentos. Otros compuestos de los alimentos, y numerosas sustancias exógenas como conservantes, colorantes y a veces medicamentos, pueden alterar la pigmentación cutánea.

INTRODUCCIÓN

1.2.3. ASOCIACIÓN ENTRE LA RUV Y LAS LESIONES CUTÁNEAS

Los estudios sobre mutagénesis adquieren cada día mayor importancia en el ámbito mundial, por el constante deterioro al que está sujeto el hábitat del hombre moderno. Por tal motivo, los seres humanos se encuentran expuestos a la acción de numerosos agentes genotóxicos (agentes capaces de dañar al ADN). Entre ellos se encuentra la radiación UV cada día con mayor incidencia sobre la tierra producto a la reducción de la capa de ozono. El cáncer de piel es uno de los efectos más severos que producen las radiaciones UV (Sahu, 2019; Hacker y cols., 2019; Lan y cols., 2019).

El resultado que se observa del efecto nocivo de la RUV en la piel es fruto de la acumulación de lesiones producidas por todas las exposiciones a las que la piel ha sido sometida a lo largo de los años, considerándose más peligrosas aquellas que han tenido lugar durante la infancia y, sobre todo, los episodios de inflamación de la piel o “quemaduras solares” inducidas por la RUV durante ese momento de la vida.

A continuación, describiremos detalladamente los procesos de fotoenvejecimiento y focarcinogénesis.

Fotoenvejecimiento

El proceso por el cual se dan cambios fisiológicos y morfológicos que terminan en la disminución de la funcionalidad del tejido y el aumento de la susceptibilidad al daño es lo que llamamos envejecimiento de la piel. Los cambios se acumulan y van progresando, con lo cual este proceso se acelera con el tiempo (Jenkins, 2002). El envejecimiento está influenciado por dos tipos de factores: los intrínsecos (genéticos) y los extrínsecos, que aunque actúan de manera independiente sus efectos se suman.

-Intrínsecos: Propios del tejido y del sujeto, como son el número de ciclos replicativos, el tipo celular y la información genética. Esto lleva al llamado envejecimiento innato o intrínseco, propio de las zonas no expuestas al exterior. Al

microscopio, se caracteriza por la disminución de los niveles de colágeno, la pérdida de hidratación y degradación de la red elástica. Macroscópicamente se observa adelgazamiento de la piel y arrugas muy finas por atrofia de la dermis y pérdida del tejido adiposo subcutáneo.

-Extrínsecos: son los que modelan el microambiente de la célula y del tejido, como los productos del metabolismo celular (que son derivados generalmente por compuestos exógenos), y la radiación ultravioleta. Fotoenvejecimiento se considera en general a estos factores extrínsecos debidos a la radiación UV, dada su importancia. Al microscopio, se observa una disminución de los niveles de colágeno, pérdida de hidratación de la piel y degradación de las fibras elásticas (Uitto, 2008). Macroscópicamente las características más importantes de la piel fotoenvejecida son sequedad y engrosamiento, la presencia de arrugas profundas, disminución de elasticidad y pigmentación irregular de la piel (Leyden, 2001). La característica más importante del fotoenvejecimiento son los acúmulos de material elástico en la dermis, aunque a diferencia de las fibras elásticas funcionales, no se disponen en redes ni fibras que den a la piel de elasticidad y resiliencia, para poder ejercer su función. La actuación de los factores extrínsecos lleva a un aumento de los radicales libres de oxígeno (RLO) en las células, comprometiendo su estabilidad y funcionalidad, haciendo mucho más rápido el proceso intrínseco de envejecimiento y modificando su evolución.

En el fotoenvejecimiento (envejecimiento extrínseco), se producen diferentes cambios celulares, como una disminución de la proliferación de los distintos tipos de células cutáneas y una menor eficacia en la respuesta ante los estímulos intra y extracelulares (Rabe y cols., 2006). Estos conllevan a la pérdida de las funciones de barrera de los queratinocitos y a irregularidades en la respuesta inmunitaria de la piel. La actividad de las metaloproteinasas disminuye en la matriz extracelular, inhibiéndose la degradación de las fibras de elastina y colágeno. Esto produce una pérdida de la estructura de la piel y un aumento del grosor de ésta. Al mismo tiempo, se produce un aumento en la vascularización mediada por cambios en la producción de factores de crecimiento y sus inhibidores en respuesta a la radiación ultravioleta B (UV-B). Además, se produce una disminución de los niveles de antioxidantes, enzimáticos o no, en la piel.

INTRODUCCIÓN

Estas células entran en senescencia proliferativa determinada principalmente por el acortamiento de los telómeros. Está comprobado que este acortamiento, aunque depende de factores genéticos y del número de ciclos reproductivos de la célula, se hace mucho más rápido por causas exógenas. Entre estas causas, por la oxidación de las guaninas teloméricas mediada por acción de RLO (Oikawa y cols., 2001), cuya presencia aumenta por efecto de la radiación ultravioleta, sobre todo la de tipo A.

Envejecimiento intrínseco:

- Cronológico, asociado con el avance de la edad
- Proceso continuo, universal e irreversible.
- Sin relación con factores ambientales modificables
- Manifestaciones clínicas: adelgazamiento de la piel, xerosis, arrugas finas y atrofia; sin cambios en la pigmentación.

Envejecimiento extrínseco:

- Asociado con factores externos ambientales: radiación ultravioleta, tabaco, contaminación, ingestión calórica
- Se produce como resultado de la exposición diaria a diversas fuentes que incrementan la producción de radicales libres.
- El principal factor exógeno de envejecimiento es la exposición crónica a la radiación ultravioleta, responsable del fotoenvejecimiento
- La severidad del fotoenvejecimiento es proporcional a la exposición solar acumulada e inversamente relacionada con el grado de pigmentación de la piel.
- El tabaquismo es un factor de riesgo independiente para la aparición prematura de arrugas faciales, incluso controlando la exposición al sol, la edad, el sexo y la pigmentación de la piel

-La exposición a la contaminación atmosférica está correlacionada con signos cutáneos de envejecimiento extrínseco, como las alteraciones en la pigmentación, lo que indica que la contaminación puede también influir en envejecimiento cutáneo.

-La restricción calórica está asociada a largo plazo con un menor daño oxidativo del ADN mitocondrial.

Fotocarcinogénesis

La RUV está asociada con la carcinogénesis y se considera un factor de riesgo importante para el desarrollo de tumores cutáneos malignos como el melanoma, el carcinoma de células escamosas (CCE), y el carcinoma basocelular (CBC). El más reconocido carcinógeno ambiental es la luz solar. La exposición acumulada a la RUV conduce directamente al daño del ADN con formación de mutaciones que pueden inducir carcinogénesis y que promueven el crecimiento de tumores a través de procesos inflamatorios.

La carcinogénesis es un proceso que consta de tres etapas principales: iniciación, promoción y progresión, con cambios celulares y moleculares característicos de cada una de ellas (Valko y cols., 2006).

Etapas de iniciación: se produce la transformación de células sanas en células cancerosas, que se caracterizan por presentar fallos en la señalización intercelular y en los mecanismos de regulación del ciclo celular. Este proceso ocurre porque las lesiones sufridas en el ADN se fijan y fallan los procesos que desencadenan la muerte de las células dañadas. Dándose estas dos condiciones, la célula que porta la mutación puede crecer transmitiendo los daños a las células hijas que también podrán acumular nuevos daños. Las "mutaciones clave" son las que ocurren en protooncogenes, que dan lugar a oncogenes, y en genes supresores de tumores. Por ello, las células se hacen resistentes a las señales de inhibición del crecimiento y de diferenciación. Es ahora cuando se puede hablar de células transformadas, iniciadas o cancerosas.

INTRODUCCIÓN

Etapas de promoción: Es la segunda etapa y se caracteriza por la expansión clonal de células transformadas y por la inducción de la proliferación y/o inhibición de la apoptosis. Todo esto lleva a la formación de una masa local que necesita la presencia continua de estímulos promotores de la proliferación para su mantenimiento. Llegados aquí, el correcto funcionamiento del sistema inmune es de importancia vital; por el reconocimiento de las células transformadas, y por la generación de una respuesta citotóxica frente a dichas células.

Etapas de progresión: tercer estadio del desarrollo tumoral en el que las lesiones adquieren la capacidad invasiva y metastática (Klaunig y Kamendulis, 2004). Asociado a la acumulación de un mayor número de daños en el genoma, aparecen vasos sanguíneos de nueva formación (angiogénesis) para la irrigación de las células neoplásicas.

La mutación del gen supresor de tumor es P53 en los queratinocitos epidérmicos es un punto importante y crítico en el comienzo de células tumorales en la piel, lo cual favorece la aparición, y por tanto la acumulación de más mutaciones al no producirse los mecanismos de reparación del ADN y al continuar la proliferación celular por la inhibición de la apoptosis. Añadido a todo esto y debido a la inmunosupresión inducida por la RUV, se produce una situación de tolerancia inmunológica que impide el reconocimiento de las células transformadas por el sistema inmune y que este sistema no desencadene la respuesta adecuada, lo cual favorece la supervivencia de las células y también la propagación de las mismas.

1.3. CÁNCER CUTÁNEO

Podemos diferenciar en la piel tres tipos de tumores dependiendo de la estirpe celular implicada: linfomas cutáneos de células T, los melanomas (si las células transformadas son melanocitos), y los cánceres de piel no melanómicos (originado en los queratinocitos).

A continuación, desarrollaremos los tres tipos de cáncer cutáneo, prestando mayor atención a los melanomas y a los cánceres de piel no melanocíticos; debido

a que los datos epidemiológicos relacionan la exposición a la RUV como la principal causa de este tipo de cánceres, pero no en los linfomas de células T cutáneos (Gallagher y Lee, 2006; English y cols., 1997).

1.3.1. LINFOMAS CUTÁNEOS DE CÉLULAS T

Los linfomas cutáneos de células T constituyen un grupo de linfomas no Hodgkin de la piel. La incidencia es de alrededor de 0,36 casos/100.000 habitantes/año, lo que constituye una proporción pequeña de los linfomas no Hodgkin (Connors y cols., 2002).

Los dos esquemas de clasificación empleados habitualmente son el de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Ralfkiaer y cols., 2001) y el de la European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) (Willemze y cols., 1997). Ambos coinciden en la existencia de dos subtipos principales: micosis fungoide y el síndrome de Sézary.

Otros subtipos menos comunes de linfoma cutáneo de células T son:

- Linfoma cutáneo anaplásico de células grandes con expresión de CD30+.
- Linfoma de tipo paniculítico de células T.
- Linfoma de células T agresivo epidermotrópico con expresión de CD8+.
- Linfoma de células T gamma-delta.
- Micosis fungoide hipopigmentada/vitiliginosa, que es más común en niños con tipos de piel oscura, especialmente niños africanos, latinos, del medio oriente, o India (Stevens y cols., 2003).

1.3.2. MELANOMAS

El melanoma conforma sólo el 1% de los casos de cáncer de piel, pero es causa de la gran mayoría de muertes por este tipo de cáncer. Globalmente, el melanoma ocupa la posición 16 y 15 de los cánceres más frecuentes en hombres y mujeres respectivamente. Para el año 2018, los cálculos de la Sociedad

INTRODUCCIÓN

Americana Contra el cáncer para este cáncer en los EEUU son: aproximadamente 91270 casos nuevos de melanoma (55150 en hombres y 36120 en mujeres). 9320 personas morirán a causa del melanoma. La frecuencia del melanoma es más de 20 veces mayor en los blancos que en los estadounidenses de raza negra. En general, el riesgo de padecer melanoma en el transcurso de la vida es de aproximadamente 2.6% para los blancos, 0,1% para los negros y 0,58% para los hispanos (Sampogna y cols., 2019).

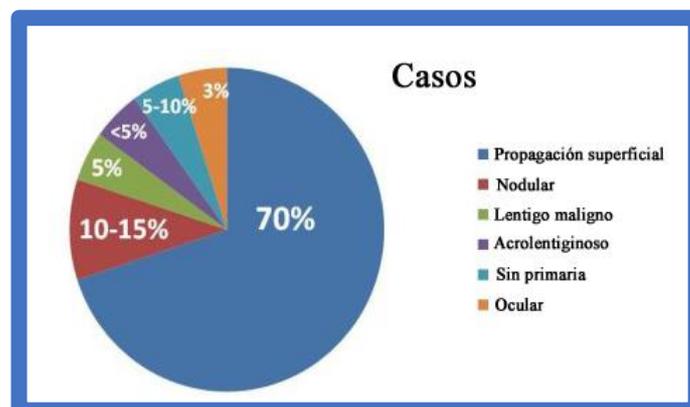
El factor de riesgo ambiental más importante para el melanoma es la exposición intermitente a la radiación UV, especialmente combinada con factores endógenos (fototipo cutáneo I y II, predisposición genética, inmunodeficiencia) (Armstrong y Kricger, 1993). La asociación entre la radiación UV y el melanoma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

El uso de las lámparas de bronceado como cosmético que emiten radiación UV es considerado como un factor de riesgo para el desarrollo del melanoma (Veierod y cols., 2003).

Tipos de melanoma

En la figura 8 aparece la distribución de los diferentes tipos de melanoma.

Figura 8: Distribución en porcentaje de los diferentes tipos de melanoma.



1.Melanoma de extensión superficial. Es el tipo más común de melanoma, lo que representa aproximadamente el 70% de los casos. Suele aparecer como una lesión plana o levantada levemente, a menudo con bordes irregulares y variaciones de color. Estas lesiones aparecen con mayor frecuencia en el tronco de los hombres, las piernas de las mujeres y la parte superior de ambos sexos. Se diagnostican con mayor frecuencia en los pacientes entre las edades de 30 y 50 años. Alrededor de la mitad de estos se producen en lunares preexistentes. Puede extenderse a lo largo de la capa superior de la piel, epidermis, por un período de meses o años antes de que se adentre en la piel. Crece de forma horizontal antes del crecimiento vertical (invasivo). Es el más común en población caucásica, con incidencia en aumento. Pronóstico relativamente favorable.

2.Melanoma nodular. Se encuentra con mayor frecuencia en tronco, cabeza y cuello. Representa el 10-15% de todos los melanomas. Es más común en hombres que en mujeres. Invade profundamente antes y por lo tanto a menudo se presenta con una mayor profundidad de invasión, cuando se encuentra y se hace la biopsia. Por esta razón, el melanoma nodular se asocia más frecuentemente a un peor pronóstico que los demás tipos de melanomas. Aparece generalmente de color negro azulado, con forma de cúpula o nódulo, aunque el 5% de los casos pueden tener color rosa o rojo. Nódulo pigmentado de crecimiento rápido (aunque existe el amelanótico), y puede estar ulcerado.

3.Léntigo maligno melanoma. Proviene de un melanoma (lentigo) preexistente, en lugar de un lunar. Históricamente, sólo el 5% de los casos de melanoma son melanoma lentigo maligno. Suele tardar muchos años en desarrollarse. Ocurre con más frecuencia en los adultos mayores, generalmente en la cara y otras áreas crónicamente expuestas al sol. Tiene una tasa que va en aumento constante durante las últimas décadas. Son generalmente grandes, planos, lesiones de color canela que contienen tonos diferentes de marrón, o como en otros melanomas, negro, azul, rojo, gris o blanco. Tiene un pronóstico relativamente favorable.

4. Melanoma lentiginoso acral. “Acral” viene de la palabra griega Akron, lo que significa extremidad, y la enfermedad suele aparecer en las palmas, plantas de los pies o debajo de las uñas. También llamado melanoma ungueal, representa menos

INTRODUCCIÓN

del 5% de todos los casos de melanoma, pero es el más común en negros y asiáticos. Progresan del mismo modo que un

melanoma común, pero debido a la creencia errónea que los melanomas ocurren solamente en áreas expuestas al sol y que la gente de piel oscura y asiáticos no están en riesgo de melanoma, estos son a menudo descubiertos más tarde y por ende, tienen un pronóstico mucho peor que los otros tipos de melanoma. Parecen moretones o lesiones en las palmas, plantas y de las uñas, por lo que a menudo no se diagnostica a tiempo. Cuando aparecen en forma de lesiones, por lo general son beige, marrón, o negro, con variaciones en color y bordes irregulares. En las uñas incluso azul (Tan y Stein, 2019).

5. Melanoma ocular. Se encuentra en el ojo, y es relativamente poco frecuente, representando sólo el 3% de los casos de melanoma. Sin embargo, es el tipo más común de cáncer intraocular primario en adultos. Comienza con crecimiento incontrolado de melanocitos en el ojo (Abt y cols., 2019).

1.3.3. CÁNCER CUTÁNEO NO MELANOCÍTICO

Se clasifican en dos tipos: carcinoma basocelular o de células basales, y de carcinoma células escamosas. Ambos presentan bajas tasas de mortalidad y de metástasis, pero a veces destruyen el tejido adyacente.

Carcinoma basocelular o de células basales

Es un tumor epitelial maligno de localización cutánea que surge de las células pluripotenciales de la zona basal de la epidermis y de la vaina radicular externa del pelo, a nivel del istmo inferior y de la protuberancia.

Es el cáncer más frecuente en el ser humano, especialmente en la raza blanca (en el hombre entre los 50 y 70 años y en mujeres a los 60 años), con un incremento de su tasa de incidencia en las últimas décadas (900.000 casos nuevos

al año en EEUU), sobre todo en grupos cada vez más jóvenes (menores de 40 años) (Lupu et al., 2019).

Se relaciona estrechamente con las RUV y menos frecuentemente con otras causas. En él están involucradas mutaciones de distintos genes, entre las que destaca la del gen supresor de tumor PATCHED (PTC) en el cromosoma 9q22 (Quist y cols., 2019).

La acción etiopatogénica de la RUV en este cáncer, se basa en: a) daño directo sobre el ADN (formación de dímeros de timina CC/TT y 6-4 fotoproductos), b) daño indirecto del ADN (vía oxidativa y producción de 6-8 hidroxiguanina), c) por inmunosupresión local y sistémica (alteración de las células de Langerhans en cantidad y función, disminución de CD4, DC8 y NK, desarrollo de ácido urocánico en su isómero cis, producción de TNF e interleucinas inmunosupresoras por los queratinocitos), y factores genéticos (mutaciones de algunos genes como p53 y N-ras) (Phatak y cols., 2019).

Los factores de riesgo más importantes son (Verkouteren y cols., 2019; Ibrahim, 2018):

- Piel blanca, con pelo rubio o rojizo y ojos claros.
- Edad (adultos de edad avanzada, con un aumento en la actualidad entre jóvenes menores de 40 años).
- Fototipo I-II.
- Exposición solar prolongada.
- Antecedentes de quemaduras solares.
- Localización geográfica (con mayor altitud).
- Exposición a radiaciones ionizantes.
- PUVA.
- Arsénico.
- Hidrocarburos aromáticos policíclicos.
- Inmunosupresión.
- Genodermatosis.
- Nevo de Jadassohm.

INTRODUCCIÓN

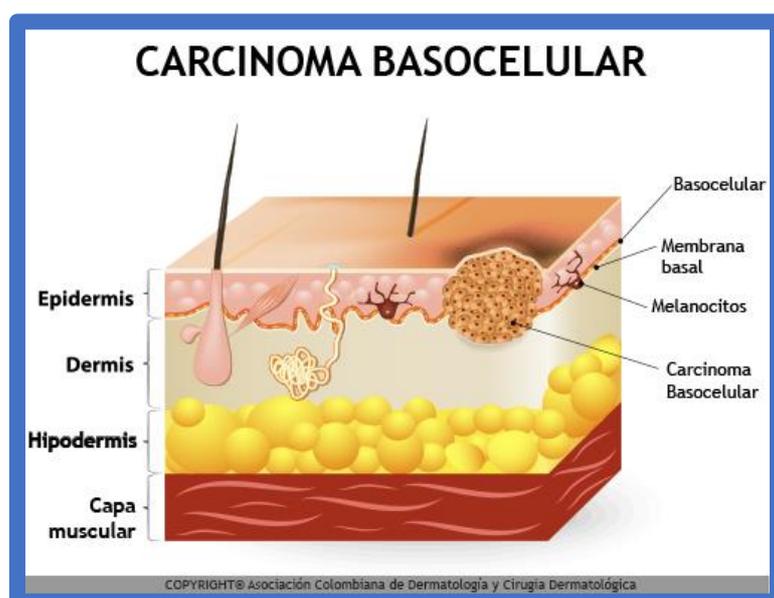
- Úlceras crónicas y cicatrices normales.
- Traumatismos e irritaciones crónicas.

Las formas clínicas se clasifican en (Batz y cols., 2018; Husein-ElAhmed, 2018):

- Papuloide.
- Erosiva.
- Superficial: eritematosa, eitematoescamosa, y eritematoescamocostrosa.
- Nodular.
- Panocicatricial.
- Ulcerada.
- Esclerodermiforme.
- Ulcerovegetante.
- Terebrante.
- Fibroepitelial de Pinkus.

Aunque se pueden agrupar en cuatro subtipos principales: nodular (60%), superficial (25%), micronodular (15%) y morfeaforme (2%) (Boitor y cols., 2019) (Figura 9).

Figura 9: Esquema de la localización histológica del carcinoma basocelular.



Carcinoma de células escamosas

Es el segundo cáncer de piel más común (después del carcinoma basocelular). Este tipo de cáncer de piel se origina en las células escamosas que conforman las capas suprabasales de la epidermis. Se pueden producir en cualquier parte del cuerpo, incluido en las membranas mucosas y las áreas genitales, pero se encuentran más frecuentemente en áreas expuestas al sol, como el borde de la oreja, el labio inferior, la cara, el cuero cabelludo calvo, el cuello, las manos, los brazos y las piernas. Siendo más frecuentes en hombres que en mujeres, a excepción de los localizados en la parte inferior de las piernas (Föll y cols., 2018).

Entre los factores predisponentes, además de la luz solar, se encuentran algunos carcinógenos industriales (alquitranes y aceites), úlceras crónicas y osteomielitis fistulizada, cicatrices de quemaduras antiguas, ingestión de arsenicales, radiación ionizante y en la cavidad oral el tabaco y el alcohol (Campos y cols., 2018).

Respecto a la clínica, el carcinoma espinocelular o de células escamosas se presenta como úlceras superficiales, frecuentemente con una corteza queratósica elevada y endurecida, o en forma de placas o nódulos. Generalmente, la piel adyacente suele mostrar cambios de daño actínico, se presenta como una lesión tumoral, exofítica, de crecimiento moderado en un período de meses. Suele presentar un tamaño que varía desde unos milímetros hasta varios centímetros dependiendo del tiempo de evolución. El 50-60% de los casos está localizado en cuello y cabeza y el resto se divide en otras zonas expuestas a la luz solar (Ventéjou y cols., 2019).

La causa exógena más frecuentemente aceptada de carcinoma de células escamosas es la exposición a la luz ultravioleta con la consiguiente lesión del ADN y la mutagenicidad asociada a ella. Las personas inmunosuprimidas por quimioterapia o trasplante de órganos, o que tienen xeroderma pigmentosum, tienen mayor riesgo de desarrollar neoplasias. Una proporción considerable de ellas son carcinomas de células escamosas, lo que implica alteraciones en las redes inmunitarias locales de la piel que producen una atmósfera permisiva para la

INTRODUCCIÓN

neoplasia. La luz solar, además de su efecto sobre el ADN, parece tener también un efecto inmunosupresor, al menos transitorio, en la piel, afectando a la función de vigilancia normal de las células presentadoras de antígenos de Langerhans responsables de la epidermis (Elghouche y cols., 2019).

Desde el punto de vista macroscópico, podemos diferenciar 5 subtipos de carcinoma de células escamosas:

1) Convencional: caracterizado por la proliferación de células epiteliales escamosas con núcleos alargados y pleomórficos y mitosis (a veces atípicas) en una cantidad variable. Tiene crecimiento hacia la dermis desde la epidermis, con frecuentes globos córneos y ocasionalmente imágenes de invasión perineural.

2) Fusocelular: subtipo formado por células atípicas, fusiformes, eosinofílicas, con núcleos pleomórficos y vesiculares, y más actividad mitótica que el tipo convencional; tiene un crecimiento por la dermis a partir de la epidermis, entre los haces de colágeno, y se rodea de un estroma mixoide. Suele estar asociado a traumas previos y/o radioterapia. Frecuentemente existe ulceración.

3) Acantolítico o adenoacantoma o pseudoglandular: se observan estructuras tubulares y alveolares formadas por células poligonales, con células disqueratóticas y ocasionalmente células en anillo de sello. Aparecen en cabeza y cuello, como un nódulo ulcerado.

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

5) Productor de mucina: las células neoplásicas son idénticas a las del tipo convencional, pero de más grandes y con citoplasma más pálido, con positividad al PAS y al mucicarmín. A veces forman estructuras glandulares, remedando a ductos ecrinos. Representa una variante anatomoclínica, por su mayor agresividad.

1.4. POLIFENOLES Y FLAVONOIDES

Polifenoles

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos, denominados polifenoles. Se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas de las plantas, mientras que otros participan en funciones de defensa, ante situaciones de estrés y estímulos adversos (Tian y cols., 2019).

Actualmente, han sido descritos numerosas clases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólico que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos.

Los principales grupos de polifenoles son:

- Los ácidos fenólicos: derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico.
- Los estilbenos.
- Los lignanos.
- Los alcoles fenólicos.
- Los flavonoides.

Son objeto frecuente de investigación debido a sus diversas funciones como lo es la asimilación de nutrientes, síntesis proteica, actividad enzimática, fotosíntesis, formación de componentes estructurales y la defensa ante los factores adversos del ambiente como la agresión por patógenos o insectos (Manach y cols., 2004). Además de estas funciones, los polifenoles son reconocidos por su marcada capacidad antioxidante (Sunkireddy y cols., 2013). Su ingesta es en promedio de 1 g/día, lo que es 10 veces mayor que la vitamina C y 100 veces mayor que la vitamina E (Van Dorsten y cols., 2012). Más allá de sus propiedades para captar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno de importancia en la patogénesis de diversas enfermedades, los polifenoles

INTRODUCCIÓN

pueden actuar en numerosas vías de señalización intracelulares como mediadores, lo que los convierte en moléculas muy interesantes para el desarrollo de nuevos fármacos.

La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido siquímico y la ruta de los poliacetatos (Bravo, 1998).

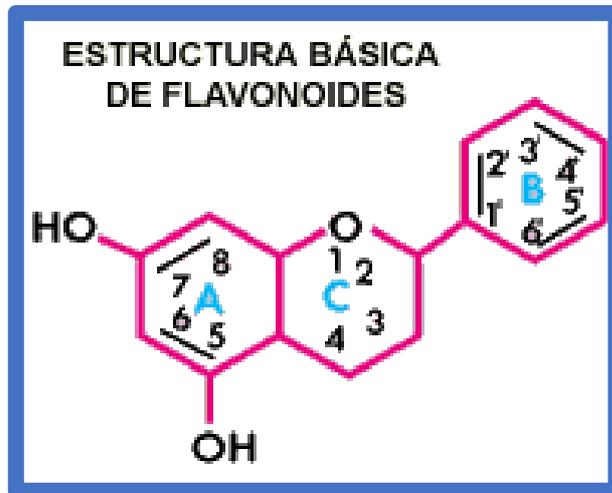
La ruta del ácido siquímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). Por último, la ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas.

Las rutas mixtas combinan precursores tanto de la vía del ácido siquímico como de la ruta de los poliacetatos, y a través de estas rutas mixtas se generan un importante grupo de moléculas biológicamente activas, denominadas flavonoides.

Flavonoides

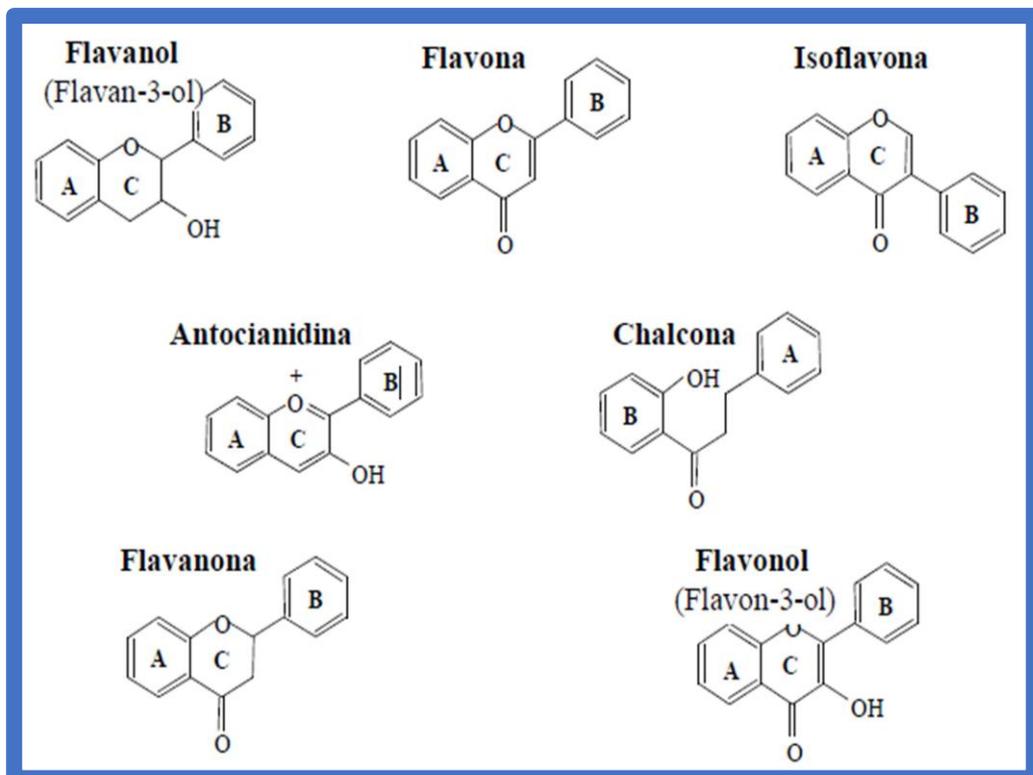
Los flavonoides, nombre que deriva del latín “flavus”, cuyo significado es “amarillo”, constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal. Estos son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común difenilpirano ($C_6-C_3-C_6$), compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico (Figura 10). Los átomos de carbono individuales de los anillos A, B y C se numeran mediante un sistema que utiliza números ordinarios para los anillos A y C, y números primos para el anillo B. De los tres anillos, el A se biosintetiza a través de la ruta de los poliacetatos y el anillo B junto con la unidad C3 proceden de la ruta del ácido siquímico (de Matos., 2019). Todos los flavonoides son estructuras hidroxiladas en sus anillos aromáticos, y son por lo tanto estructuras polifenólicas.

Figura 10: Estructura química básica de los flavonoides.



Entre los flavonoides, encontramos: flavonolones, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas, y flavanoles (Figura 11).

Figura 11: Núcleo estructural de los principales grupos de flavonoides.



INTRODUCCIÓN

Los **flavonoles** se caracterizan por poseer un grupo ceto en el carbono C₄ y una insaturación entre los carbonos C₂ y C₃. Poseen además un grupo hidroxilo adicional en el C₃. Representan el grupo más frecuente en los alimentos. La quercetina es el compuesto más representativo. Las principales fuentes de flavonoles son las verduras y las frutas. El té y el vino son también alimentos ricos en flavonoles. La biosíntesis de estos se produce mediante un proceso fotosintético. Por ello, estos compuestos se localizan principalmente en el tejido externo y aéreo de las plantas. A este subgrupo de flavonoides pertenecen las catequinas del cacao (Rynarzewski y cols., 2019).

Las **flavonas** poseen un grupo ceto en el carbono C₄ y una insaturación entre los carbonos C₂ y C₃. Son los flavonoides menos abundantes en los alimentos. El perejil y el apio representan la única fuente comestible de estos flavonoides. La piel de las frutas también posee grandes cantidades de flavonas polimetoxiladas (Sithisarn y cols., 2019).

Las **flavanonas** son análogos de las flavonas con el anillo C saturado. Se glucosilan principalmente por la unión de un disacárido en el C₇. Constituyen un grupo minoritario en los alimentos. Las flavanonas aparecen en altas concentraciones en cítricos, tomates, y en algunas plantas aromáticas como la menta. Las flavanonas se localizan fundamentalmente en las partes sólidas de la fruta, en concreto en el albedo (Stevens y cols., 2019).

Las **isoflavonas** poseen un anillo bencénico lateral en posición C₃. Su estructura recuerda a la de los estrógenos. Las isoflavonas poseen grupos hidroxilos en los carbonos C₇ y C₄, al igual que sucede en la estructura molecular de la hormona estriol. En realidad, las isoflavonas se pueden unir a receptores de estrógenos, y por ello se clasifican como fitoestrógenos. Se presentan casi exclusivamente en plantas leguminosas, siendo la soja y sus derivados la principal fuente de isoflavonas. A este subgrupo de flavonoides pertenece la *Punica granatum* (Wu y cols., 2019).

Las **antocianidas** son compuestos hidrosolubles y constituyen uno de los grupos más importantes de los pigmentos vegetales. Se encuentran principalmente

como heterósidos con los tres anillos de su estructura conjugados. La glucosilación ocurre principalmente en la posición 3 del anillo C o en las posiciones 5 y 7 del anillo A. También es posible la glucosilación de las posiciones 3', 4' y 5' del anillo B, aunque esta glucosilación aparece con menos frecuencia. Las antocianidas están ampliamente distribuidas en la dieta humana. Se encuentran en algunas variedades de cereales, el vino tinto, algunos vegetales, y principalmente en la fruta. A este subgrupo de flavonoides pertenece la *Punica granatum* (Papiez y cols., 2002).

1.4.1. EXTRACTO DE GRANADA (*PUNICA GRANATUM*)

Descripción botánica

El granado (*Punica granatum*) es un pequeño árbol frutal caducifolio de la familia Lythraceae, y cuyo fruto es la granada. Se trata de un arbusto o pequeño árbol de hasta 5m de altura, caducifolio, más o menos espinoso, muy ramificado. Tronco derecho, con la corteza resquebrajada y ramas opuestas, patentes; las jóvenes tetrágonas y a veces péndulas.

Las hojas, simples, de 1,5-7 por 0,8-2cm, son entre lanceoladas y oblongas, opuestas o subopuestas –en ramas jóvenes- o bien reunidas en fascículos alternos o subopuestos, caducas, subcoriáceas, lustrosas por el haz, de un verde amarillento, atenuadas en corto pecíolo con un ápice obtuso, a menudo redondeado, con glándula terminal (nectario) poco evidente. Las flores miden 3-4cm de diámetro, solitarias, más raramente geminadas con un pedicelo de hasta 3mm, acrescente al fructificar.

El cáliz tiene 2-4 por 1,5-2cm; es campaniforme, coriáceo, grueso, persistente, granate, glabro, brillante y segmentos triangulares soldados, persistentes en el fruto y en número variable de cinco a ocho. Los pétalos, son obovados, corrugados, caedizos, de color rojo intenso (por excepción rosáceos); pueden ser dobles, o más, en los cultivos. El androceo tiene estambres de filamentos largos, rojizos con anteras amarillas. El gineceo tiene ovario ínfero,

INTRODUCCIÓN

totalmente soldado al hipanto, con estilo filiforme y estigma capitado. El fruto es en balausta de 5-12cm, esférico, coriáceo, rojizo o amarillo-rojizo, coronado por los restos de los segmentos del cáliz, con lóculos en dos verticilos (raramente tres), de ordinario el inferior con seis lóculos y el superior con tres, todos ellos separados por el endocarpo membranoso y amarillento (tastanas).

Las semillas, maduras y frescas, tienen unos 12-15 por 5-7mm, con la capa superficial del episperma que es una sarcotesta –aunque hay autores que la describen como un arilo. Constituida por células columnares carnosas, translúcidas, angulosas, prismáticas, de un color que va desde el blanco hasta el rojo-granate, y es dulce y comestible. Al contrario, la capa interna de dicho episperma (endotesta) que, en ausencia de endosperma, rodea al embrión (oleaginoso y con cotiledones convolutos) es escleroso-cristalífero, carácter del orden de los Myrtales. Tiene una vida muy larga, algunos especímenes en Versalles se sabe que han sobrevivido por dos siglos. La fruta tiene una piel dura en forma de cáscara, con el fondo de color más o menos amarillo y rojo intenso. El interior está separado por paredes membranosas y el tejido blanco esponjoso en compartimentos llenos de bolsas transparentes llenas de una pulpa carnososa, sabrosa y jugosa. En cada saco, hay una semilla de color blanco o rojo, angular, blanda o dura. Las semillas representan aproximadamente 52% del peso de la fruta entera.

Productos funcionales derivados de la granada

En la actualidad, el estudio de los componentes bioactivos de la granada y sus posibles aplicaciones en medicina son de enorme interés (Koyama y cols., 2010).

La granada posee numerosos compuestos químicos de alto valor biológico en sus diferentes partes estructurales: corteza, membranas carpales, arilos y semillas. Alrededor del 50% del peso total de la granada corresponde a la corteza y a las membranas carpales, que son una fuente importantísima de compuestos bioactivos como polifenoles, flavonoides, elagitaninos, proantocianidinas, y minerales (principalmente potasio, nitrógeno, calcio, fósforo, magnesio, y sodio).

Por lo tanto, los productos nutracéuticos y condimentos alimentarios elaborados a partir de extractos de corteza y membranas carperales de la granada, pueden ser una fuente importante de estos compuestos bioactivos, si se han procesado de un modo correcto.

La parte comestible de la granada representa alrededor del 50% del peso total de la granada y a su vez consiste en un 80% de arilo (parte carnosa) y un 20% de semilla (parte leñosa). La composición de los granos de granada es la siguiente:

- Agua (85%).
- Azúcares (10%): principalmente fructosa y glucosa.
- Ácidos orgánicos (1,5%): fundamentalmente el ácido ascórbico, cítrico y málico.
- Compuestos bioactivos (3,5%): polifenoles y flavonoides (principalmente antocianinas) (Tablas 3 y 4) (Kozic y cols., 2015).

Tabla 3: Composición nutricional de la parte comestible de la granada.

NUTRIENTE	UNIDAD	VALOR POR CADA 100 G
PRINCIPIOS INMEDIATOS		
Agua	g	80,97
Energía	kcal	68
Proteína	g	0,95
Grasa	g	0,30
Carbohidratos	g	17,17
Fibra dietética	g	0,6
Azúcares totales	g	16,57
VITAMINAS		
Vitamina C	Mg	6,1
Vitamina A	UI	108
Vitamina E	mg	0,6

INTRODUCCIÓN

Vitamina K	µg	4,6
OTROS		
Fitoesteroles	mg	17
Colesterol	Mg	0
α-Caroteno	µg	50
B-Caroteno	µg	40

Tabla 4: Contenido de elementos minerales de la parte comestible de la granada.

MINERAL	mg/L	mg/kg
Calcio	74,7	30
Magnesio	65,7	30
Potasio	940	2590
Sodio	25,8	30
Hierro	8,8	3
Cobre	4,7	0,7
Manganeso	2,1	0
Zinc	4,4	1,2

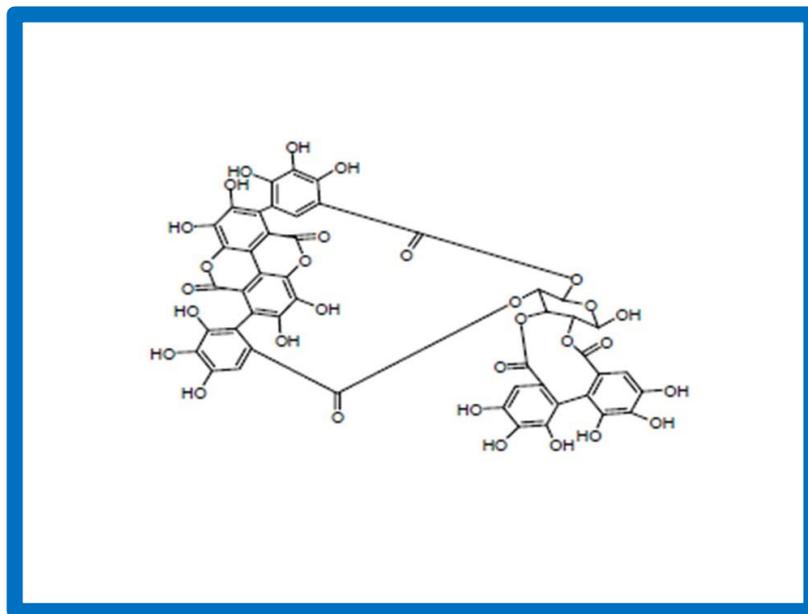
Compuestos fenólicos de bajo peso molecular

Los compuestos fenólicos se pueden dividir en moléculas simples y polímeros de éstas de mayor peso molecular. Entre los primeros cabe destacar a los flavonoides como los compuestos más importantes de este subgrupo, siendo los antocianinos los compuestos más representativos y responsables del color característico de la granada. Dentro de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular destacan los ácidos fenólicos y dentro de ellos el ácido gálico y el ácido elágico.

Compuestos fenólicos de alto peso molecular

Los taninos son los polifenoles más característicos de alto peso molecular. La piel de la granada es rica en taninos hidrolizables, principalmente punicalina, pedunculagina y punicalagina (Figura 12).

Figura 12: Estructura molecular de la punicalagina.



INTRODUCCIÓN

Acción de la granada como fotoprotector de la RUV

La RUVB y en menor grado la RUVA son factores causales de gran parte de los desórdenes cutáneos relacionados con la luz solar. La RUVB es el componente de la luz solar más dañino de la piel afectando a las células basales de la epidermis. En este sentido, en la actualidad se han probado numerosos suplementos dietéticos antioxidantes para prevenir o reparar los daños cutáneos tales como la pérdida de elasticidad, el fotoenvejecimiento prematuro y el cáncer de piel. Estos antioxidantes, entre los que se encuentra la granada, tienen la capacidad de aplacar las EROs (F'guyer y cols., 2003).

La fruta de la granada (*Punica granatum*) ha sido ampliamente consumida como fruta en fresco o zumo, atribuyéndole numerosas acciones curativas en la medicina tradicional (Soobratte y cols., 2006). Entre estas se encuentran:

- La protección por parte del óxido nítrico de la destrucción oxidativa y la reducción de estrés oxidativo en los macrófagos (Igarro y cols., 2006).
- El retraso en la proliferación de células de cáncer de próstata a través del citocromo P450 o regulado la síntesis de CYP1B1 (Kasimsetty y cols., 2009).
- Efecto citotóxico sobre las células de cáncer de colon (Kasimsetty y cols., 2010).
- Recientemente, se ha demostrado que el extracto de granada ejerce un efecto antitumoral en estudios de carcinogénesis cutánea mediante exposición a RUV en animales de experimentación (Afaq y cols., 2007); inhibiendo la activación del factor Kappa B provocada por la RUVB y modulando la proliferación de keratinocitos epidérmicos provocada por la RUA (Syed y cols., 2003).

1.4.2. EXTRACTO DE CACAO (CATEQUINAS DEL CACAO)

Descripción botánica

El cacao (*Theobroma cacao* L., *Sterculiaceae*) es un árbol originario de México cuyo fruto contiene 30 o 40 semillas que tostadas, molidas y mezcladas con

azúcar, vainilla, y canela constituyen el chocolate, consumido en todo el mundo por su sabor agradable. Las semillas de esta planta de reproducción preferentemente alógama (con número cromosómico $2n = 20$), de la familia Malvaceae, cultivada actualmente en las regiones tropicales de todo el mundo, no sólo se utiliza en la actualidad por la industria alimentaria, sino que también por la farmacéutica y cosmética (Dantas y Guerra, 2010).

En el neotrópico, la importancia y demanda de los granos de cacao, data de tiempos precolombinos. Aunque se ha documentado ampliamente que el cacao es originario de la Cuenca Amazónica y a partir de ahí se dispersó por centro y Sudamérica, existen vestigios de su uso con fines alimenticios, hacia los 1600-1200 años a.C. por los Mokaya, pobladores asentados en el lugar conocido como Paso de Amada en Soconusco en Chiapas (México) y los Olmecas de la región de San Lorenzo en Veracruz (México) (Powis y cols., 2011). Posteriormente, tras la colonización de América, el cacao se extendió hacia las regiones tropicales de África y Asia, donde actualmente se produce más del 80% del cacao mundial. La continuada popularidad del cacao, se debe tanto a los factores intrínsecos de las almendras como a los productos que posteriormente se obtuvieron a partir de ellas como el chocolate y la manteca de cacao.

Las almendras del cacao son ricas en polifenoles (aproximadamente el 15% de su peso seco) y alcaloides (hasta el 4%) y estos contribuyen en el sabor y el aroma del cacao. Los polifenoles confieren sensación de amargor y astringencia, mientras que los alcaloides confieren amargor y están involucrados en la palatabilidad de los alimentos que los contienen (Scalone y cols., 2019).

Los polifenoles del cacao

Los principales compuestos fenólicos presentes en las almendras del cacao se localizan en tres grupos: las catequinas o flavan 3-ol que representan el 37% del total, las antocianinas con cerca del 4%, y las proantocianidinas con el 58% (Rusconi y Conti, 2010).

Del primer grupo, la epicatequina es casi la única molécula que compone el grupo (cerca del 98% del total de las catequinas), aunque las proantocianidinas

INTRODUCCIÓN

sean el principal componente fenólico en almendras de cacao (Wollgast y cols., 2001).

En las últimas décadas, numerosas investigaciones, han demostrado que la acción antioxidante de las catequinas y epicatequinas del cacao, confirieren a la grasa del chocolate una particular resistencia a la peroxidación con propiedades beneficiosas para la salud (Gee y Johnson, 2001).

Polifenoles del cacao y enfermedades cardiovasculares

La capacidad de donar hidrógenos y su propensión a la nitración, hace a las catequinas y los componentes derivados de las procianidinas del cacao, unos poderosos barredores de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Vinson y cols., 1999).

De hecho, estudios metabólico-epidemiológicos han indicado el consumo regular de productos derivados del cacao incrementan el nivel plasmático de antioxidantes, lo que puede prevenir la oxidación del LDL colesterol y contribuir a proteger de las enfermedades cardiovasculares (Visioli y cols., 2000).

Una ventaja no vinculada a su composición en polifenoles, pero a tener en cuenta al valorar el efecto cardioprotector del chocolate, es que aunque el contenido graso del chocolate es alto, lo es especialmente en grasas saturadas, predominandolos triglicéridos del ácido esteárico, siendo estos triglicéridos mucho menos absorbibles que otras grasas y por lo tanto con mínimas elevaciones del colesterol sérico (Shahkhalili y cols., 2001).

Los compuestos fitoquímicos polifenólicos podrían inhibir los procesos vasculares e inflamatorios involucrados en la patogenia de varias enfermedades, posiblemente debido a alteraciones en la síntesis de eicosanoides celulares que incrementan las prostaciclina y reducen los leucotrienos (Schramm y cols., 2001).

Polifenoles del cacao y cáncer

Los mecanismos fundamentales relacionados con la patología del cáncer incluyen a las EROs y el daño secundario del ADN, por lo que existe consenso de

que los antioxidantes, ya sean naturales o sintéticos, tienen un efecto oncoprotector. En este sentido, existen algunos estudios en animales de experimentación que muestran la asociación entre el consumo de manteca de cacao o chocolate y el menor riesgo de desarrollar distintos tipos de cáncer (Weisburger, 2001).

Los polifenoles del cacao, inhiben la apertura de las bandas de ADN inducida por la mitomicina C, lo que sugiere que son efectivos evitando el daño del ADN (Yamagishi y cols., 2001).

Además, el extracto alcalino del bazago del cacao (policafeol), incluso en concentraciones milimolares, ha demostrado una acción tumoral sobre tumores de glándulas salivales humanas, debido fundamentalmente a que el policafeol es un efectivo barrador de iones supeóxido producidos por la reacción de la hipoxantina-xantina oxidasa (Jiang y cols., 2001).

Polifenoles del cacao y su efecto sobre la función plaquetaria

Los polifenoles del cacao han mostrado tener un efecto modularor sobre la función plaquetaria, reduciendo el riesgo de formación de trombos. El mecanismo de acción de los flavonoides se produce a nivel de la activación plaquetaria inducida por ADP y por epinefrina. Además, se ha observado que estos flavonoides incrementan la biodisponibilidad del óxido nítrico en las células endoteliales (Murphy y cols., 2003; Grassi y cols., 2005).

También se ha observado que el chocolate tiene un efecto sobre la actividad plaquetaria secundario a los cambios en dos eicosanoides (metabolitos del ácido araquidónico que median diversos procesos inflamatorios). De este modo, los leucotrienos de la serie 4 disminuyen y la prostaciclina se incrementa (Murphy y cols., 2003).

Polifenoles del cacao y su efecto en la presión arterial

El consumo de chocolate también se relaciona con la disminución de la presión arterial y la vasodilatación periférica. Este efecto, posiblemente sea debido a que los flavonoides del cacao aumentan la concentración de metabolitos de

INTRODUCCIÓN

especies nitrosiladas y nitrosadas y de esta forma se produce un aumento de la dilatación vascular (Fisher y cols., 2003; Engler y cols., 2004).

Polifenoles del cacao y su efecto fotoprotector de la RUV

La exposición a RUV es la principal causa de fotoenvejecimiento prematuro de la piel y juega un papel importante en la carcinogénesis cutánea. El mecanismo fundamental de este fotoenvejecimiento, consiste en que la exposición a RUV genera radicales libres en la piel y agota los sistemas antioxidantes endógenos cutáneos. La administración tópica y sistémica de antioxidantes incluyendo las vitaminas E y C, y multitud de fitoquímicos han demostrado tener un efecto beneficioso respecto a la prevención y tratamiento contra los daños cutáneos de la RUV (Andres-Lacueva y cols., 2008).

En los últimos años, el concepto de fotoprotección por medios dietéticos, está cobrando impulso en la comunidad científica, sobre todo mediante el efecto antioxidante y antiinflamatorio de los flavonoides (Nichols y Katiyar, 2010). Los efectos fotoprotectores de los flavonoides del cacao ingeridos, parecen estar estrechamente relacionados con el aumento de la microcirculación en la piel (Neukam y cols., 2007).

En este sentido, la fotoprotección dietética mediante el consumo de cacao ha demostrado también una mejoría en la cantidad y calidad de la piel en sus consumidores, aumentando la densidad y el espesor de la misma, aumentando la hidratación del estrato corneo, reduciendo la pérdida de agua transepidérmica y aumentando la rugosidad superficial (Heinrich y cols., 2006).

Finalmente, en la actualidad, también se ha demostrado que el consumo prolongado de cacao incrementa el flujo sanguíneo dérmico y la saturación de oxígeno (Neukam y cols., 2007).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICACIÓN

Los cánceres cutáneos superan en incidencia al resto de neoplasias malignas. Entre ellos, el más agresivo es el melanoma, que aunque solo representa el 5% de todos los cánceres cutáneos, ocasiona el 80% de las muertes (Weinstock, 2008). El cáncer cutáneo no melanocítico tiene una alta incidencia a nivel mundial, y sus cifras aumentan cada año. Aunque la mayoría de ellos son carcinomas basocelulares (80%), con un pronóstico excelente, entre un 15 y un 25% son carcinomas de células escamosas, en los que el pronóstico empeora y sí se asocia con cifras de morbilidad y mortalidad que no son despreciables (Eisemann y cols., 2014).

La exposición solar, la piel clara y la inmunosupresión son factores de riesgo del cáncer de piel no melanocítico. Las radiaciones solares son la causa principal de este tipo de cáncer en humanos, sobre todo en los de piel blanca. La RUVB (320-400 nm) es el componente mayoritario de la RUV que llega a la superficie terrestre (90-99%) y está relacionada con cánceres cutáneos tanto benignos como malignos. Mientras que la RUVB parece provocar un daño más directo sobre el ADN celular, los efectos de la RUVB son de tipo indirecto, a través de la producción de daño oxidativo mediante la liberación de EROs, que provocan diversas alteraciones genéticas que van desde mutaciones puntuales a dislocaciones cromosómicas (Bachelor y Bowden, 2004).

La *Punica granatum* L. (pomegranate) es un arbusto de hoja caduca, que ha sido ampliamente utilizado en la medicina tradicional en muchas regiones del mundo, incluyendo el área mediterránea, oriente medio, y Asia central (Shaygannia y cols., 2016). La granada es la fruta de este arbusto y tiene efectos biológicos tales como la actividad antiinflamatoria y antibacteriana. Los flavonoides y alcaloides de la granada han demostrado un importante potencial anticancerígeno *in vitro* e *in vivo* (Afaq y cols., 2010).

Por otra parte, las semillas de la planta *Theobroma cacao* L. (Sterculiaceae) son la principal materia prima con la que se elabora uno de los alimentos funcionales de mayor uso en todo el mundo, el cacao. Los Mayas y

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

los Aztecas ya usaban el cacao con fines curativos (Scapagnini y cols., 2014). El extracto de cacao es rico en polifenoles, principalmente catequinas y proantocianidinas, con capacidad de neutralizar EROs (Bosch y cols., 2015). Aunque existen numerosos estudios que evidencian la contribución del cacao sobre la fotoprotección, hay pocas investigaciones científicas que investiguen su posible acción protectora en la fotocarcinogénesis (Kim y cols., 2016).

Los ratones SKH1/CRL son un excelente modelo animal para estudios de la acción de la RUV sobre la piel, debido a que su piel es muy sensible a la RUV, eutímicos, inmunocompetentes y fáciles de manipular. El efecto del consumo alimenticio del extracto de granada y cacao ha demostrado una fotoprotección sustancial contra la RUVB en modelos experimentales sobre ratones SKH1 (Kim y cols., 2016). Sin embargo, se desconoce su posible efecto fotoprotector sobre la RUVA.

2.2. OBJETIVOS

El **objetivo general** fue el estudio de los efectos de la granada y el cacao sobre un modelo de fotocarcinogénesis cutánea con RUVA en ratones SKH-1.

Objetivos específicos:

1. Valorar mediante análisis macroscópico morfométrico el tamaño de las lesiones cutáneas en ratones SKH-1 expuestos a RUVA, tratados diariamente con un suplemento dietético de: nada (grupo control), extracto de granada, o extracto de cacao.
2. Estudiar la incidencia de carcinoma de células escamosas y lesiones cutáneas en ratones SKH-1 expuestos a RUVA, tratados diariamente con un suplemento dietético de: nada (grupo control), extracto de granada, o extracto de cacao.
3. Determinar mediante análisis inmunohistoquímico cuantitativo la proliferación de antígeno nuclear (PCNA) y positividad celular de P53 en ratones SKH-1 expuestos a RUVA, tratados diariamente con un

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

suplemento dietético de: nada (grupo control), extracto de granada, o extracto de cacao.

4. Calcular mediante análisis inmunohistoquímico semicuantitativo el grado de tinción estromal de TIMM y MMP-9 en ratones SKH-1 expuestos a RUVA, tratados diariamente con un suplemento dietético de: nada (grupo control), extracto de granada, o extracto de cacao.

3. METODOLOGÍA

3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales utilizados en este estudio fueron suministrados por el Servicio de Experimentación animal (REGA ES300305450012) (Unidad de Apoyo a la Investigación) de la Universidad de Murcia. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité Ético de experimentación animal de la Universidad de Murcia (España) y la autoridad competente (AXXXXXX) (Anexo 1), y siguió las Directrices de la Unión Europea para la experimentación animal (EU/63/2010).

Un total de 27 ratones macho SKH-1, con un peso entre 25 y 30 g (peso medio 28 g), se incluyeron en este estudio prospectivo aleatorizado, que tuvo lugar entre Octubre de 2017 y Noviembre de 2018. Los ratones se alojaron en jaulas ventiladas individualmente con 12/12 horas de ciclos de luz/oscuridad, comida y agua ad libitum. Los animales fueron aclimatados durante 1 semana antes del inicio del estudio.

3.2. GRUPOS EXPERIMENTALES

La aleatorización se realizó usando un servicio online (www.randomization.com). Los animales fueron aleatorizados en tres grupos (n=9 por grupo).

El grupo 1 (grupo control) no recibió ningún tipo de suplemento alimenticio. El grupo 2 recibieron un suplemento alimenticio diario de extracto de granada (Sigma-Aldrich® Química S.A., Madrid, España) (0,5% wt/wt). Finalmente, el grupo 3 recibió un suplemento dietético diario de extracto de cacao (Sigma-Aldrich® Química S.A., Madrid, España) (0,5% wt/wt).

3.3. TRATAMIENTOS

El extracto de Granada (*Punica granatum* L.) utilizado tenía una ratio entre 5:1 y 7:1). El solvente contenía un 70% de etanol y un 30% de agua. El contenido total

METODOLOGÍA

de punicalaginas era >5.0, ácido eláxico > 1.2, polifenoles > 50, carbohidratos 86.5, proteínas 2.8, grasas 1.1. El extracto de cacao (*Theobroma cacao L.*) fue preparado en un 80% de agua y un 20% de etanol. Contenía flavonoles, flavanoles, catequinas y otros monómeros (24.2) epicatequinas (115) y 226.6 de procianidinas oligoméricas, flavonoles (quercetin-3-O-glucoside 1.0; quercetin-3-O-arabinoside 1.0), antocianinas y alcaloides (10.3 teobromina y 1.1 cafeína). Ambos extractos fueron proporcionados por Naturex S.A. (Avignon, France).

Fueron añadidos al pienso estándar por la empresa PanLab (Barcelona), por lo que el alimento contenía los nutrientes habituales: 14,3% proteínas, 4,0% grasas, 48,0% carbohidratos, 4,1% fibra cruda, 18,0% fibra detergente natural y 4,7% de cenizas; densidad energética: 2,9 kcal/g); además de los extractos, a dosis de 520 y 228 mg por kilo de peso y día de granada y cacao respectivamente. Aproximadamente 41,9 y 18,37 mg/kg de peso corporal HED. Los animales lo consumían a demanda, desde dos semanas antes de la irradiación hasta el final del experimento.

3.4 EXPOSICIÓN A LA RUVA

Todos los animales fueron expuestos a RUV usando una lámpara Philips tipo HB 554/01/A (Philips, Madrid, España) con 8 tubos de 100 W. La lámpara tiene un espectro de emisión de 220-425 nm con un pico máximo de 364 nm (98,6% de RUVA y 1,4% de RUVB). Los animales fueron expuestos a RUV 3 veces por semana hasta un total de 80 sesiones, de 60 minutos de duración cada sesión (Figura 13).

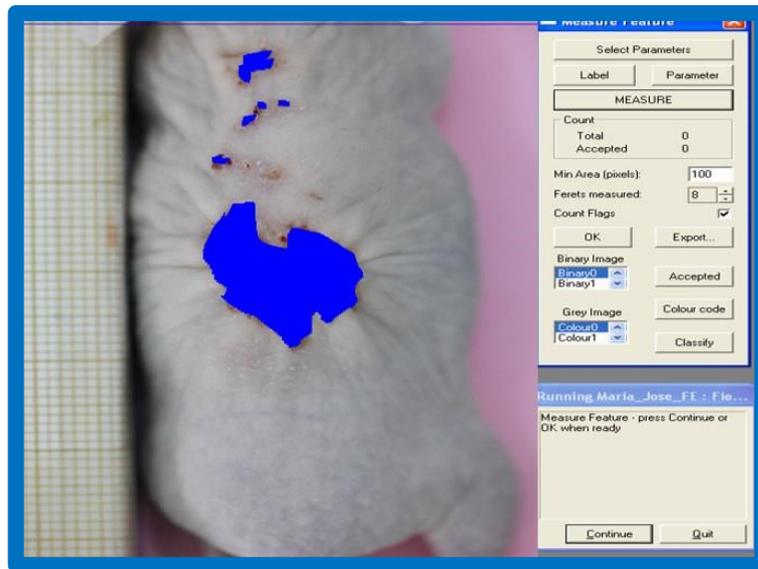
Figura 13: Lámpara de RUV.

Para homogeneizar la dosis de RUVA recibida por cada animal, estos fueron ubicados en cajas compartimentadas de PVC, con una distancia lámpara-piel de 20 cm. La energía recibida en cada sesión fue de 21,1 J/cm², por lo tanto al final del estudio cada animal recibió un total de 1688 J/cm².

3.5. ANÁLISIS MACROSCÓPICO MORFOGENÉTICO DEL TAMAÑO DE LAS LESIONES

Realizamos un detallado análisis macroscópico de la superficie cutánea del dorso de cada uno de los animales fotografiando de forma homogénea el dorso de todos los animales. Las fotografías se obtuvieron con una cámara digital de 6,1 megapíxeles (Canon® EOS 70D, Canon®, Tokio, Japón) acoplada a un trípode y equipada con macro lentes de 100 mm con una distancia focal mínima. Todas fueron realizadas a una distancia foco-dorso de 5 mm usando para la validación de las conversiones de medición, una regla milimetrada que era fotografiada junto al dorso de los animales. El estudio macroscópico del tamaño de la lesión en mm² se realizó mediante el software de histomorfometría LeicaQwin (Leica Imaging System, Cambridge, Reino Unido) (Figura 14).

Figura 14: Análisis del tamaño de las lesiones cutáneas.



3.6. MÉTODO ANATOMOPATOLÓGICO CON HE

Tras el sacrificio de los animales con CO₂, se extirpó la piel dorsal y las muestras fueron almacenadas en formolaldehído al 10%. Posteriormente fueron incluidas en parafina y se seccionaron en cortes de 3 µm en un plano paralelo a la incisión, se tiñeron con HE y fueron examinadas a 20X, 40X, y 100X, determinando si la piel era normal o aparecía queratosis actínica, displasia, carcinoma *in situ*, o carcinoma invasor.

3.7. INMUNOHISTOQUÍMICA

El estudio inmunohistoquímico de los tumores se realizó en el Hospital Universitario Reina Sofía (Murcia, España), usando los siguientes anticuerpos: antígeno de proliferación nuclear celular (PCNA), P-53, antimetalo proteinasa inhibidor 1 (TIMP-1), y antimetalo proteinasa 9 (MMP-9) (DAKO, S.A., Barcelona, España). Las tinciones inmunohistoquímicas fueron realizadas usando el método de streptavidin-biotin, incubando los anticuerpos a 4°C en condiciones de oscuridad en una dilución de 1:200.

El análisis inmunohistoquímico cuantitativo de PCNA y P53 fue expresado como el porcentaje medio de PCNA y P53, en relación al número total de células (Ibrahim y Elwan, 2017).

Finalmente, el análisis inmunohistoquímico semicuantitativo de TIMM y MMP-9 fue calculado multiplicando el grado de intensidad de estroma teñido (grado 0-3) con el porcentaje de superficie de estroma teñido: grado 0 (estroma no teñido), grado 1 (<10% del estroma teñido), grado 2 (10-50% del estroma teñido), y grado 3 (51-100% del estroma teñido) (Preidle y cols., 2019).

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS versión 20.0 (SPSS®, Chicago, IL, EEUU). Se realizó un estudio descriptivo de cada variable. Las asociaciones entre las diferentes variables cualitativas fueron estudiadas usando el test chi-cuadrado de Pearson. Aplicamos la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de homogeneidad de la varianza de Levene, y los datos mostraron una distribución normal, por lo que la estadística inferencial se realizó mediante test no paramétricos. Los test ANOVA y Tukey fueron aplicados a las variables cuantitativas. La significación estadística fue aceptada para $p \leq 0,05$.

4.RESULTADOS

RESULTADOS

Al valorar mediante análisis macroscópico morfométrico el tamaño de las lesiones cutáneas en ratones SKH-1 expuestos a RUVA, se observó que el orden de menor a mayor tamaño de las lesiones fue grupo granada < grupo cacao < grupo control ($1,24 \pm 1,08$, $10,53 \pm 3,25$, y $10,69 \pm 3,74$ respectivamente); observando diferencias estadísticamente significativas entre los animales tratados con granada al compararlo con el control ($p < 0,001$) y con los tratados con cacao ($p < 0,001$) (Tablas 5 y 6) (Figuras 15 y 16).

Tabla 5: Comparación con análisis macroscópico morfométrico del área de piel con lesiones (mm^2) entre los grupos de estudio (Test de Tukey).

Grupos de estudio		Área de piel con lesiones (mm^2) media \pm DT*
Control		$10.69 \pm 3.74^{\S}$
Granada		$1.24 \pm 1.08^{\#, \dagger}$
Cacao		$10.53 \pm 3.25^{\S}$

*DT = desviación típica. #Diferencias significativas con el grupo control; \S Diferencias significativas con el grupo granada; \dagger Diferencias significativas con el grupo cacao

Tabla 6: Área de piel con lesiones (mm^2) p-valores.

	Control	Granada	Cacao
Control	-----	<0,001	0,992
Granada	<0,001	-----	<0,001
Cacao	0,992	<0,001	-----

RESULTADOS

Figura 15: Representación gráfica de la comparación con análisis macroscópico morfométrico del área de piel con lesiones (mm²) entre los grupos de estudio (Test de Tukey). (*p≤0,05, **p<0,01).

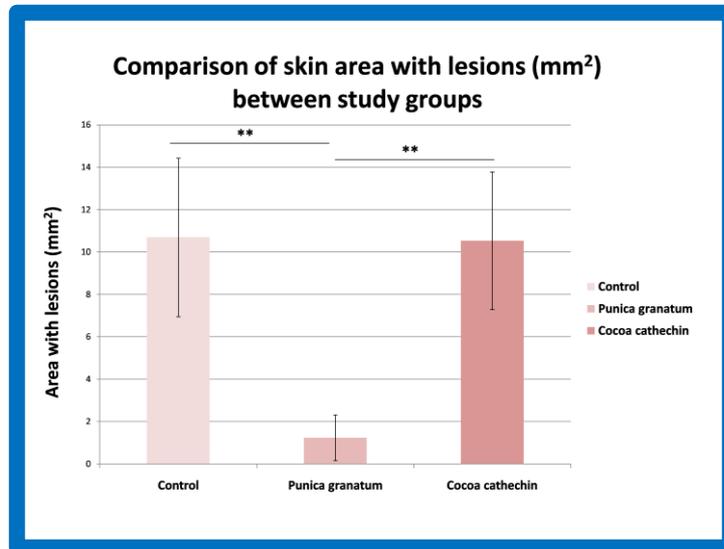


Figura 16: Piel de los animales al final del periodo de irradiación (80 sesiones).



RESULTADOS

Cuando estudiamos la incidencia de carcinoma de células escamosas y las lesiones cutáneas en ratones SKH-1 expuestos a RUVA, observamos que el orden de menor a mayor incidencia de carcinoma de células escamosas fue grupo granada < grupo cacao < grupo control (11,11%, 44,45%, y 100% respectivamente); observando diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control con los animales tratados con granada ($p < 0,001$) y con los tratados con cacao ($p < 0,009$) (Tablas 7 y 8). En relación a la presencia de lesiones en la región cutánea dorsal de los animales, observamos que el 77,78% de los animales tratados con granada presentaron piel normal, observando diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control ($p = 0,001$) y a los animales tratados con cacao ($p = 0,001$) (Tablas 9-14).

Tabla 7: Comparación de la incidencia de carcinoma de células escamosas (*in situ* o invasor) entre los grupos de estudio (Test chi-cuadrada de Pearson).

Grupos de estudio	Carcinoma de células escamosas n (%)
Control	9 (100) ^{§,†}
Granada	1 (11.11) [#]
Cacao	4 (44.45) [#]
#Diferencias significativas con el grupo control; §Diferencias significativas con el grupo granada; †Diferencias significativas con el grupo cacao	

Tabla 8: Incidencia de carcinoma de células escamosas (*in situ* o invasor) p-valores.

	Control	Granada	Cacao
Control	-----	<0,001	0,009
Granada	<0,001	-----	0,114
Cacao	0,009	0,114	-----

RESULTADOS

Tabla 9: Comparación de la incidencia de carcinoma de células escamosas (*in situ* o invasor) entre los grupos de estudio (Test chi-cuadrada de Pearson).

Grupos de estudio	Piel normal n (%)	Queratosis actínica n (%)	Displasia n (%)	Carcinoma in situ n (%)	Carcinoma invasor n (%)
Control	0 (0) [§]	0 (0) [†]	0 (0)	0 (0)	9 (100) ^{§,†}
Granada	7 (77.78) ^{#,†}	1 (11.11)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11) [#]
Cacao	0 (0) [§] 4 (44.45) [#]	1 (11.11)	2 (22.22)	2 (22.22) [#]	

Diferencias significativas con el grupo control; § Diferencias significativas con el grupo granada; † Diferencias significativas con el grupo cacao

Tabla 10: Incidencia de piel normal p-valores.

	Control	Granada	Cacao
Control	-----	0,001	-----
Granada	0,001	-----	0,001
Cacao	-----	0,001	-----

Tabla 11: Incidencia de queratosis actínica p-valores.

	Control	Granada	Cacao
Control	-----	0,303	0,023
Granada	0,303	-----	0,114
Cacao	0,023	0,114	-----

Tabla 12: Incidencia de displasia p-valores.

	Control	Granada	Cacao
Control	-----	-----	0,303
Granada	-----	-----	0,303
Cacao	0,303	0,303	-----

Tabla 13: Incidencia de carcinoma *in situ* p-valores.

	Control	Granada	Cacao
Control	-----	-----	0,134
Granada	-----	-----	0,134
Cacao	0,134	0,134	-----

Tabla 14: Incidencia de carcinoma invasor p-valores.

	Control	Granada	Cacao
Control	-----	<0,001	0,001
Granada	<0,001	-----	0,527
Cacao	0,001	0,527	-----

Al determinar mediante análisis inmunohistoquímico cuantitativo la PCNA y el P53 en ratones SKH-1 expuestos a RUVA, observamos que el orden de menor a mayor porcentaje de positividad para PCNA fue grupo granada<grupo cacao<grupo control ($11,52 \pm 4,78$, $15,05 \pm 2,39$, y $15,33 \pm 4,87$ respectivamente); observando diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de animales tratados con granada y el grupo control ($p<0,001$) y también al compararlo con los tratados con cacao ($p=0,032$). Del mismo modo, respecto al P53 el orden de menor a mayor porcentaje de positividad para P53 fue grupo granada<grupo cacao<grupo control ($12,86 \pm 4,11$, $16,46 \pm 3,81$, y $21,32 \pm 7,81$ respectivamente); observando diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control con los animales tratados con granada ($p=0,001$) y con los tratados con cacao ($p=0,050$) (Tablas 15-17) (Figura 17 y 18).

RESULTADOS

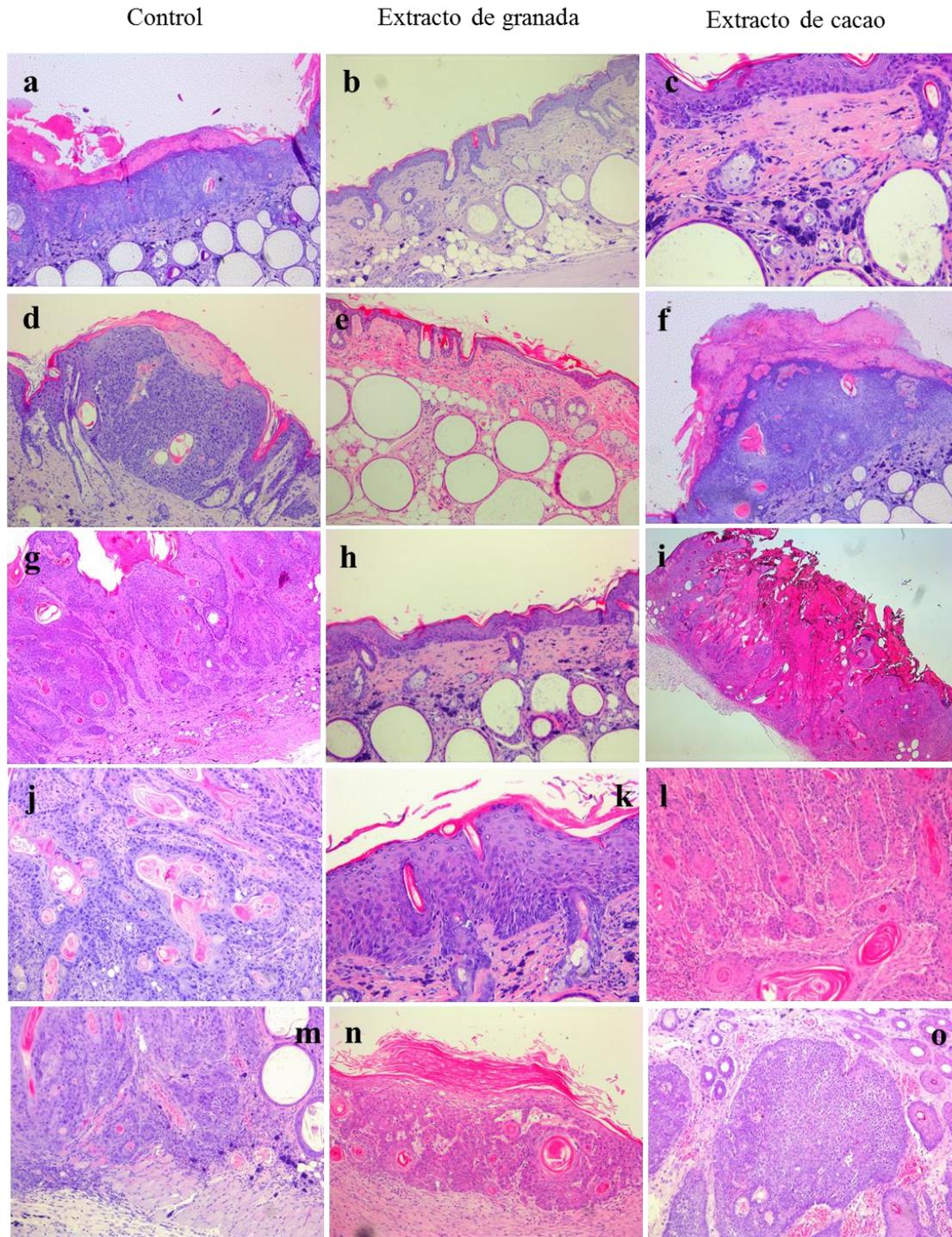


Figura 17: Lesiones histopatológicas en H.E.: **Control** (a: Hiperplasia epidérmica con displasia moderada; d: Carcinoma in situ; g: Carcinoma microinvasor; j: Detalle de cordones celulares infiltrantes en carcinoma espinocelular; m: Invasión profunda hasta plano muscular). **Extracto de granada** (b: Piel normal; e: Elastosis; h: Hiperplasia con displasia leve; k: Displasia severa/carcinoma in situ; n: Carcinoma microinvasor). **Extracto de cacao** (c: Hiperplasia epidérmica + elastosis dérmica con presencia de células gigantes; f: Carcinoma in situ muy queratinizado; i: Carcinoma microinvasor; l: Carcinoma espinocelular bien diferenciado con perlas de queratina; o: Nidos celulares invasores con abundante angiogénesis).

Tabla 15: Comparación del porcentaje de positividad celular inmunohistoquímica de PCNA y P53 en relación al número total de células entre los grupos de estudio (Test de Tukey).

Grupos de estudio	PCNA (%) media ± DT*	P53 (%) media ± DT
Control	15.33 ± 4.87 [§]	21.32 ± 7.81 ^{§,†}
Granada	11.52 ± 4.78 ^{#,†}	12.86 ± 4.11 [#]
Cacao	15.05 ± 2.39 [§]	16.46 ± 3.81 [#]

*DT = desviación típica. #Diferencias significativas con el grupo control; §Diferencias significativas con el grupo granada; †Diferencias significativas con el grupo cacao

Tabla 16: Porcentaje de positividad celular inmunohistoquímica de PCNA p-valores.

	Control	Granada	Cacao
Control	-----	<0,001	0,976
Granada	<0,001	-----	0,032
Cacao	0,976	0,032	-----

Tabla 17: Porcentaje de positividad celular inmunohistoquímica de P53 p-valores.

	Control	Granada	Cacao
Control	-----	0,001	0,050
Granada	0,001	-----	0,248
Cacao	0,050	0,248	-----

RESULTADOS

Figura 18: Representación gráfica de la Comparación del porcentaje de positividad celular inmunohistoquímica de PCNA en relación al número total de células entre los grupos de estudio (Test de Tukey). (* $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$).

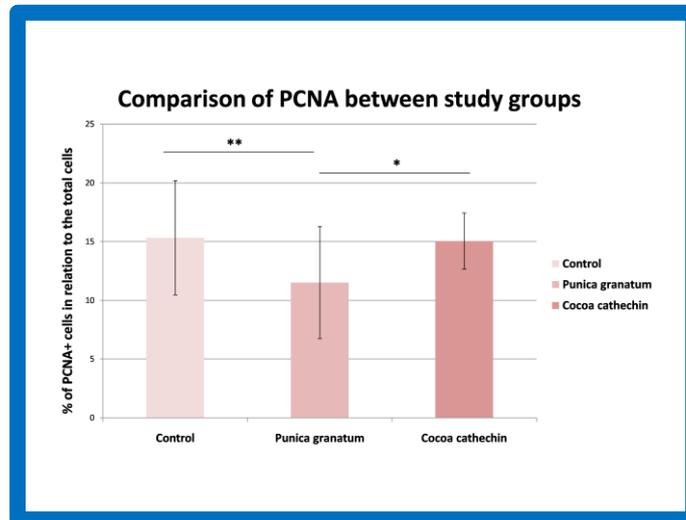
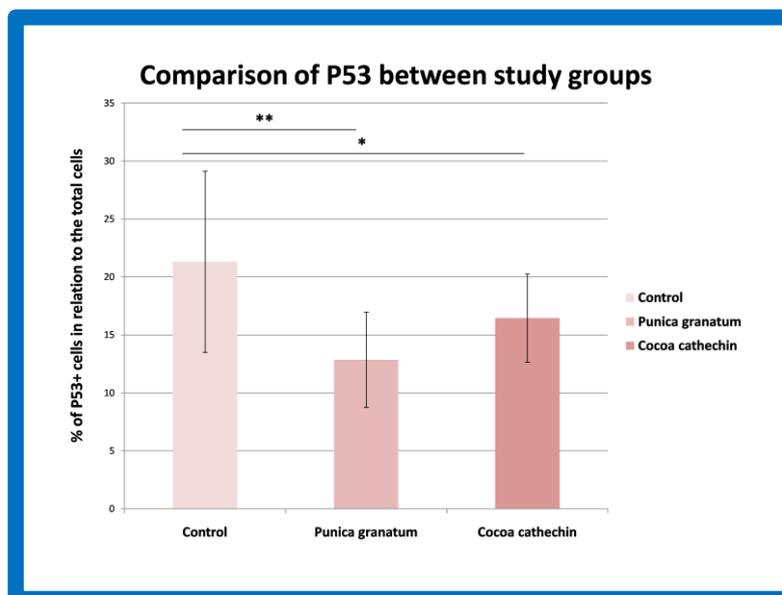


Figura 19: Representación gráfica de la comparación del porcentaje de positividad celular inmunohistoquímica de P53 en relación al número total de células entre los grupos de estudio (Test de Tukey). (* $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$).



RESULTADOS

Cuando calculamos mediante análisis inmunohistoquímico semicuantitativo el grado de tinción estromal de TIMM y MMP9 en ratones SKH-1 expuestos a RUVA, observamos que el orden de mayor a menor grado de intensidad de tinción fue grupo cacao>grupo granada>grupo control para TIMM ($1,67 \pm 0,71$, $1,44 \pm 0,72$, y $0,77 \pm 0,43$ respectivamente) y para P53 ($1,44 \pm 0,72$, $1,33 \pm 0,50$, y $1,00 \pm 0,00$ respectivamente); sin observar diferencias estadísticamente significativas (Tablas 18-20) (Figuras 19 y 20).

Tabla 18: Comparación del grado de intensidad (0-3) de tinción del estroma con TIMM y MMP-9 entre los grupos de estudio (Test de Tukey).

Grupos de estudio		TIMM	MMP-9
media \pm DT*	media \pm DT	media \pm DT	media \pm DT
Control		$0,77 \pm 0,43$	$1,00 \pm 0,00$
Granada	$1,44 \pm 0,72$		$1,33 \pm 0,50$
Cacao	$1,67 \pm 0,71$	$1,44 \pm 0,72$	

*DT = desviación típica. #Diferencias significativas con el grupo control; §Diferencias significativas con el grupo granada; †Diferencias significativas con el grupo cacao

Tabla 19: Grado de intensidad (0-3) de tinción del estroma con TIMM entre los grupos de estudio p-valores.

	Control	Granada	Cacao
Control	-----	0,136	0,821
Granada	0,136	-----	0,424
Cacao	0,821	0,424	-----

Tabla 20: Grado de intensidad (0-3) de tinción del estroma con MMP-9 entre los grupos de estudio p-valores.

	Control	Granada	Cacao
Control	-----	0,250	0,093
Granada	0,250	-----	0,872
Cacao	0,093	0,872	-----

RESULTADOS

Figura 20: Representación gráfica de la comparación del grado de intensidad (0-3) de tinción del estroma con TIMM entre los grupos de estudio (Test de Tukey). (* $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$).

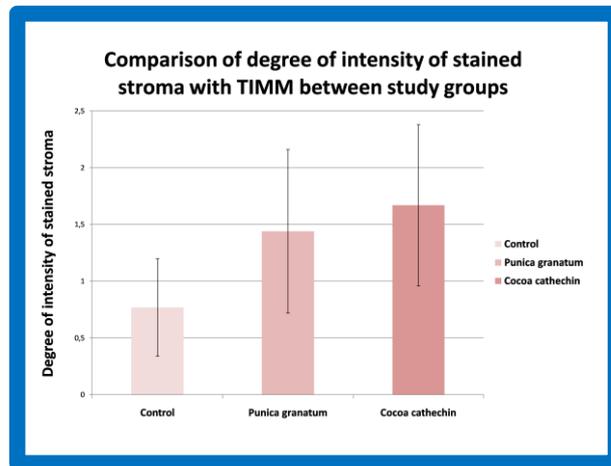
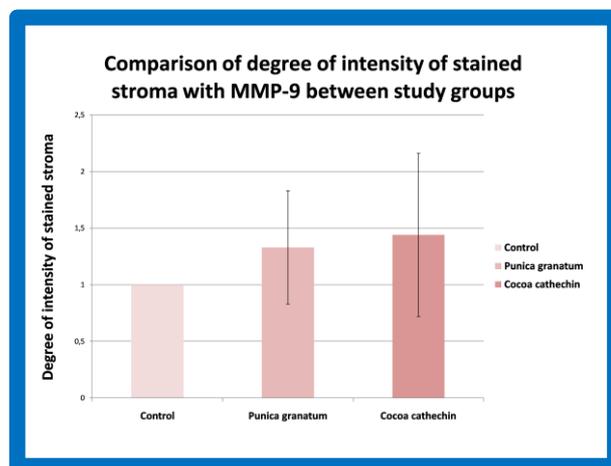


Figura 21: Representación gráfica de la comparación del grado de intensidad (0-3) de tinción del estroma con MMP-9 entre los grupos de estudio (Test de Tukey). (* $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$).



RESULTADOS

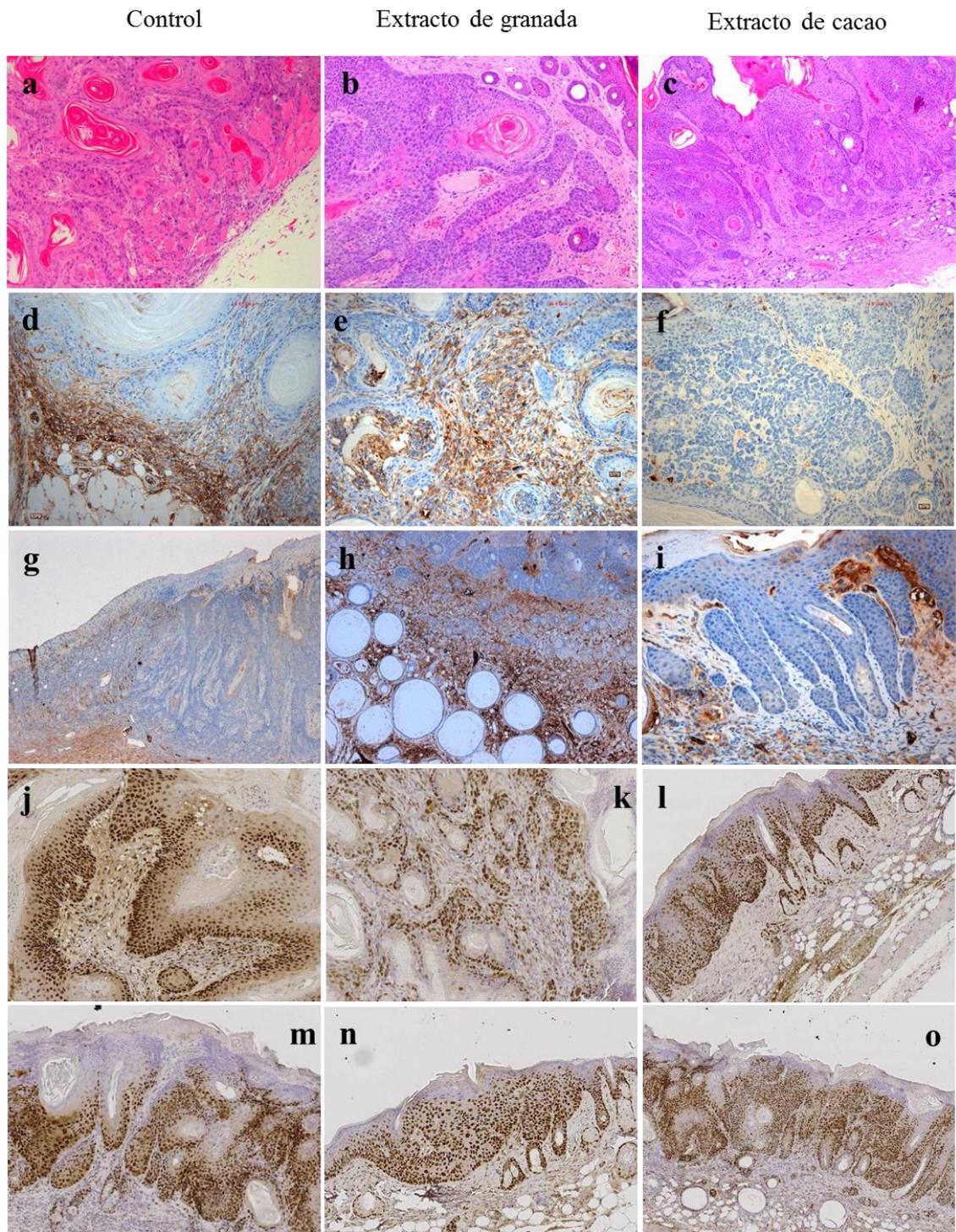


Figura 22: Carcinomas espinocelulares en los diferentes grupos (Haematoxilin-eosin) (a,b,c); Expresión de MMP y TIMP-1 en el estroma tumoral (d, e, f and g, h, i respectively); Inmunotinción de p53 (j, k, l) y PCNA (m, n, o).

5. DISCUSIÓN

En la actualidad, se considera que el cáncer cutáneo es el más frecuente en la raza blanca y ha sufrido un dramático incremento durante los últimos 40 años, debido fundamentalmente al cambio social experimentado respecto a la exposición al Sol y las RUV (Weinstock, 2008). Esto ha determinado que se considere a las RUV como el carcinógeno ambiental más importante en nuestros días, y explica el enorme interés sanitario por el conocimiento y control de los efectos de estas radiaciones (Duarte y cols., 2018).

El espectro de RUV puede ser dividido en tres rangos de longitud de onda: RUVA (320-400 nm), RUVB (280-320 nm), RUV C (200-280 nm). De la radiación solar que llega a la superficie de la tierra, más del 90% está compuesto por RUVA y 1–10% está compuesto por RUVB. Una gran porción de RUVB y todas las longitudes de onda de RUV C, son absorbidas por la capa de ozono. Así, los efectos biológicos se atribuyen a las RUV A y B.

Hace mucho tiempo que se conoce que la RUVB es un carcinógeno completo y puede generar carcinomas de tipo escamoso en animales. Su diana biológica principal es el ADN, donde se producen mutaciones puntuales del tipo CC a TT o de C a T (Bosch y cols., 2015). Durante muchos años, para la mayoría de autores, el espectro de acción para la generación de carcinomas cutáneos abarcaba principalmente la región RUVB, atribuyéndose a la región de RUVA solamente una cierta actividad carcinogénica (Forbes y cols., 1981). Estos autores consideraban que mientras que la RUVB era importante en la iniciación del tumor, la RUVA intervenía predominantemente en la promoción del mismo. Hoy día se acepta que aunque la RUVB es entre 1.000 y 10.000 veces más carcinogénica por J/m^2 que la RUVA; sin embargo la exposición crónica a RUVA también es carcinogénica, como quedó demostrado en diversos trabajos *in vivo* en la década de los noventa (de Laat y cols., 1997; Soufir y cols., 2004).

Sin embargo, debido a que la génesis de tumores es más rápida, la mayoría de trabajos realizados utilizan la RUVB en los modelos de carcinogénesis cutánea en ratones, sobre todo aquéllos que utilizan algún

DISCUSIÓN

tratamiento para prevenir y/o paliar sus efectos (Kim y cols., 2016; Rigby y cols., 2017; Afaq y cols., 2010; Park y cols., 2010). El equipo utilizado en nuestro estudio era una lámpara de bronceado cosmético que emite un 98,6% de RUVA, frente a un 1,45% de B. La RUVA actúa de forma indirecta mediante la generación de EROs, que actúan sobre moléculas fotosensibles tales como las porfirinas y NADH. Un aspecto importante es que, mientras que la RUVB es prácticamente absorbida en su totalidad por la epidermis (Seebode y cols., 2016), la RUVA es capaz de alcanzar las capas dérmicas e incluso afectar a las células sanguíneas circulantes (Moller y cols., 2002). Entre otros efectos, la RUVA puede también inhibir la reparación del ADN e inducir la síntesis de MMPs, lo que aumenta la agresividad biológica del cáncer de piel (Fisher y cols., 2001). En nuestro estudio, con un 100% de incidencia de carcinomas espinocelulares en el grupo control, hemos puesto de manifiesto que la RUVA es capaz de provocar todo el espectro lesional del fotoenvejecimiento.

Desde la primera exposición a RUV, todos los animales del grupo control presentaban, en la piel del lomo, eritema difuso, que mostraba carácter pasajero, puesto que desaparecía o disminuía notoriamente a partir de 2 ó 3 horas tras la exposición a las radiaciones. A partir de la 10^a-12^a sesión, el eritema se hacía permanente y se acompañaba de un marcado patrón geométrico de la piel, caracterizado por mostrar un aspecto reticular, que se fue haciendo más evidente con el paso del tiempo. Destacaba la aparición de prominentes arrugas longitudinales, que se observaban a lo largo de toda la superficie del dorso de los animales, con fenómenos de laxitud y pérdida de elasticidad de la piel, y aumentaban progresivamente de longitud y grosor, y que alternaban con áreas más localizadas, ligeramente sobreelevadas y de aspecto irregular o acompañado generalmente de superficie escamosa. Estas zonas se situaban de forma no ordenada entre las arrugas, así mismo, desde esa fecha y hasta finalizar las sesiones de RUVA, la piel fue presentando áreas cada vez más extensas de aspecto telangiectásico. A partir de la 40^a sesión, la piel adquirió aspecto granular difuso, y alrededor de la 50^a sesión, sufrían ulceración superficial extensa e irregular. En los controles, las lesiones neoplásicas comenzaron a aparecer a partir de 50^a sesión, mientras que en

los grupos tratados, las lesiones macroscópicas no se detectaron antes de las 60ª sesión. Estas lesiones se caracterizaban por ser de tipo nodular y fijadas a planos profundos. Algunas de ellas tenían límites irregulares, eran sobreelevadas, con bordes congestivos y aspecto verrucoso, mientras que otras mostraban el centro deprimido con aspecto escamoso y ulceración superficial. Se trataba de úlceras de fondo sucio y sangrado espontáneo en algunos casos. Al final del estudio, a las 75 sesiones, todos los animales del grupo control desarrollaron lesiones de aspecto neoplásico, siendo éstas muy similares a las del grupo de animales tratados con cacao.

Son muchos los estudios que avalan la hipótesis de que el uso de sustancias antioxidantes procedentes de plantas, tienen un efecto favorable en el tratamiento o prevención del fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis. Diversos estudios han demostrado la disminución de la respuesta inflamatoria, estrés oxidativo, daño en el ADN, aparición temprana de eritema, arrugas prematuras o el cáncer cutáneo tras la una exposición prolongada a las RUV, después del tratamiento con compuestos naturales (Bosch y cols., 2015). En nuestro estudio, hemos utilizado extractos purificados de cacao y granada, y hemos observado un descenso significativo en la incidencia de carcinomas cutáneos en ambos grupos, destacando el grupo de la granada. Pero además, en este mismo grupo, la mayor parte de los animales apenas mostraban lesiones, siendo catalogadas sus pieles como normales en el estudio histopatológico. Con el extracto de cacao no hay estudios previos *in vivo* en relación al tema de estudio, pero Kim y cols., (Kim y cols., 2016) publicaron un estudio en el que demostraron que la suplementación oral con cacao protege de la formación de arrugas provocadas por RUVB mediante la regulación de genes que intervienen en la formación y degradación del colágeno de la matriz extracelular (cathepsin G y serpin b6c). La granada, sin embargo, sí ha sido más estudiada, pero sobre todo frente a la RUVB. Afaq y cols., (Afaq y cols., 2010) realizaron un estudio con ratones SKH-1 a los que irradiaron una sola vez exposición de RUVB (180 mJ cm²) y trataron con un suplemento de granada en el agua de bebida (0.2%,wt/vol) durante 14 días antes. Sus resultados mostraron una inhibición del edema, hiperplasia,

DISCUSIÓN

infiltrado inflamatorio, peroxidación lipídica, generación de peróxido de hidrógeno, y un aumento de la actividad de la COX 2.

En concreto frente a la RUVA, inhibe la fosforilación mediada por la RUVA de STAT3, AKT, ERK1/2, mTOR y p70S6K; además, disminuye la regulación de la expresión de PCNA y Ki-67 y regula la expresión de Bax y Bad en los queratinocitos humanos (Syed y cols., 2006), inhibiendo los efectos del fotoenvejecimiento (Silva y cols., 2019). Pero en modelos *in vivo*, no había sido estudiado su efecto frente a la RUVA. En nuestro estudio, observamos una evidente disminución de las lesiones macroscópicas sobre todo en el grupo de la granada, con diferencias estadísticamente significativas respecto al control y al grupo cacao, que no mostraban diferencias entre sí. En el estudio microscópico con HE, la incidencia de carcinoma de células escamosas fue del 100% en el grupo control, mientras que los animales tratados con extracto de granada, solo desarrollaron un carcinoma y los tratados con cacao 4. Existían diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos tratados y el control. Era destacable la escasa afectación cutánea de 7 de los 9 animales tratados extracto de granada, cuya piel no difería de la normalidad.

El P53 es una importante proteína con funciones diversas y complejas, como la regulación del ciclo celular. Su alteración se relaciona directamente con el desarrollo de cáncer, estando mutada en más del 50% de los cánceres en humanos (Benjamin y Ananthaswamy, 2007). En ratones SKH-2 expuestos crónicamente a RUVB, la inactivación del P53 ha sido descrita entre un 50 y un 70% de los tumores, siendo además un evento temprano, detectado 1 semana después de la exposición a RUVB (Rigby y cols., 2017). En nuestro estudio, fue detectada una menor expresión de P53 alterada en los grupos tratados que en el control, existiendo diferencias estadísticamente significativas con éste, pero no entre ellos.

El PCNA es una proteína auxiliar necesaria para la síntesis y reparación del ADN. La cuantificación de PCNA se utiliza como un marcador de la proliferación celular en los tejidos para evaluar la eficacia de los fármacos

quimiopreventivos en la investigación del cáncer (Smolarek y cols., 2013), y está considerado como un factor pronóstico independiente de sobrevida, ya que su expresión se encuentra incrementada en lesiones de mayor grado de malignidad tanto en el carcinoma de células escamosas como en el melanoma (Ruksha y cols., 2007). En el presente trabajo, la expresión de PCNA fue muy similar en los grupos control y extracto de cacao, sin embargo, en las lesiones de los animales tratados con granada, observamos un menor índice de proliferación celular, con diferencias estadísticamente significativas respecto a los otros dos grupos. Estos resultados coinciden con otros estudios realizados en queratinocitos humanos irradiados con RUVB (Syed y cols., 2005). y en ratones SKH-1 con RUVB (Afaq y cols., 2010).

Las MMPs son una familia de enzimas proteolíticas capaces de degradar distintos componentes de la matriz extracelular. Su papel en tejidos sanos es la remodelación fisiológica de los mismos, tanto en su formación como en su desarrollo y reparación. En el cáncer, están relacionadas con procesos tan importantes como la angiogénesis, la proliferación celular, la invasión celular y las metástasis. La MMP-9 pertenece al subgrupo de las gelatinasas, y su función es la degradación de componentes de la membrana basal, tales como el colágeno tipo IV y la laminina, además de otros componentes de la ECM. Este proceso está regulado por los inhibidores de MMPs (TIMPs). Aunque existen 4 tipos, uno de los más usados en NMSC es TIMP-1, que suele estar inhibido en pacientes con cáncer cutáneo (Fu y cols., 2012). En nuestro estudio, la expresión de MMP-9 fue superior en los grupos tratados que en el control, pese a ser mayores los tumores de éste último. TIMP-1, sin embargo, mostró mayor expresión en los grupos tratados, por lo que parece que la inhibición de la degradación de la MEC era más activa en estos grupos, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas en ningún caso. Aunque en muchos estudios, la expresión de MMP-9 es mayor en los tumores y lesiones precancerosas que en tejido sano (Gupta y cols., 2014). Otros como Poswar y cols., (Poswar y cols., 2013) encuentran una mayor expresión en los carcinomas microinvasores que en aquellos que invadían en profundidad, concluyendo que la actividad proteolítica de la MMP-

DISCUSIÓN

9 se da sobre todo en estadíos iniciales de la carcinogénesis y que después decrece. Este hecho podría explicar lo ocurrido en nuestro estudio, donde los tumores del grupo control se encontraban evolutivamente más avanzados que los de los grupos tratados.

Mientras que muchas investigaciones, se han centrado en los efectos de la RUVB, existen pocos estudios sobre la fotocarcinogénesis *in vivo* producida por la RUVA. Por eso hemos creído necesaria la realización de este trabajo, y además, tratar a los animales con extractos cuya eficacia en la quimioprevención del cáncer cutáneo provocado por RUVB parece demostrada. Nuestros resultados sugieren que la alimentación oral de extractos de granada o cacao en ratones SKH-1 proporciona una protección sustancial contra los efectos adversos de la RUVA, sobre todo la granada. Evidentemente, son necesarios más estudios para conocer los mecanismos de acción de estas sustancias, pero parece que en un futuro podrían tener un papel importante en la prevención del carcinoma de células escamosas cutáneo.

6. CONCLUSIONES

1. El tamaño de las lesiones cutáneas en ratones SKH-1 expuestos a RUVA, fue menor al administrar un complemento dietético de extracto de granada, seguido de los animales tratados con extracto de cacao.
2. La incidencia de carcinoma de células escamosas y lesiones cutáneas en ratones SKH-1 expuestos a RUVA, fue menor al administrar un complemento dietético de extracto de granada, seguido de los animales tratados con extracto de cacao.
3. La proliferación de antígeno nuclear (PCNA) y positividad celular de P53 en ratones SKH-1 expuestos a RUVA, fue menor al administrar un complemento dietético de extracto de granada, seguido de los animales tratados con extracto de cacao.
4. El grado de tinción estromal de TIMM y MMP-9 en ratones SKH-1 expuestos a RUVA, fue mayor al administrar un complemento dietético de extracto de cacao, seguido de los animales tratados con extracto de granada.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abt NB, Zhao J, Huang Y, Egharari AO. Prognostic factors and survival for malignant conjunctival melanoma and squamous cell carcinoma over four decades. *Am J Otolaryngol* 2019; 40:577-82.

Afaq F, Khan N, Syed DN, Mukhtar H. Oral feeding of pomegranate fruit extract inhibits early biomarkers of UVB radiation-induced carcinogenesis in SKH-1 hairless mouse epidermis. *Photochem Photobiol* 2010; 86:1318-26.

Afaq F, Sallem CG, Krugger JD, Reed JD, Mukhtar H. Anthocyanin- and hydrolysable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int J Cancer* 2005; 113:423-33.

Afaq F, Katiyar SK. Polyphenols: skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. *Mini Rev Med Chem* 2011; 11:1200-15.

Andres-Lacueva C, Monagas M, Khan K, Izquierdo-Pulido M, Urpi-Sarda M, Permanyer J, et al. Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: influence of the manufacturing process. *J Agric Food Chem* 2007; 55:3111-7.

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

Bachelor MA, Bowden GT. UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression. *Semin Cancer Biol* 2004; 14:131-8.

Batz S, Wahrlich C, Alawi A, Ulrich M, Lademann J. Differentiation of Different Nonmelanoma Skin Cancer Types Using OCT. *Skin Pharmacol Physiol* 2018; 31:238-45.

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998; 56:317-33.

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

BIBLIOGRAFÍA

Benjamin CL, Ananthaswamy HN. p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 224:241-8.

Berkey C, Oguchi N, Miyazawa K, Dauskardt R. Role of sunscreen formulation and photostability to protect the biochemical barrier function of skin. *Biochem Biophys Rep* 2019; 19:100657.

Boitor R, Kong K, Shipp D, Varma S, Koloydenko A, Kulkarni K, et al. Automated multimodal spectral histopathology for quantitative diagnosis of residual tumour during basal cell carcinoma surgery. *Biomed Opt Express* 2017; 8:5749-66.

Bosch R, Philips N, Suárez-Pérez JA, Juarranz A, Devmurari A, Chalensouk-Khaosaat J, et al. Mechanisms of Photoaging and Cutaneous Photocarcinogenesis, and Photoprotective Strategies with Phytochemicals. *Antioxidants (Basel)* 2015; 4:248-68.

Brink S, Wang YU, Blum B, Baccam M, Varbanov A, Boeh V, et al. Clinical Skin Mildness Evaluations of Direct and Indirect Exposure to Two Commercial Laundry Detergents with Markedly Different pH Designed for Sensitive Skin Using a Hand-Laundering Model. *J Cosmet Sci* 2019; 70:89-105.

Campos MA, Lopes JM, Soares P. The genetics of cutaneous squamous cell carcinogenesis. *Eur J Dermatol* 2018; 28:597-605.

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

Connors JM, His ED, Foss FM. Lymphoma of the skin. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002; 263-82.

Dantas LG, Guerra M. Chromatin differentiation between *Thebroma cacao* L. and *T. grandiflorum* Schum. *Genet Mol Biol* 2010; 33:94-8.

de Laat A, van der Leun JC, de Grujil FR. Carcinogenesis induced by UVA (365-nm) radiation: the dose-time dependence of tumor formation in hairless mice. *Carcinogenesis* 1997; 18:1013-20.

de Matos AM, Martins A, Man T, Evans D, Walter M, Oliveira MC, et al. Design and Synthesis of CNS-targeted Flavones and Analogues with neuroprotective Potential Against H₂O₂- and A β ₁₋₄₂-Induced toxicity in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *Pharmaceuticals (Basels)* 2019; 12:E98.

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

Duarte AF, Sousa-Pinto B, Freitas A, Delgado L, Costa-Pereira A, Correia O. Skin cancer healthcare impact: A nation-wide assessment of an administrative database. *Cancer Epidemiol* 2018; 56:154-60.

Eisemann N, Waldmann A, Geller C, Weinstock MA, Wolkmer B, Greinert R, et al. Non-melanoma skin cancer incidence and impact of skin cancer screening on incidence. *J Invest Dermatol* 2014; 134:43-50.

Elghouche AN, Pflum ZE, Schmalbach CE. Immunosuppression Impact on Head and Neck Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review with Meta-analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2019; 160:439-46.

Engler MB, Engler MM, Chen CY, Malloy MJ, Browne A, Chiu EY, et al. Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. *J Am Coll Nutr* 2004; 23:197-204.

English DR, Armstrong BK, Kricger A, Fleming C. Sunlight and cancer. *Cancer Causes Control* 1997; 8:271-83.

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

Finlin BS, Confides AL, Zhu B, Boulanger MC, Memetimin H, Taylor KW, et al. Adipose Tissue Mast Cells Promote Human Adipose Beiging in Response to Cold. *Sci Rep* 2019; 9:8658.

BIBLIOGRAFÍA

Fisher GJ, Choi HC, Bata-Csorgo Z, Shao Y, Wang ZQ, Kang S, et al. Ultraviolet irradiation increases matrix metalloproteinase-8 protein in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 2001; 117:219-26.

Fisher ND, Hughes M, Gerhard-Herman M, Hollenberg NK. Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in health humans. *J Hypertens* 2003; 21:2281-6.

Fitzpatrick TB. Soleil et peau. *J Med Esthet* 1975;2:33-4.

Föll MC, Fahner M, Gretzmeier C, Thoma K, Biniossek ML, Kiritsi D, et al. Identification of tissue damage, extracellular matrix remodeling and bacterial challenge as common mechanisms associated with high-risk cutaneous squamous cell carcinomas. *Matrix Biol* 2018; 66:1-21.

Forbes PD, Blum HF, Davies RE. Photocarcinogenesis in hairless mice: dose-response and the influence of dose-delivery. *Photochem Photobiol* 1981; 34:361-5.

Fu XR, Zhang C, Chen CY, Zhang L, Wang LX, Wang BH, et al. Expression and significance of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase in non-melanoma skin cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2012; 34:369-73.

Gallagher RP, Lee TK. Adverse effects of ultraviolet radiation: a brief review. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92:119-31.

Gee JM, Johnson IT. Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. *Curr Med Chem* 2001; 8:1245-55.

Gilaberte Y, González S. Update on photoprotection. *Actas Dermosifiliogr* 2010; 94:659-72.

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

Hacker E, Horsham C, Ford H, Hartel G, Olsen CM, Pandeya N, et al. UV detection stickers can assist people to reapply sunscreen. *Prev Med* 2019; 124:67-74.

Heinrich U, Neukam K, Tronnier H, Sies H, Stahl W. Long-term ingestion of high flavano cocoa provides photoprotection against UV-induced erythema and improves skin condicinon in women. *J Nutr* 2006; 136:1565-9.

Holubar K, Schmidt C. Historical, anthropological and biological aspects of sun and the skin. *ClinDermatol* 1998; 6:19-22.

Huh MI, Yi SJ, Lee KP, Kim HK, An SH, Kim DB, et al. Full Thickness Skin Expansion *ex vivo* in a Newly Developed Reactor and Evaluation of Auto-Grafting Efficiency of the Expanded Skin Using Yucatan Pig Model. *Tissue Eng regen Med* 2018; 15:629-38.

Husein-EIAhmed H. Sclerodermiform basal cell carcinoma: how much can we rely on dermatoscopy to differentiate from non-aggressive basal cell carcinomas? Analysis of 1256 cases. *An Bras Dermatol* 2018; 93:229-32.

Ibrahim MMA, Elwan WM. Role of topical dehydroepiandrosterone in ameliorating isotretionin-induced Meibomian gland dysfunction in adult male albino rat. *Ann Anat* 2017; 211:78-87.

Ibrahim S. Commentary on Risk Factors for Basal Cell Carcinoma in Men Younger than 40 yearso of age. *Dermatol Surg* 2018; 44:1379.

IchihashiM, Ueda M, Budiyanto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, et al. UV-induced skin damage. *Toxicol* 2003; 189:21-39.

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

Jenkins G. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech Ageing Dev* 2002; 123: 801-10.

BIBLIOGRAFÍA

Jiang Y, Satoh K, Aratsu C, Komatsu N, Fujimaki M, Nakashima H, et al. Diverse biological activity of polycaphenol. *In Vivo* 2001; 15:145-9.

Judistiani RTD, Nirmala SA, Rahmawati M, Ghrahani R, Natalia YA, Sugianli AK, et al. Optimizing ultraviolet B radiation exposure to prevent vitamin D deficiency among women in the tropizal zone: report from cohort study on vitamin D status and its impact during pregnancy in Indonesia. *BMC Pregnancy Childbirth* 2019; 19:209.

KasimsettySG, Bialonska D, Reddy MK, Thorton C, Willett KL, Ferreira D. Effects of pomegranate chemical constituents/intestinal microbial metabolites on CYP1B1 in 22Rv1 prostate cancer cells. *J Agric Food Chem* 2009; 57:10636-44.

Kasimsett SG, Bialonska D, Reddy MK, Ma G, Khan SI, Ferreira D. Colon cancer chemopreventive acitivies of pomegranate ellagitannints and urolithins. *J Agric Food Chem* 2010; 58:2180-7.

Kim JE, Song D, Kim J, Choi J, Kim JR, YoonHS, et al. Oral Supplementation with Cocoa Extract Reduces UVB-Induced Wrinles in Hairless Mouse Skin. *J Invest Dermatol* 2016; 136:1012-21.

Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44:239-67.

Koyama S, Cobb LJ, Mehta HH, Seeram NP, Heber D, Pantuck AJ, et al. Pomegranate extract induces apoptosis in human prostate cancer cells by modulation of the IGF-IGFBP axis. *Growth Horm IGF Res* 2010; 20:55-62

Kozik V, Jarzembek K, Jędrzejowska A, Bąk A, Polak J, Bartoszek M, et al. Investigation of Antioxidant Activity of Pomogranate Juices by Means of Electron Parramagnetic Resonance and UV-Vis Spectroscopy. *J AOAC Int* 2015; 98:866-70.

KullavanijayaP, Lim HW. Photoprotection. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52: 937-58.

Lan CE, Hung YT, Fang AH, Ching-Shuang W. Effects of irradiance on UVA-induced skin aging. *J Dermatol Sci* 2019; 94:220-8.

Lautenschlager S, Wulf HC, Pittelkow MR. Photoprotection. *Lancet* 2007; 370: 528-37.

Leyden J. What is photoaged skin?. *Eur J Dermatol* 2001; 11:165-7.

Lupu M, Popa IM, Voiculescu VM, Boda D, Caruntu C, Zurac S, et al. A Retrospective Study of the Diagnostic Accuracy of In Vivo Reflectance Confocal Microscopy for Basal Cell Carcinoma Diagnosis and Subtyping. *J Clin Med* 2019; 8:E449.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:727-47.

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

Murphy KJ, Chronopoulos AK, Singh I, Francis MA, Moriarty H, Pike MJ, et al. Dietary flavonols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *Am J Clin Nutr* 2003; 77:1466-73.

Neukam K, Stahl W, Tronnier H, Sie H, Heinrich U. Consumption of flavanol-rich cocoa acutely increases microcirculation in human skin. *Eur J Nutr* 2007; 46:53-6.

Nichols A, Katiyar S. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repair mechanism. *Arch Dermatol Res* 2010; 302:71-83.

Oikawa S, Tada-Oikawa S, Kawanishi S. Site-specific DNA damage at the GGG sequence by UVA involves acceleration of telomere shortening. *Biochemistry* 2001; 40:4763-8.

Papież M, Gancarczyk M, Bilińska B. The compounds from the hollyhock extract (*Althaea rosea* Cav. Var. *nigra*) affect the aromatization in rat testicular cells in vivo and in vitro. *Folia Histochem Cytobiol* 2002; 40:353-9.

BIBLIOGRAFÍA

Park HM, Moon E, Kim AJ, Kim MH, Lee S, Lee JB, et al. Extract of Punica granatum inhibits skin photoaging induced by UVB irradiation. *Int J Dermatol* 2010; 49:276-82.

Patra V, Wagner K, Arulampalam V, Wolf P. Skin Microbiome Modulates the Effect of Ultraviolet Radiation on Cellular Response and Immune Function. *iScience* 2019; 15:211-22.

Phatak A, Athar M, Crowell JA, Leffel D, Herbert BS, Bale AE, et al. Global gene expression of histologically normal primary skin cells from BCNS subjects reveals “single-hit” effects that are influenced by rapamycin. *Oncotarget* 2019; 10:1360-87.

Poswar FO, Fraga CA, Farias LC, Feltenberger JD, Cruz VP, Santos SH, 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; 209:705-9.

Powis TG, Cyphers A, Gaikwad NW, Grivetti L, Cheong K. Cacao use and the San Lorenzo Olmec. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108:8595-600.

Preidle RHM, Möbius P, Weber M, Amann K, Neukam FW, Kesting M, et al. Long-term endothelial dysfunction in irradiated vessels: an immunohistochemical analysis. *Strahlenther Onkol* 2019; 195:52-61.

Quist SR, Eckardt M, Kriesche A, Gollnick HP. Expression of Potential Dermal Progenitor Cell Markers in the Tumour and Stroma of Skin Adnexal Malignant and Benign Tumours. *Stem Cells Int* 2019; 2019:9320701.

Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJ, Morison WL, Sauder DN. Photoaging: mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol* 2006; 55:1-19.

Ralfkiaer E, Delsion G, Willemze R, Jaffe ES. Primary cutaneous CD30-positive T-cell lymphoproliferative disorders. WHO Classification Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 1^a ed. Lyon: IARC Press., 2001.p.221-4.

Ruksha TG, Salmina AB, Sokolov DV, Maksimova TV, Anisimov YA. Expression of peripheral benzodiazepine receptor, PCNA, and caspase-3 in cells of skin melanoma and squamous cell carcinoma. *Bull Exp Biol Med* 2007; 144:77-9.

Rigby CM, Roy S, Deep G, Guillermo-Lagae R, Jain AK, Dhar D, et al. Role of p53 in silibinin-mediated inhibition of ultraviolet B radiation-induced DNA damage, inflammation and skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2017; 38:40-50.

Rippa AL, Kalabusheva EP, Vorotelyak EA. Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. *Cells* 2019; 8:E607.

Rynarzewski J, Dicks L, Zimmermann BF, Stoffel-Wagner B, Ludwig N, Helfrich HP, et al. Impact of Usual Serving Size of Flavanol-Rich Cocoa Powder Ingested with a Diabetic-Suitable Meal on Postprandial Cardiometabolic Parameters in Type 2 Diabetics-A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Crossover Study. *Nutrients* 2019; 11:E417.

Rusconi M, Conti A. *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods: a scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacol Res* 2010; 61:5-13.

Samogna F, Paradisi A, Iemboli ML, Ricci F, Sonogo G, Abeni D, et al. Comparison of quality of life between melanoma and non-melanoma skin cancer patients. *Eur J Dermatol* 2019; 29:185-91.

Sahu RP. Deciphering Mechanisms of UVR-induced Tumoral Immune Checkpoint Regulation against Melanoma. *Cancer Res* 2019; 79:2805-7.

Scalone GLL, Textoris-Taube K, De Meulenaer B, De Kimpe N, Wöstemeyer J, Voigt J. Cocoa-specific flavor components and their peptide precursors. *Food Res Int* 2019; 123:503-15.

Scapagnini G, Davinelli S, Di Renzo L, De Lorenzo A, Olarte HH, Micali G, et al. Cocoa bioactive compounds: significance and potential for the maintenance of skin health. *Nutrients* 2014; 6:3202-13.

BIBLIOGRAFÍA

Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Ensunsa JL, Gonslves JL, Lazarus SA, et al. Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:36-40.

Seebode C, Lehmann J, Emmert S. Photocarcinogenesis and Skin Cancer Prevention Strategies. *Anticancer Res* 2016; 36:1371-8.

Shahkhalili, Murset C, Meirim I, Duruz E, Guinchard S, Cavadini C, et al. Calcium supplementation of chocolate: efecto on cocoa butter digestibility and blood lipids in humans. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:246-52.

Shaygannia E, Bahmani M, Zamanzad B, Rafieian-Kopaei M. A review Study on *Punica granatum* L. *J Evid Based Complementary Altern Med* 2016; 21:221-7.

Silva ES, Machado GB, Lino-Dos-Santos-Franco A, Pavani C. Combination of Natural Extracts and Photomodulation in Keratinocytes Subjected to UVA Radiation. *Photochem Photobiol* 2019; 95:644-9.

Smolarek AK, So JY, Thomas PE, Lee HJ, Paul S, Dombrowski A, et al. Dietary tocopherols inhibit cell proliferation, regulate expression of ER α , PPAR γ , and Nrf2, and decrease serum inflammatory markers during the development of mammary hyperplasia. *Mol Carcinog* 2013; 52:514-25.

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

Sithisarn P, Rojsanga P, Sithisarn P. Inhibitory Effects on Clinical Isolated Bacteria and Simultaneous HPLC Quantitative Analysis of Flavone Contents in Extracts from *Oroxylum indicum*. *Molecules* 2019; 24:E1937.

Soobrattee MA, Bahorum T, Aruoma OI. Chemopreventive actions of polyphenolic compounds in cancer. *Biofactors* 2006; 27:19-35.

Soufir N, Quielle S, Mollier K, Roux E, Sarasin A, de Grujil FR, et al. INK4a-ARF mutations in skin carcinomas from UV irradiated hairless mice. *Mol Carcinog* 2004; 39:195-8.

Stevens RE, Ke MS, Birol A, Terhune MH, Parry EJ, Ross C, et al. A simple clinical scoring system to improve the sensitivity and standardization of the diagnosis of mycosis fungoides type cutaneous T-cell lymphoma: logistic regression of clinical and laboratory data. *Br J Dermatol* 2003; 149:513-22.

Stevens Y, Rymenant EV, Grootaert C, Camp JV, Possemiers S, Masclee A, et al. The Intestinal Fate of Citrus Flavanones and Their Effects on Gastrointestinal Health. *Nutrients* 2019; 11:E1464.

Sunkireddy P, Jha SN, Kanwar JR, Yadav SC. Natural antioxidant biomolecules promises future nanomedicine based therapy for caract. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013; 112:554-62.

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

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

Tan A, Stein JA. Dermoscopic patterns of acral melanocytic lesions in skin of color. *Cutis* 2019; 103:274-6.

Tian B, Wang Y, Wang T, Mao L, Lu Y, Wang H, et al. Structure and Functional Properties of Antioxidant Nanuemulsions Prepared with Tea Polyphenols and Soybean Protein Isolate. *J Oleo Sci* 2019; 68:689-97.

Uitto J. The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. *J Drugs Dermatol* 2008; 7:s12-6.

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

van Dorsten FA, Peters S, Gross G, Gomez-Roldan V, Klinkenberg M, de Vos RC, et al. Gut microbial metabolism of polyphenols from black tea and red

BIBLIOGRAFÍA

wine/grape juice is source-specific and colon-region dependent. *J Agric Food Chem* 2012; 60:11331-42.

Veierød MB, Weiderpass E, Thörn M, Hansson J, Lund E, Amstrong B, et al. A prospective study of pigmentation, sun exposure, and risk of cutaneous malignant melanoma in women. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:1530-8.

Ventéjou S, Bagny K, Waldmeyer J, Cartault F, Machet L, Osdoit S. Skin cancers in patients of skin phototype V or VI with xeroderma pigmentosum type C (XP-C): A retrospective study. *Ann Dermatol Venereol* 2019; 146:192-203.

Verkouteren JAC, Pardo LM, Uitterlinden AG, Nijsten T. Non-genetic and genetic predictors of a superficial first basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2019; 33:533-40.

Vinson JA, Proch J, Zubik L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: cocoa, dark chocolate, and milk chocolate. *J Agric Chem* 1999; 47:4821-4.

Visioli F, Borsani L, Galli C. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovasc Res* 2000; 18:419-25.

Weinstock. The struggle for primary prevention of skin cancer. *Am J Prev Med* 2008; 34:171-2.

Weisburger JH. Chemopreventive effects of cocoa polyphenols on chronic diseases. *Exp Biol Med* 2001; 226:891-7.

Willemze R, Kerl H, Sterry W, Berti E, Cerroni L, Chimenti S, et al. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Blood* 1997; 90:354-71.

Wu X, Haytowitz D, Pehrsson P. Preliminary Analysis of Isoflavones in Processed Egg Products (P06-127-19). *Curr Dev Nutr* 2019; 3:ppinzz031.P06-127-19.

Wollgast J, Pallaroni L, Agazzi ME, Anklam E. Analysis of procyanidins in chocolate by reserved-phase light-performance liquid chromatography with

electrospray ionisation mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 2001; 10:926:211-20.

Yamagishi M, Osakabe N, Natsume M, Adachi T, Takizawa T, Kumon H, et al. Anticlastogenic activity of cacao: inhibitory effect of cacao liuor polyphenols against mitomycin C-induced DNA damage. *Food Chem Toxicol* 2001; 39:1279-83.

7. ANEXOS
