



**EFFECTOS DEL EXTRACTO DE POLYPODIUM LEUCOTOMOS SOBRE LA
TUMOROGÉNESIS INDUCIDA POR LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA**
Esperanza Rodríguez Yanes

ISBN: 978-84-694-1254-1
Dipòsit Legal: T-323-2011

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Esperanza Rodríguez Yanes

EFFECTOS DEL EXTRACTO DE
Polypodium leucotomos
SOBRE LA TUMOROGÉNESIS INDUCIDA
POR LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

TESIS DOCTORAL

Dirigida por el Prof. Jordi Mallol Mirón

Departamento de Ciencias Médicas Básicas



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus, 2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTOS DEL EXTRACTO DE POLYPODIUM LEUCOTOMOS SOBRE LA TUMOROGÉNESIS INDUCIDA POR LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

Esperanza Rodríguez Yanes

ISBN:978-84-694-1254-1/DL:T-323-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTOS DEL EXTRACTO DE POLYPODIUM LEUCOTOMOS SOBRE LA TUMOROGÉNESIS INDUCIDA POR LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

Esperanza Rodríguez Yanes

ISBN:978-84-694-1254-1/DL:T-323-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTOS DEL EXTRACTO DE POLYPODIUM LEUCOTOMOS SOBRE LA TUMOROGÉNESIS INDUCIDA POR LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

Esperanza Rodríguez Yanes

ISBN:978-84-694-1254-1/DL:T-323-2011

JORDI MALLOL MIRON, catedràtic de Farmacologia de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, de la Universitat Rovira i Virgili

CERTIFICA

Que la tesi doctoral EFECTOS DEL EXTRACTO DE *POLYPODIUM LEUCOTOMOS* SOBRE LA TUMOROGÉNESIS INDUCIDA POR LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA, ha estat desenvolupada per l'alumna de Doctorat ESPERANZA RODRÍGUEZ YANES, sota la meva direcció, a la Unitat de Farmacologia de la nostra Facultat.

Que la tesi reuneix tots els requisits per tal de ser defensada públicament.

I així ho fa constar a Reus, el 28 de gener de 2010



Informe del director de la tesi doctoral
(art 11.3 del reial decret 56/2005 de Postgrau)

DADES IDENTIFICATIVES DE LA TESI DOCTORAL	
Títol de la tesi doctoral: Efectos del extracto de <i>Polypodium leucotomos</i> sobre la tumorogénesis inducida por La radiació ultravioleta.	
Doctorand/a Esperanza Rodríguez Yanes	
Director(s)/es Jordi Mallol Mirón	Tutor/a (si s'escau)
Programa de doctorat	
Departament Ciències Mèdiques Bàsiques	Grup de recerca FARBIOL

INFORME DEL DIRECTOR DE TESI		
El(s) (co)directors sotasignats emeten el següent informe de la tesi doctoral presentada a tràmit de dipòsit	SI	NO
La tesi consisteix en un treball original de recerca	X	
El títol reflecteix acuradament el contingut de la tesi	X	
Les hipòtesis i/o els objectius de la tesi estan clarament formulats	X	
La metodologia està descrita	X	
Hi consta el procediment	X	
Hi consten els resultats i la discussió dels mateixos	X	
Les conclusions de la tesi corresponen a les hipòtesis i/o objectius formulats	X	
La bibliografia està ben reflectida	X	
D'aquesta tesi es deriven les següents aportacions científiques: 1. Mulero M, Rodríguez-Yanes E, Nogués MR, Giralte M, Romeu M, González S, Mallol J. Polypodium leucotomos extract inhibits glutathione oxidation and prevents Langerhans cell depletion induced by UVB/UVA radiation in a hairless rat model. Exp Dermatol. 2008, 17(8):653-658. 2. Rodríguez-Yanes E, Nogués MR, Romeu M, Mulero M, González S, Mallol J. Effect of a Polypodium leucotomos (PLE) on ultraviolet-induced photocarcinogenesis in hairless mice. Meth Find Exp Clin Pharmacol 2006, 28 (suppl. 2): 178. 3. Rodríguez-Yanes E, Cuevas J, González S and Mallol J. Oral <i>polypodium leucotomos</i> (pl) extract protects against ultraviolet-induced photocarcinogenesis in <i>hairless</i> mice. Comunicació oral (Abstract 151) al 11th World Congress on Cancers of the Skin, Amsterdam, 2007.		
Altres comentaris sobre la qualitat de la tesi:		

I en conclusió, s'emet l'informe favorable per tal que es pugui portar a terme tràmit de lectura i posterior defensa pública.

Reus, 28 de gener de 2010



Nom i cognoms JORDI MALLOL MIRON, Director de la tesi

Agradecimientos

Llegados al punto de escribir la memoria del periodo de investigación, quiero hacer un inciso para dar las gracias a todas las personas que han hecho posible este trabajo.

En primer lugar, gracias al **Prof. Mallol** por darme la oportunidad de trabajar en su equipo, por dirigir mi investigación, resolver todas mis dudas durante el trabajo en el laboratorio y durante la redacción de esta memoria, así como por la corrección de la misma, que parecía no tener fin.

Gracias al **Dr. Salvador González** por estar en continuo contacto con nosotros interesándose por la evolución del trabajo. Gracias por la confianza en mi trabajo, por el apoyo recibido y por la supervisión de este documento.

Quiero agradecer a **Industrial Farmacéutica Cantabria** por haber creado la beca que disfruté durante todo el tiempo de investigación, así como por facilitarme material para que la investigación se pudiera llevar a cabo, especialmente los envíos periódicos del extracto de *Polypodium*. En especial, quiero agradecer a **Eduardo Reyes** por facilitarme información sobre el procesamiento del helecho.

Al resto de la **Unidad de Farmacología**: a la **Dra. Giralt** que, teniendo siempre mucho trabajo, ha estado dispuesta a ayudarme en la organización y la redacción de esta memoria; a la **Dra. Nogués** por ayudarme en el trabajo con los animales y por resolver mis dudas; al **Dr. Sureda** que siempre está dispuesto a ayudar, a compartir sus conocimientos y por su amena conversación en el laboratorio; a la **Dra. Romeu** por enseñarme algunas de las técnicas que necesité para realizar esta investigación. Gracias a **Anabel** y a **Vanessa** por su ayuda en mis experimentos y a **Daniel Talaya** por hacerme tomar con filosofía las respuestas de los cuadernos de prácticas. Gracias a **Marta López** y **Silvia Moyano** por vuestra compañía y vuestra amistad, por los ratos de laboratorio y de café. Gracias también a **Laura** por su alegría y su compañía en mis últimos días por Reus.

También al personal de la **Unidad de Investigación de Lípidos**, a la **Dra. Girona**, que me abrió las puertas a su laboratorio y a **Anna Cabré**, **Iolanda** y **Roser Rosales** por enseñarme la técnica de western blot y porque siempre estuvieron dispuestas a solucionar mis dudas y comentar los resultados. Sois un gran equipo y unas buenas investigadoras. Mucha suerte con vuestro trabajo y gracias por vuestra amistad.

Quiero dar las gracias al **personal del animalario: Amparo, Esperanza y Juan**, por su colaboración con mis experimentos en el mantenimiento y cuidado de los animales y, sobre todo, porque siempre han estado dispuestos a echarme una mano.

Gracias al **Dr. Cuevas** y a la **Dra. Juarranz** por procesarme las muestras de inmunohistoquímica y resolver mis dudas sobre la técnica. También quiero dar las gracias a la **Dra.**

Agradecimientos

Colomina y Dra. Gallego por facilitarme material cuando lo necesité y al **Dr. Joan Fernández** por resolver todas mis dudas de estadística.

Gracias a **Monstse Pallás** y a **Imma** por ayudarme siempre que tenía que hacer trámites administrativos y a **Carles Vilardell** por resolver todos mis problemas informáticos.

Gracias **Judit** por tu ayuda, tu compañía y tu amistad. Sabes que admiro tu capacidad de hacer tantas cosas, tan diferentes y todas bien. ¡Besos a Seattle! También a todo el grupo del grupo del hospital: **Anna Rull, Raúl, Gerard y Fernando**, gracias a todos por vuestra ayuda con los bichos y por vuestra amistad. Sois unos grandes investigadores, os deseo mucha suerte en vuestras carreras.

A mi gabinete psicológico: **Silvia Fuentes y Diana**, por ser unas amigas incondicionales. Gracias por escucharme, por vuestros consejos y por todo el ánimo que me disteis, por todas las conversaciones interesantes, por ver la vida de una manera humana y por valorar a las personas por lo que son. Gracias por todo, sabéis que sin vosotras no hubiera hecho nada. Gracias también a **Paloma** por ser como una hermana mayor para las tres.

Gracias a **Silvia Olivé** por no dejarme sola, por tu compañía y tu amistad. ¡Un beso muy grande y mucho ánimo!

Meri quiero agradecerte el haberte conocido, eres una persona maravillosa, sigue siendo tu misma. **Tania** gracias por no dejar nunca de sorprenderme. Gracias a **Roser Martí** por abrirme los ojos y enseñarme que las cosas no son lo que parecen; a **Bea** por estar siempre dispuesta a ayudar en todo. Gracias a la siguiente generación: **Gemma, Lolita, Is, Ingrid Reverte, José Gregorio y Ana Muñiz** por vuestra compañía y por traer aire fresco a Reus. Gracias a **Nuria Aranda** por su amistad y a **Nuria Ferré** por sus consejos. Gracias a **Mónica** por tener siempre una palabra amable y una conversación interesante, a **Ingrid Arrillaga** por sus explicaciones de histopatología y de cultura guatemalteca.

Gracias a **Jose** y a **Susana** por vuestra compañía esos domingos cuando estaba sola.

A **Katrin** gracias por tu amistad, por acogerme en tu casa y por todos los buenos momentos; a toda **radioterapia**, *always up!*

A **Fátima, Ángel, Erica, Cris, Eva, Lorena Nogueira** y al **grupo de Gaspar** por vuestra amistad, vuestro apoyo, pero sobre todo por ser como sois.

A **Carlis** y a **Juan** por enseñarme a ver la vida de otra manera. A **mis padres**, a **mi hermana** y a **Lino** por apoyarme en todo lo que hago, por escucharme, por enseñarme que es lo que realmente importa en la vida y por quererme.

Índice de contenidos

Certificado de la dirección de tesis	i
Informe del director de la tesis doctoral	iii
Agradecimientos	v
Índice de contenidos	vii
Lista de abreviaturas	xi
Introducción	1
1. La piel	4
2. La radiación ultravioleta	8
3. Efectos perjudiciales de la RUV	11
3.1. Absorción de la energía de la RUV por moléculas de la piel	11
3.2. Generación de especies reactivas y radicales libres	13
3.3. Genotoxicidad	19
3.4. Inflamación	20
3.5. Fotoinmunosupresión	22
3.6. Fotoenvejecimiento	27
3.7. Fotocarcinogénesis	29
4. Mecanismos de defensa de la piel ante el daño inducido por la RUV	34
4.1. Cambios en la epidermis	35
4.2. Sistema antioxidante	38
4.3. Antimutagenicidad	46
4.4. Inducción de la muerte celular	48
4.5. Regulación de los mecanismos de defensa de la piel frente a la RUV	51
5. Efectos beneficiosos y usos terapéuticos de la RUV	54
6. Fotoprotección	56
7. <i>Polypodium leucotomos</i>	61
7.1. Características del género <i>Polypodium</i> y de la especie <i>P. leucotomos</i>	61
7.2. Evidencias del efecto beneficioso de estos helechos	62
7.3. Primeros estudios que demostraron su efecto	62
7.4. Propiedades	63
7.5. Composición	69
7.6. Derivados del <i>P. leucotomos</i> usados en los experimentos incluidos en esta memoria	71
Hipótesis y objetivos	73

Índice de contenidos

Materiales y métodos	77
1. Consideraciones sobre el trabajo con modelos animales de experimentación	81
2. Diseños experimentales	83
2.1. Estudio 1: actividad antioxidante del EPL	83
2.2. Estudio 2: efecto de la administración oral del EPL en ratas sometidas a RUV aguda	83
2.3. Estudio 3: efecto de la administración oral del EPL en ratones sometidos a RUV crónica	85
2.4. Estudio 4: efecto de la administración oral del EPL en ratones sometidos a RUV aguda	88
2.5. Estudio 5: efecto de la administración de cápsulas de EPL sobre la capacidad antioxidante de la sangre en humanos	90
3. Valoración de las características de los animales del estudio de irradiación crónica	91
4. Obtención y procesamiento de las muestras	92
4.1. Procesamiento de las muestras de sangre	92
4.1.1. Procesamiento de la sangre anticoagulada con EDTA-Na ₂	93
4.1.2. Procesamiento de la sangre anticoagulada con Heparina-Li (excepto estudio de irradiación aguda en ratones)	94
4.1.3. Procesamiento de la sangre anticoagulada con Heparina-Li en el estudio de irradiación aguda en ratones	96
4.2. Procesamiento de las muestras de piel	98
4.2.1. Muestras de piel del estudio realizado en ratas	98
4.2.2. Muestras de piel del estudio realizado en ratones para la valoración de la irradiación crónica	99
4.2.3. Muestras de piel del estudio realizado en ratones para la valoración de la irradiación aguda	102
5. Métodos	103
5.1. Métodos de determinación de parámetros relacionados con el estado oxidativo de las muestras	103
5.1.1. Métodos de determinación de parámetros bioquímicos enzimáticos	103
5.1.1.1. Valoración de las actividades enzimáticas	103
5.1.1.2. Determinación de la proteína presente en una muestra por western blot	110
5.1.2. Determinación de parámetros bioquímicos no enzimáticos	114
5.1.2.1. Indicadores de la capacidad antioxidante	114
5.1.2.2. Indicadores del estado oxidativo	116
5.1.3. Valoraciones para referenciar las determinaciones bioquímicas a sus muestras correspondientes	120
5.2. Métodos de determinación de parámetros anatomopatológicos	122
5.2.1. Tinciones clásicas	122
5.2.2. Citoquímica	124
5.2.3. Inmunohistoquímica	125
6. Cálculos y análisis estadístico	127

Resultados	129
1. Estudio 1: determinación de la capacidad antioxidante del EPL	133
1.1. Resultados del estudio 1	133
1.2. Discusión del estudio 1	137
2. Estudio 2: efecto de la administración oral de EPL en ratas <i>hairless</i> sometidas a RUV aguda	138
2.1. Resultados del estudio 2	138
2.1.1. Resultados de parámetros evaluados en sangre	138
2.1.2. Resultados de parámetros evaluados en fracción soluble de epidermis	147
2.1.3. Recuento del número de células de Langerhans	151
2.2. Discusión del estudio 2	152
3. Estudio 3: efecto de la administración oral de EPL en ratones <i>hairless</i> sometidos a RUV crónica	155
3.1. Resultados del estudio 3	155
3.1.1. Observación de tumores y análisis de la supervivencia y el peso de los animales del estudio de irradiación crónica	155
3.1.2. Parámetros relacionados con el estrés oxidativo en sangre de los animales del estudio de irradiación crónica	164
3.1.3. Parámetros relacionados con el estrés oxidativo en fracción soluble de piel de los animales del estudio de irradiación crónica	172
3.1.4. Determinaciones histológicas realizadas en las muestras de la piel de los animales del estudio de irradiación crónica	183
3.2. Discusión del estudio 3	196
4. Estudio 4: efecto de la administración oral de EPL en ratones <i>hairless</i> sometidos a RUV aguda	205
4.1. Resultados del estudio 4	205
4.1.1. Parámetros relacionados con el estrés oxidativo en sangre de los animales del estudio de irradiación aguda en ratones	205
4.1.2. Valoración mediante western blot de la presencia de enzimas antioxidantes en al epidermis de los animales del estudio de irradiación aguda en ratones	215
4.1.3. Observaciones realizadas en las muestras de anatomía patológica de la piel de los animales del estudio de irradiación aguda en ratones	218
4.2. Discusión del estudio 4	226
5. Estudio 5: efecto de la administración oral de cápsulas de EPL sobre el sistema antioxidante sanguíneo en humanos	229
5.1. Resultados del estudio 5	229
5.2. Discusión del estudio 5	236

Discusión Global	239
1. Actividad antitumoral	242
2. Propiedades del <i>P. leucotomos</i> que contribuyen a su capacidad antitumoral	244
2.1. Propiedades antioxidantes	244
2.1.1. Capacidad antioxidante endógena de los productos usados en los estudios	245
2.1.2. Valores de los parámetros relacionados con el estado oxidativo	245
2.1.3. Mecanismos por los que el <i>P. leucotomos</i> refuerza la defensa antioxidantes	248
2.2. Efecto regulador de la respuesta inmune	250
2.3. Capacidad antiinflamatoria	252
2.4. Mantenimiento de la integridad estructural de la piel y prevención del envejecimiento	254
2.5. Prevención de la apoptosis y activación de los mecanismos de reparación de ADN	256
3. Resumen	259
Conclusiones	261
Bibliografía	265

Lista de abreviaturas:

6-4PP	fotoproductos 6-4 (<i>6-4 photoproducts</i>)
AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropano)dihidrocloro
ACT	Actina
AP1	Proteína activadora 1 (<i>Activator protein 1</i>)
BCC	Carcinoma de células basales (<i>basal cell carcinoma</i>)
CAT	Catalasa
CD	Célula dendrítica
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CGRP	péptido relacionado con el gen de la calcitonina (<i>calcitonine gen related peptide</i>)
CL	Células de Langerhans
CPA	Célula presentadora de antígeno
Cox-2	Ciclooxigenasa-2
CPDs	Dímeros de pirimidinas (<i>cyclobutane pyrimidine dimers</i>)
DEM	Dosis eritemógena mínima
EPL	Extracto de <i>Polipodium leucotomos</i>
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FRAP	Ensayo de la capacidad antioxidante de reducir el ión férrico (<i>ferric ion reducing antioxidant power assay</i>)
GST	Glutación S-transferasa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GGR	Reparación global del genoma (<i>global genome repair</i>)
GSSG	Glutación oxidado
HSPs	Proteínas del shock térmico (<i>heat shock proteins</i>)
IL	Interleucina
LDC	Quimioluminiscencia dependiente de luminol (<i>Luminol dependent chemiluminescence</i>)
MDA	bis-dietilacetal-malondialdehido
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinasas matriciales (<i>matrix metalloproteinases</i>)
NEM	N-metilmaleimida
NK-T	Célula T <i>natural killer</i>
NO	Óxido nítrico

Lista de abreviaturas

OPT	O-phthaldehído
ORAC	Capacidad de absorber radicales del oxígeno (<i>oxygen radical absorption capacity</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>phosphate buffer saline</i>)
<i>P. leucotomos</i>	<i>Polypodium leucotomos</i>
RLOs	Radicales libres de oxígeno
RUV	Radiación ultravioleta
SCC	Carcinoma de células escamosas (<i>scamous cell carcinoma</i>)
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico (<i>thiobarbituric acid</i>)
TBARS	Substancias reaccionantes con el ácido tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>)
t-BOOH	t-butilhidroperóxido
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β (<i>transforming growth factor β</i>)
TBS	Tampón Tris salino (<i>Tris buffer saline</i>)
TCA	Tricloroacetato
TE	Equivalentes de trolox
TIMPs	Inhibidores tisulares de las MMPs (<i>tissue inhibitor of matrix metalloproteinases</i>)
TNF- α	Factor de necrosis celular α (<i>tumor necrosis factor α</i>)
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
UCA	Ácido urocánico (<i>urocanic acid</i>)
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha observado una mayor incidencia de cáncer de piel en países desarrollados. Este hecho se asocia a una mayor exposición a la radiación ultravioleta (RUV) debido al cambio de hábitos de la población lo que, sumado a una mayor esperanza de vida, hace más evidentes los efectos acumulativos y a largo plazo derivados de dicha radiación, principalmente el envejecimiento prematuro de la piel y el cáncer.

El cáncer de piel es más frecuente en personas que residen en áreas de gran irradiación solar ambiental, principalmente en zonas del cuerpo expuestas a la radiación, en gente sensible al sol, expuesta a altas dosis de RUV, y con una escasa protección de la piel frente al sol (English y col., 1997).

La comunidad científica, junto con los gobiernos, ha tratado de informar y concienciar a la población de los riesgos de la RUV y de ofrecer pautas de fotoprotección. Sin embargo, a menudo ocurre que estos programas de prevención y concienciación no se acompañan de un cambio de actitud favorable en la población en cuanto a las medidas adoptadas frente a la irradiación solar (Stanton y col., 2004). En general, se asocia el riesgo de irradiación con la exposición al sol intencionada y la protección frente a la radiación con los fotoprotectores de administración por vía tópica. En muchos casos, la aplicación de estos productos conlleva al incremento del tiempo de exposición, lo cual se debe a que los usuarios se consideran suficientemente protegidos frente a la radiación (Autier y col., 2007).

En un nuevo esfuerzo para facilitar a la población medidas que conduzcan a la reducción del riesgo derivado de la RUV se están estudiando compuestos con propiedades fotoprotectoras cuya administración oral ofrezca un cierto grado de protección a nivel sistémico, estando así la piel protegida de manera uniforme (Middelkamp-Hup y col., 2004b).

1. **LA PIEL** (Costin y Hearing, 2007)

La piel es el órgano del cuerpo que separa el medio interno del ambiente. Entre sus funciones, podemos destacar la de ejercer de barrera protectora frente a factores externos físicos, químicos y biológicos, la de captación de información del medio externo, el mantenimiento de la homeostasis del medio interno y la de defensa inmune activa frente a antígenos exógenos. El estudio histológico de la piel permite la distinción, del exterior al interior, de las siguientes tres capas: epidermis, dermis e hipodermis. Estas tres capas se diferencian tanto en su estructura como en su función.

Epidermis

La capa más externa de la piel, la epidermis, es una capa principalmente celular, carente de circulación sanguínea, por lo que depende de la dermis para la aportación de nutrientes. Su principal función es la de barrera entre los dos medios, el externo y el interno; además es relativamente impermeable al agua, lo que previene la evaporación de líquidos, permitiendo la vida fuera del medio acuático.

Es un epitelio escamoso pluriestratificado de origen ectodérmico. Las distintas capas se diferencian en función de la morfología de los queratinocitos, los cuales, en el estrato más interno son prismáticos, con actividad mitótica y poca actividad bioquímica. A medida que avanzan hacia estratos más externos, los queratinocitos se van haciendo más cúbicos y luego aplanados, perdiendo la capacidad de división y aumentando la tasa de síntesis de queratohialina.

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

A continuación encontramos el estrato espinoso, formado por varias capas de células, generalmente unas ocho, principalmente queratinocitos de forma cúbica y limitada capacidad de división. Además de los queratinocitos, en esta capa se pueden observar dendritas de los

melanocitos y células presentadoras de antígeno aún inmaduras; son las denominadas células de Langerhans.

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

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

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

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

Dermis

La dermis es una capa de tejido conjuntivo denso de origen mesodérmico. Entre las fibras y las células que la forman, se localizan glándulas, excretoras y secretoras, folículos pilosos, uñas, órganos de los sentidos, nervios sensitivos de receptores mecánicos de la piel, vasos sanguíneos y vasos linfáticos.

El principal tipo celular presente en la dermis son los fibroblastos, cuya principal función más relevante es la síntesis y degradación de las fibras de la matriz extracelular. Asimismo, también se encuentran células efectoras de defensa, como son los mastocitos y los

La Piel

macrófagos, y las células presentadoras de antígeno inmaduras, que en esta capa se conocen por el nombre genérico de células dendríticas.

La matriz extracelular está compuesta principalmente por fibras, entre éstas se encuentran el colágeno, la elastina y fibras reticulares. El colágeno confiere resistencia a la piel; la elastina elasticidad y resiliencia, y las fibras reticulares mantienen la estructura de la dermis.

Además de las fibras, en la matriz extracelular hay otras sustancias que en conjunto reciben el nombre de matriz extrafibrilar, compuesta por proteoglicanos, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, agua y ácido hialurónico. Las funciones de estas sustancias son variadas, entre otras destacan el mantenimiento de la tensión, el reconocimiento necesario para la adhesión celular y la comunicación durante la migración celular.

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

Hipodermis

La hipodermis o tejido subcutáneo es la capa más interna de la piel y está formada por tejido conjuntivo laxo en la que se localizan células adiposas. El grosor de esta capa difiere en función de la localización. Conecta la dermis con los tejidos subyacentes actuando a modo de aislante.

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

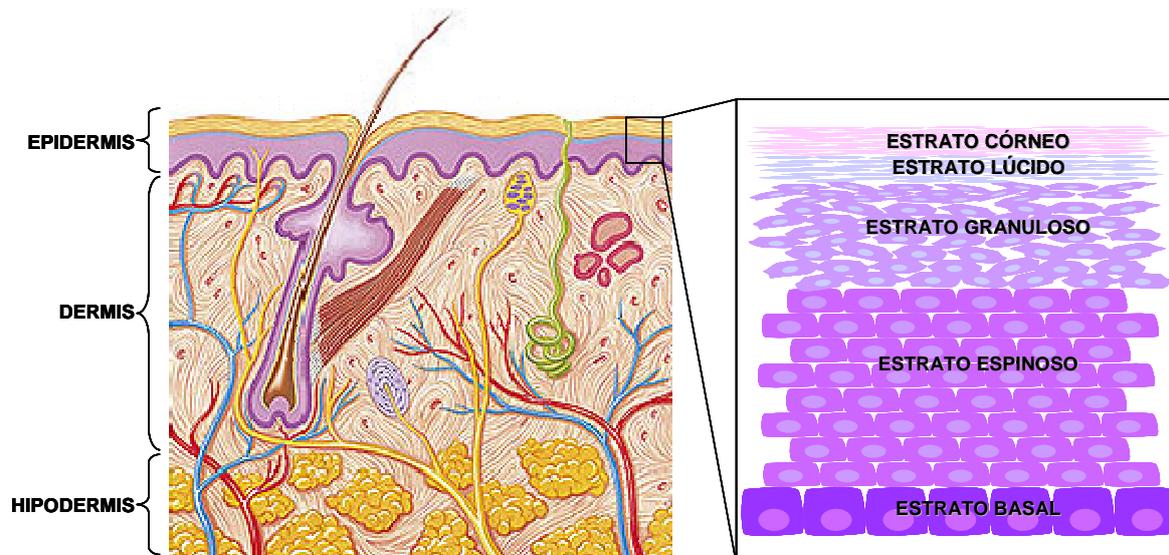


Figura 1: estructura de la piel.

2. LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

Dentro del espectro de radiación solar que alcanza la superficie terrestre, un 50% es infrarrojo, un 40-45% luz visible y entre un 5 y un 10% es radiación ultravioleta (RUV). La RUV es radiación electromagnética, invisible al ojo humano, que comprende la fracción del espectro de energía entre los 200 y 400nm de longitud. La región UV de energías limita con las de la luz visible pero, debido a que posee una mayor energía, su incidencia en los sistemas vivos tiene diversas consecuencias. Entre ellas algunas positivas, como la síntesis de vitamina D, y otras negativas como son, a corto plazo, la generación de especies reactivas y el daño a las estructuras celulares, pudiendo derivar con el tiempo, y el acúmulo de los daños que causan, en envejecimiento de la piel e incluso inducir carcinogénesis en la misma.

Los efectos de la RUV en la piel difieren según la longitud de onda de la radiación incidente, debido a dos características de la misma: la energía que porta y la capacidad de penetración. Estas dos características se relacionan de manera inversa, de tal manera que las longitudes de onda más cortas son muy energéticas y poco penetrantes, radicando su peligrosidad en la gran energía que portan y estando limitados sus efectos a las zonas más superficiales de la piel. Por otra parte, la radiación de ondas más largas, es menos energética y más penetrante, siendo responsable de los efectos de la RUV en las capas más profundas de la piel.

En el estudio de los efectos de la RUV se diferencian las longitudes de onda corta o lejanas de las de onda larga o cercanas, en función del valor de su longitud de onda y de la proximidad de éstas a las del espectro visible. Sin embargo, los conceptos de longitud de onda lejana o cercana, corta o larga, son demasiado ambiguos. Por convenio, en 1987, la *Commission Internationale de l'Éclairage* dividió el espectro de la RUV en tres intervalos delimitados por longitudes de onda concretas, con el fin de facilitar el estudio de sus efectos y asignar con mayor precisión dichos efectos de la RUV a su energía causante (Hussein, 2005).

El límite más lejano dentro del espectro UV se determinó en los 290nm por ser la mayor longitud de onda con capacidad ionizante que es completamente absorbida por la capa de ozono (Diffey, 2002; Hussein, 2005). El intervalo comprendido entre las longitudes de onda 200 y 290 se denominó ultravioleta C (UVC), su alta energía la dota de un altísimo

potencial mutagénico. Sin embargo, debido a su bajo poder de penetración, no alcanza la superficie terrestre, por lo que en principio no es la responsable de efectos de la RUV en la superficie terrestre.

El siguiente límite dentro del intervalo de la RUV se fijó en los 320nm (Hussein, 2005), longitud de onda por encima de la cual la energía de la radiación no produce eritema en la piel tras una exposición moderada, y se creía que no era absorbida por las proteínas y los ácidos nucleicos. Sin embargo, con los posteriores avances en fotobiología molecular, se observó que el espectro que causaba estos efectos era más amplio, por lo que sería más apropiado fijar este límite entre los 330-340nm (Diffey, 2002); aunque por convenio, se sigue manteniendo dicho límite en los 320nm.

El intervalo comprendido por las longitudes de onda 290-320nm es conocido como ultravioleta B (UVB), esta radiación se caracteriza por su alta energía y su bajo poder de penetración; sólo un 9-14% de la UVB alcanza el estrato germinativo de la epidermis, observándose sus efectos más profundos en la dermis superficial (Elsner y col., 2007). Aunque en parte es absorbida por la capa de ozono, entre un 5 y un 10% de la radiación que alcanza la superficie terrestre es de este rango. A consecuencia de la degradación de la capa de ozono, la proporción de energía de longitudes de onda lejanas que alcanzan la superficie terrestre está aumentando. La alta carga energética de la radiación UVB es la principal responsable de ciertas enfermedades y lesiones de la piel. Su modo de acción es tanto directo, daño al ADN y a estructuras celulares, como indirecto mediante la activación de moléculas fotosensibles y la inducción de la producción de radicales libres. Esta es la región de la RUV responsable de la generación de eritema, siendo su capacidad eritemógena 1000 veces superior a la de radiación UVA.

El tercer intervalo de energía comprendido ente los 320 y 400nm de longitud de onda se conoce como ultravioleta A (UVA). Esta región se caracteriza por su baja energía y su alto poder penetrante, siendo un 19-50% de la UVA capaz de alcanzar el estrato germinativo y se han observado sus efectos en la dermis profunda (Elsner y col., 2007). El 90-95% de la radiación que alcanza la superficie terrestre es de esta clase. Su capacidad mutagénica es bastante baja, por lo que generalmente daña al ADN de manera indirecta mediante la activación de moléculas fotosensibles y la producción de especies reactivas y radicales libres. A pesar de ello, se ha demostrado que su energía es suficiente para provocar la formación de dímeros de pirimidinas y roturas de hebra simple del ADN. La RUV del rango A tiene aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de la psoriasis, acné, linfomas cutáneos de células T y repigmentación del vitiligo.

La Radiación Ultravioleta

Hay que tener en cuenta que, además de la emisión solar, existen fuentes artificiales de RUV cuya energía varía según su finalidad, pudiendo ser terapéutica, estética, para la cría de animales y plantas o el control de plagas de insectos.

En la figura 2 puede observarse gráficamente un esquema del espectro de la radiación solar.

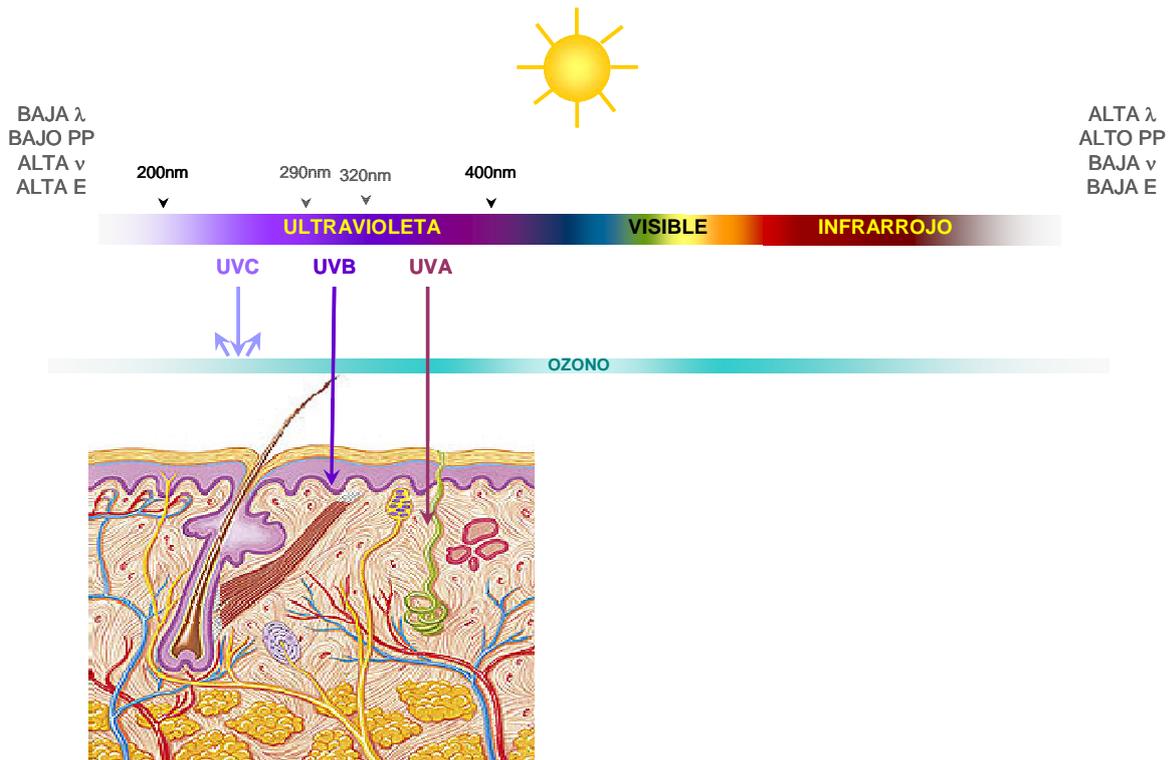


Figura 2: espectro de la radiación solar. λ : longitud de onda; PP: poder de penetración, ν : frecuencia; E: energía.

3. EFECTOS PERJUDICIALES DE LA RUV

Numerosas evidencias han demostrado los efectos nocivos de la RUV en la piel. Muchos estudios han tratado de dilucidar los mecanismos de acción por los que dicha radiación actúa en los tejidos vivos, demostrando la implicación de varias vías de acción.

La energía que porta la RUV puede dañar estructuras celulares directamente o a través de la acción de moléculas fotosensibles (Svobodova y col., 2006). Esta energía en el ambiente tisular provoca una sucesión de reacciones, que conducen a la generación de especies reactivas que amplifican el daño que causa la RUV a las estructuras celulares. De todas las estructuras celulares que pueden ser dañadas por estos mecanismos, la de mayor trascendencia es el ADN. Las lesiones que éste sufra y no sean reparadas pueden fijarse, implicando pérdida de función de genes y pudiendo comprometer el ciclo celular y la homeostasis tisular.

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

3.1. Absorción de la energía de la RUV por moléculas de la piel

Antes de explicar las consecuencias derivadas de la absorción de la energía de la RUV por la piel, se expondrá una breve explicación de la relación entre dicha energía y las propiedades ópticas de la piel.

En función de las propiedades de las zonas más superficiales de la piel, la energía de la luz puede ser reflejada, absorbida, dispersada o transmitida (Hussein, 2005). La capa córnea tiene la propiedad de reflejar un 4-6% de la luz. La absorción de la energía tiene lugar principalmente en la epidermis debido a las propiedades ópticas de esta capa, determinadas principalmente por la presencia de residuos de triptófano, que es capaz de absorber radiaciones en la región UVB, y de pigmentos fotosensibles. La dispersión de la energía de la RUV tiene lugar principalmente en las zonas superiores de la dermis, debido a

Efectos Perjudiciales de la RUV

las características ópticas de las fibras de colágeno, siendo esta zona alcanzada solamente por la radiación de la región UVA. La transmisión de la energía es bajísima para estas longitudes de onda, aumentando con las longitudes de onda mayores (600-1200nm), como el caso del láser.

La acción de la RUV en la piel se centra en las capas más superficiales de la misma, epidermis y dermis superior, ya que éstas son alcanzadas por dicha radiación. Los efectos nocivos de la incidencia de la misma derivan de la absorción de su energía por las moléculas del tejido, las cuales pueden sufrir transformaciones con la consecuente pérdida de función de algunas estructuras celulares. Por otra parte, en la piel existen moléculas con capacidad de absorber la energía de la RUV denominadas cromóforos. Su capacidad fotorreceptora es debida a la presencia en estas moléculas de algún electrón capaz de pasar a un nivel de energía superior al que le corresponde por acción de la energía de la RUV. Esto lleva la molécula a un estado excitado, en el cual transfiere la energía de excitación a otras moléculas de su entorno, pudiendo dañarlas directamente o mediante una cascada de reacciones en cadena derivadas de la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (de Gruijl, 1999). En la piel existen muchas sustancias fotosensibles (Young, 1997), algunas de ellas con capacidad fotoprotectora, como la melanina, y otras promueven la acción toxica de la RUV como son el ácido trans-urocánico y el propio ADN.

El ADN puede absorber un amplio espectro de la RUV, con un máximo comprendido entre 230 y 300nm, rango correspondiente a las regiones UVC-UVB (Young, 1997; Hug y col., 1998). La absorción de esta energía conlleva la aparición de lesiones en el propio ADN que, si no son debidamente corregidas, darán lugar a mutaciones. Es por ello, que la RUV es considerada un potente agente mutagénico.

La forma trans del ácido urocánico (UCA) es un producto del metabolismo de la histidina que, en la piel, se acumula debido a que este tejido es deficiente en el enzima encargado de su catabolismo, la urocanasa (Hug y col., 1998). Este compuesto absorbe energía del espectro UV, principalmente del rango UVB (Young, 1997) pero también del UVA, que es la que alcanza la piel de forma mayoritaria y la que tiene mayor capacidad de penetración en la misma (Haralampus-Grynaviski y col., 2002). La absorción por parte del ácido trans-urocánico de energía de la RUV induce el cambio de su configuración al estado excitado cis, el cual amplifica los efectos nocivos de la RUV. El ácido cis-urocánico actúa mediante tres vías: la generación de ERO, la potenciación de la respuesta inflamatoria y la inducción de inmunosupresión. De hecho, se le considera uno de los principales mediadores de la inmunosupresión inducida por la RUV (De Fabo y Noonan, 1983).

3.2. Generación de especies reactivas y radicales libres

En general las especies reactivas son moléculas de vida media corta y, como su nombre indica, muy reactivas. Éstas se generan natural y continuamente durante algunos procesos fisiológicos, como la inflamación, en el funcionamiento de la cadena de transporte electrónico y en el metabolismo de detoxificación de sustancias tóxicas. En estas circunstancias naturales, los niveles de especies reactivas son bajos, de tal manera que pueden controlarse gracias a los sistemas de defensa antioxidantes presentes en los tejidos. Sin embargo, la producción de estas especies reactivas puede verse incrementada en procesos patológicos o por acción de factores externos. Destacando dentro de éstos últimos, los contaminantes atmosféricos que generan dichas especies *per se* o como producto de su metabolismo y la irradiación de tejidos con radiación ionizante o UV. En algunas situaciones los niveles de especies reactivas pueden no ser compensados por dichos mecanismos neutralizadores, pudiendo resultar dañinos para las moléculas cercanas.

Las especies reactivas son moléculas capaces de absorber energía entrando en un estado energético superior al fundamental, lo que las hace ser muy inestables, por lo que, rápidamente, tienden a liberarse de la energía extra que poseen reaccionando con otras moléculas del entorno. Se consideran especies reactivas no radicales cuando esa energía causa el desplazamiento de un electrón a un nivel de energía superior manteniéndose el apareamiento de electrones. Por otro lado, en las especies reactivas radicales o radicales libres la molécula presenta algún electrón desapareado. Cuando el electrón desplazado o desapareado pertenece a un átomo de oxígeno hablamos de especies reactivas del oxígeno (EROs) o de radicales libres de oxígeno (RLOs), éstas son las especies reactivas generadas en mayor abundancia. Existiendo otras especies reactivas, entre las que destacamos por su importancia las especies reactivas de nitrógeno (ERNs).

Aunque la vida media de las EROs inicialmente sea muy corta, pueden producir lesiones permanentes en otras estructuras moleculares. Con el tiempo, si se mantiene la generación de estas especies, los daños que provocan se van acumulando, pudiendo llegar a iniciar o promover ciertas patologías como el cáncer, la aterosclerosis, la artritis o enfermedades neurodegenerativas (Valko y col., 2006).

Efectos Perjudiciales de la RUV

Generación de EROs inducida por la RUV

Tras la incidencia de la RUV en la piel, se incrementan los niveles de especies reactivas y radicales libres de varias moléculas, pero principalmente de oxígeno; sin embargo, el oxígeno molecular (O_2) no es capaz de absorber la energía de la RUV *per se*, por lo que se requiere la presencia de moléculas excitables por dicha radiación para la generación de las EROs y RLO. Como se ha comentado en el apartado anterior, en la piel hay compuestos fotosensibles capaces de absorber la energía de los fotones que penetran en la piel y de almacenar fugazmente dicha energía. El almacenaje se lleva a cabo desplazando uno de sus electrones a un nivel superior de energía, quedando la molécula en un estado inestable de excitación (Bickers y Athar, 2006). En este estado, y en el intento de regresar a su estado fundamental, la molécula reacciona con otras presentes en su entorno. La reacción más frecuente implica la transferencia de energía de excitación al O_2 , convirtiéndolo en oxígeno singulete (1O_2). Asimismo, pueden darse otras reacciones, en las que en general hay intercambio de electrones entre las moléculas implicadas y que concluyen con la generación de aniones superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Svobodova y col., 2006) (ver figura 3).

La RUV es la principal causa de la generación de especies reactivas en la piel, fundamentalmente de oxígeno. Estas especies son producto bien de la acción de esta radiación sobre cromóforos (Sander y col., 2004) o por la acción del metabolismo de las células implicadas en la inflamación. Asimismo, existen otras vías de producción de especies reactivas, entre ellas la generación y liberación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como producto de la función realizada en la piel por neutrófilos y macrófagos (Klaunig y Kamendulis, 2004) y del efecto de la radiación UVA sobre el complejo III de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Gniadecki y col., 2000).

Por lo tanto, por acción de la RUV, las primeras especies reactivas que se generan son el 1O_2 , el $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y algunos agentes reductores, que tras haber donado un electrón, quedan cargados positivamente.

Por acción de la RUV en la piel, se forma $O_2^{\cdot-}$ pero no en grandes cantidades, existiendo enzimas antioxidantes capaces de reducir los niveles de este RLO, de los cuales se hablará más adelante. Es de mayor importancia la formación de 1O_2 derivada de la irradiación ya que esta especie es muy reactiva y su vida media es relativamente larga, por lo que puede dañar lugares de la célula distantes de donde se formó (Svobodova y col.,

2006). Se observó que la máxima formación de $^1\text{O}_2$ tenía lugar en la franja de radiación UVA, lo que se explica por la transferencia de la energía de la radiación a través del UCA (Darr y Fridovich, 1994).

En la figura 3 se puede observar la transferencia de la energía de activación de la RUV al oxígeno a través de los cromóforos.

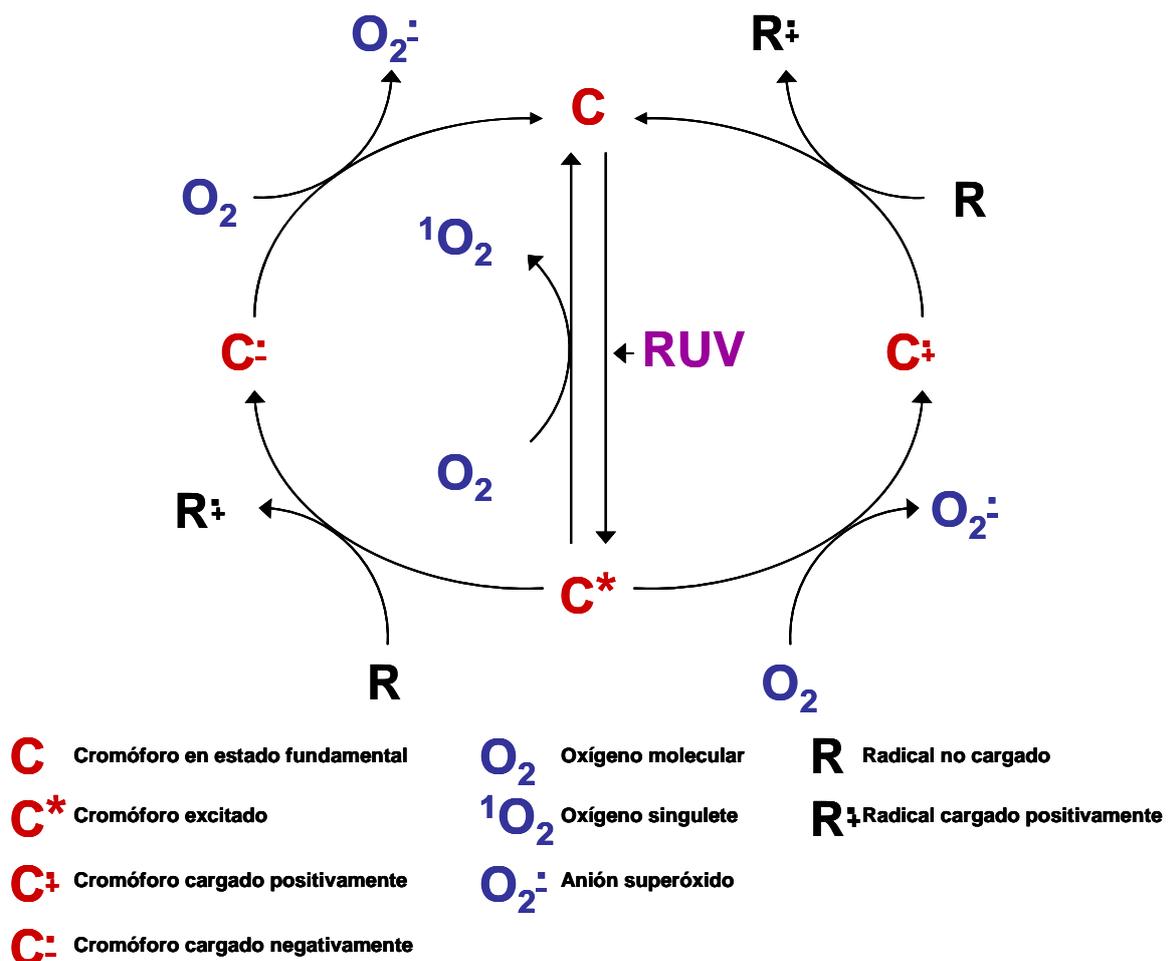


Figura 3: transferencia de la energía de activación: El cromóforo es excitado por acción de la RUV; para alcanzar el estado fundamental puede reaccionar de las tres formas siguientes: **a)** donando la energía de activación al oxígeno molecular, que se transforma en oxígeno singulete; **b)** reaccionando con una especie donadora de electrones, por lo que el cromóforo queda cargado negativamente y el radical positivamente; posteriormente, el anión del cromóforo dona el electrón al oxígeno molecular transformándolo en anión superóxido; **c)** reaccionando directamente con el O_2 , comportándose este como aceptores de electrones y transformándose en superóxido, quedando el radical de alguna especie donadora de electrones, el cual, al perder un electrón queda cargado positivamente.

Efectos Perjudiciales de la RUV

Tras la acción de la RUV en la piel, aumentan los niveles de H_2O_2 en la misma por dos razones; por un lado, como hemos visto, por la acción de las células fagocíticas locales o extravasadas en respuesta a la radiación y, por otro lado, por la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ mediada por el enzima superóxido dismutasa. El H_2O_2 , *per se* no es una especie reactiva. A pesar de ello, dicha especie se considera potencialmente dañina porque, en presencia de metales catiónicos como el hierro y el cobre, puede genera aniones hidroxilos (HO^{\cdot}), mediante la reacción de Haber-Weiss. El HO^{\cdot} es una especie altamente reactiva y, por tanto, muy nociva. Al ser tan reactivo reacciona con las moléculas más cercanas por lo que causa daño muy cerca del sitio en el que se origina.

Daño oxidativo

En principio, los tejidos poseen un conjunto de sustancias interrelacionadas funcionalmente con el fin de defenderse del daño oxidativo causado por estas especies, es lo que se conoce como sistema o red antioxidante, del que hablaremos más adelante. La superación de los límites de RLOs neutralizables por dichos mecanismos antioxidantes, compromete el equilibrio prooxidante-antioxidante en favor de un ambiente oxidante, denominado estrés oxidativo. En este caso, las moléculas reactivas pueden oxidar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Todo esto deriva en la reducción de la eficacia de las funciones de las proteínas, en la pérdida de la integridad de las membranas celulares y en la lesiones del material genético.

Una de las principales dianas de la oxidación por radicales libres son los ácidos grasos poliinsaturados dando lugar a peróxidos lipídicos, lo que tiene lugar en tres fases (Kohen y Gati, 2000). En la primera, una ERO ataca a un hidrógeno de un grupo metileno adyacente a un punto de instauración, desplazando dicho átomo de hidrógeno, quedando un electrón desapareado. En una segunda fase el electrón desapareado se estabiliza mediante una reorganización molecular con la formación de un dieno conjugado, que es una forma inestable y reacciona con el O_2 formando un radical ROO^{\cdot} . Estos radicales pueden reaccionar con otros ácidos grasos poliinsaturados de la membrana propagando el daño oxidativo. La última fase tendría lugar por la reacción de los peróxidos lipídicos con otros radicales o antioxidantes. La principal consecuencia de la peroxidación lipídica es la pérdida de estabilidad de las membranas celulares, afectando ésta tanto a su integridad estructural, como a la permeabilidad de las mismas.

Las proteínas pueden sufrir daño oxidativo directo e indirecto. El esqueleto carbonado de las proteínas es atacado por el radical HO[•] eliminando el átomo de hidrógeno unido al mismo. Esto produce un radical "centrado en el carbono" capaz de generar O₂^{•-}. Como consecuencia de la oxidación de proteínas se puede observar una pérdida de la actividad enzimática tisular, alteración de las funciones celulares, interferencia con la creación de potenciales de membrana y cambios en los perfiles y niveles de proteínas.

De todas las estructuras celulares que pueden ser dañadas por las EROs, la de mayor trascendencia es el material hereditario. Los mecanismos de acción de las EROs sobre el ADN pueden resumirse en los siguientes tres grupos (Marnett, 2000). En primer lugar el daño directo de estos radicales sobre las bases nitrogenadas o sobre la desoxirribosa provocando roturas de cadenas. En segundo lugar, el daño indirecto mediado por proteínas o lípidos oxidados por la acción de los radicales libres, en estos casos, además de oxidación de las bases, pueden formarse aductos. En último lugar, fallos en la reparación de las lesiones formadas conduciendo a la fijación del daño por mutación en el ADN o a la apoptosis.

Las EROs además del daño que causan directamente sobre las moléculas citoplásmicas, también actúan como mediadores celulares. Entre estas acciones podemos destacar: la generación de eicosanoides, la activación de factores de transcripción como son la proteína activadora 1 (AP-1) y el NF-κB, la activación de la cascada de proteincinasas activadoras de mitógeno (MAPK) y la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (GRFR) cuya activación induce mitosis (Peus y col., 1998; Peus y col., 1999; Meves y col., 2001).

Especies reactivas de nitrógeno

En la piel se ha observado un aumento del óxido nítrico (NO) inducido por la RUV. El NO es producto de la transformación de la L-arginina en L-citrulina por acción del enzima óxido nítrico sintasa (*nitric oxide sintase*, NOS). De éste existen tres isoformas, dos de ellas constitutivas: la forma endotelial (eNOS), y la neuronal (nNOS); y una inducible (iNOS). Las tres formas están presentes en la piel, donde su síntesis es inducida por la RUV, principalmente de tipo UVB, así como la activación de la forma inducible (Lee y col., 2000; Chang y col., 2003).

Efectos Perjudiciales de la RUV

Por acción de la RUV la piel entra en un episodio de inflamación transitoria, en el cual linfocitos y otras células de defensa se infiltran en dicho tejido. Estas células, en su acción fagocítica, producen NO, aumentando los niveles de NO por el propio tejido. Por otro lado, se ha observado en la piel irradiada con UVA, una producción de NO independiente de enzimas por fotodescomposición de nitritos y nitrosotioles (Paunel y col., 2005).

El aumento de los niveles de NO está acompañado del aumento paralelo de la presencia de EROs y RLO. Éstos son inducidos por el mismo estímulo, pudiendo reaccionar entre ellos y generar especies reactivas de nitrógeno (Janczyk y col., 2007). Las más frecuentes son los peroxinitritos (ONOO^-) generados por la reacción del NO con el O_2^- y la formación de trióxido de nitrógeno (N_2O_3) por autooxidación del propio NO. Las ERN pueden dañar las moléculas de su entorno tanto por su capacidad oxidativa como por la nitrosativa. Así pues, pueden lesionar el ADN mediante desaminación, oxidación y nitración, así como formar enlaces cruzados entre residuos de guanina, de la misma o distinta cadena, o inducir alquilación y halogenación de las bases nitrogenadas. Los lípidos y las proteínas también pueden, sufrir daños por reacción con las ERN. Las proteínas pueden sufrir daños en los residuos de cisteína, siendo estas lesiones especialmente relevantes cuando tienen lugar en los enzimas, cuya eficacia se puede ver mermada por acción de las ERNs (Dedon y Tannenbaum, 2004).

Todo esto nos hace pensar que los aumentos de NO son perjudiciales para la piel irradiada. Sin embargo, se ha observado que el NO tiene funciones como la regulación del flujo sanguíneo, favorecer la vasodilatación (Benrath y col., 1995) y la extravasación de los neutrófilos a la zona irradiada (You y col., 2001) e inhibir la peroxidación lipídica (Lee y col., 2000). Así pues, éste actuaría protegiendo la integridad de las membranas celulares, entre ellas las de la mitocondria, reduciendo la apoptosis por esta vía (Suschek y col., 2001). También se ha demostrado que el NO inhibe la muerte celular por necrosis (Lee y col., 2000; Suschek y col., 2001).

Además, el NO en la piel potencia los sistemas antimutagénicos, manteniendo la integridad celular y la homeostasis celular, y favorece la melanogénesis tras la exposición a RUV (Weller, 2003). Por lo que en general el aumento del NO en la piel irradiada se puede considerar positivo.

3.3. Genotoxicidad

La energía de la RUV es capaz de causar daño en el ADN de las células que alcanza *per se*, pero además también puede dañar el material hereditario mediante la acción de especies reactivas.

Por absorción directa de la energía de la RUV

Las típicas lesiones que sufre el ADN por acción directa de la RUV son fotoproductos diméricos. Estos se producen principalmente en lugares ricos en pirimidinas, sobre todo de tipo timidina en las que se da la unión de los carbonos C₄ y C₅ de dos bases nitrogenadas continuas. Esto daría lugar a la formación de anillos ciclobutano de dímeros de pirimidinas (*cyclobutane pyrimidine dimers*, CPDs) y de fotoproductos pirimidina-(6-4) pirimidona (*6-4 photoproducts*, 6-4PP), distorsionando la estructura de la doble hélice lo que impide que la transcripción se lleve a cabo con normalidad. Estas lesiones, si no son revertidas, conducen a mutaciones puntuales de tipo transición. Estas mutaciones son denominadas huella de la radiación UVB, por la asociación de su presencia a esta fuente de radiación, aunque se ha demostrado la capacidad de la UVA en la formación de CPDs (Rochette y col., 2003). Además, la radiación UVA da lugar a la formación de isómeros Deward de los PP6-4.

Oxidación de bases

Otras lesiones moleculares propias de la piel expuesta a la RUV es la formación de 8-oxoguanina y 2-hidroxiadenina, producto de la oxidación de las bases guanina y adenina, respectivamente. Estas lesiones se generan por la acción de longitudes de onda cercanas a los 365nm, que corresponden con la región UVA (Kvam y Tyrrell, 1997). La existencia de estas formas oxidadas de las bases púricas se debe a la acción de RLO, cuya presencia aumenta debido a la acción de RUV cercana. En caso de no ser reparados, estos cambios conducen a transversiones. Estas mutaciones son consideradas la marca propia de la radiación UVA en el ADN (Besaratina y col., 2004), aunque también se ha detectado su formación por UVB (Kunisada y col., 2005). Las lesiones oxidativas del ADN, además de ser mutagénicas, son muy carcinogénicas (Nakabeppu y col., 2006).

Efectos Perjudiciales de la RUV

Modificaciones de la estructura de la molécula de ADN

Además de las lesiones ejercidas sobre las bases nitrogenadas, la RUV puede dañar el esqueleto de fosforibosa del ADN conduciendo a la rotura de una o ambas hebras. La RUV mediante la formación de RLO puede dañar la ribosa, induciendo roturas de hebra simple (Lo y col., 2005).

Otras lesiones inducidas directa o indirectamente por la RUV en el ADN son la formación de fotohidratos de citosina, aductos de dos adeninas contiguas o de adenina-timina y uniones proteína ADN.

Cambios epigenéticos

La RUV también puede producir cambios en el patrón de metilación del ADN dando lugar a cambios epigenéticos. A consecuencia de los cuales, la región del ADN afectada sería más vulnerable a la mutagénesis (Ikehata y col., 2003) y al silenciado de genes, lo cual es de mayor importancia cuando afecta a genes supresores de tumor (Kemp, 2005).

3.4. Inflamación

En respuesta al daño celular inducido por la RUV, la piel desencadena una respuesta inflamatoria. Ésta es mediada por sustancias proinflamatorias secretadas por tipos celulares residentes o por otros que llegan a ella en respuesta a estímulos quimiotácticos. La forma más evidente en que se puede observar este proceso inflamatorio es el eritema (vasodilatación e hiperemia locales), que se produce en la piel con un máximo a las 48-72 horas tras la exposición a la fuente de radiación. Además de los sucesos vasculares, se observan cambios estructurales y morfológicos en el tejido epidérmico (Clydesdale y col., 2001).

Cambios vasculares

En algunos modelos animales y en humanos, la respuesta inflamatoria inducida por la RUV es bifásica. En primer lugar, la vasodilatación inmediata inducida por la RUV y mediada por la secreción de sustancias vasodilatadores como son la serotonina, histamina y prostaglandinas (Woodward y Owen, 1982; Clydesdale y col., 2001). También se ha demostrado la liberación de neuropéptidos vasodilatadores por parte de las fibras sensoriales de la piel, principalmente la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Benrath y col., 1995). Tras la vasodilatación temprana, se vuelve a un estado transitorio de normalidad.

La segunda fase inflamatoria aparece en respuesta a la secreción de otras sustancias vasodilatadoras, principalmente óxido nítrico y prostaglandinas (Valko y col., 2006). Su máximo se observa a las 24-48 de la exposición en humanos y a las 72h en ratas, por lo que es denominada eritemogénesis tardía (Clydesdale y col., 2001).

Las fibras nerviosas sensitivas responden al daño inducido por la RUV liberando no sólo NO, sino también otros neuropéptidos vasodilatadores (Benrath y col., 1995). En estas mismas fibras nerviosas, aumenta la expresión de receptores B₁ y B₂ de bradicinina (Eisenbarth y col., 2004). Este hecho las hace más susceptibles a los estímulos nociceptivos, siendo una de las causas de sensibilización de la piel ante la RUV y responsable de la sensación de dolor de la respuesta inflamatoria frente a la misma.

Cambios morfológicos y estructurales

Los cambios más destacables de la piel tras la acción de la RUV se observan en los queratinocitos dañados. Unas 2 horas después de la incidencia de la RUV en los queratinocitos, éstos sufren una reducción del número de gránulos de queratohialina. Posteriormente, 16-18h tras la irradiación, se observa edema intracelular y a las 30-48h se observa edema intercelular alrededor de los queratinocitos dañados (Clydesdale y col., 2001). Por otro lado, tanto queratinocitos como células de Langerhans, tras el daño inducido por la RUV, sobre todo a nivel del material hereditario, entran en apoptosis. Siendo éste un mecanismo de defensa de la piel frente a la carcinogénesis inducida por la RUV (Claerhout y col., 2006).

3.5. Fotoinmunosupresión

Para comprender el efecto de la RUV sobre el sistema inmune, es necesario partir del comportamiento de este sistema en ausencia de estímulos nocivos. Como se ha comentado en el primer apartado, la piel posee células de defensa entre las que podemos distinguir un grupo de células efectoras del sistema inmune. Entre éstas destacamos los mastocitos y células T. Por otra parte, se encuentra otro grupo de células de defensa cuya función es vigilar frente a posibles infecciones o cambios celulares e informar de ello al sistema inmune general, mediante la presentación de antígenos que localiza en la piel. Por su función, estas células se conocen como células presentadoras de antígeno (CPA), entre las que se encuentran los macrófagos y las células dendríticas. Las células de Langerhans son las células dendríticas de la epidermis, cuya función y fisiología han sido ampliamente estudiadas. Por otro lado, en la dermis se distinguen células dendríticas, a las que se les atribuyen funciones y comportamientos similares a los de las células de Langerhans (Norval, 2006).

Las células de Langerhans son células dendríticas inmaduras. Cuando éstas entran en contacto con un antígeno, lo internalizan, lo procesan y migran al nódulo linfático para su posterior presentación a las células T. Durante la migración, las células de Langerhans van madurando, cambian la expresión de moléculas coestimuladoras y de adhesión, lo que permite el reconocimiento del trayecto al nódulo linfoide y la correcta interacción con los linfocitos T. Una vez fuera de la epidermis, las células de Langerhans se denominan con el nombre genérico de células dendríticas.

La presentación de antígeno se lleva a cabo en el nódulo linfoide. La respuesta inmune está condicionada por el tipo de antígeno que presente la CPA, según el cual esta célula interacciona con una clase concreta de célula T, determinando así la subsiguiente respuesta inmune humoral o celular. En la piel sana, ante una infección intracelular o una célula tumoral, las células dendríticas presentan el antígeno a las células T CD4⁺ *helper* 0 (Th₀), induciendo su transformación en Th₁, subtipo responsable de la inmunidad celular. Ante la situación anterior también se presentarían antígenos a las células T CD8⁺, de función citotóxica, capaces de inducir la muerte de las células transformadas o infectadas. En cambio, si el antígeno procede de una infección extracelular, las células dendríticas presentan el antígeno a las células Th₀, pero en este caso inducen su transformación en el subtipo Th₂, de función mediadora de la respuesta inmune humoral y supresora de la inmunidad celular.

Una vez estimuladas, las células T migran a través de la sangre desde el nódulo linfático a la piel para ejercer su función. Además, favorecen la migración y extravasación de otras células efectoras como macrófagos y neutrófilos.

Evidencias del efecto inmunosupresor de la RUV

Una respuesta inmune propia de la piel ante un hapteno es la hipersensibilidad retardada o por contacto, la cual consiste en la inducción de una respuesta inflamatoria en la piel tras una segunda exposición de dicho tejido al hapteno. Se observó que la RUV era capaz de inhibir esta respuesta en la piel. Lo mismo ocurría, si el antígeno era administrado en la región subcutánea o vía parenteral, siempre que la primera exposición al hapteno hubiese sido en la piel (Schwarz, 2005). Las observaciones anteriores hicieron pensar que la RUV debía influir en la expresión de las moléculas de adhesión responsables de la presentación de antígeno condicionando la respuesta inmune posterior.

Por otro lado se observó la capacidad de la RUV de anular el rechazo tras el trasplante singénico de tumores de piel en ratones, después de que los animales receptores hubiesen sido sometidos a radiación UVB (Aubin, 2003). El comportamiento tras la irradiación igualó al de la administración de fármacos inmunosupresores (Romerdahl y col., 1989). Posteriormente, se demostró que la UVA también producía este efecto (De Fabo y Noonan, 1983). Además se observó que si persiste la exposición a la fuente de radiación el crecimiento del tumor se potencia (Donawho y col., 1996).

Mecanismo de fotoinmunosupresión

Las vías por las que se induce la inmunosupresión inducida por la RUV no están del todo claras, existiendo un gran número de moléculas y células implicadas en dicho fenómeno. Éste se inicia por acción de los cromóforos presentes en la piel y conduce a la generación de una respuesta inmune humoral y la supresión de inmunidad celular, aumentando la tolerancia ante la transformación celular y las infecciones intracelulares.

Como hemos comentado anteriormente, la absorción de la energía de la RUV por el ADN da lugar a mutaciones, principalmente CPDs y 6-4PP en el material hereditario. Esto se ha observado en células de Langerhans de las zonas irradiadas y en las células dendríticas

Efectos Perjudiciales de la RUV

presentes en el ganglio tras la irradiación. Las consecuencias de estas mutaciones en las células de Langerhans son doblemente importantes. Por un lado, reducen de la eficacia de presentación de antígeno, ya que al ser células inmaduras, si su material hereditario presenta defectos éstos afectarán de manera negativa a la maduración y, por tanto, en la migración y en la interacción con las células T efectoras. Por otro lado, los cambios en el ADN de las células de Langerhans pueden implicar anulación o modificaciones del perfil de citocinas liberadas por estas células y otras implicadas en su función, conduciendo a errores en la presentación antigénica y estimulando respuestas inmunes erróneas.

La estimulación de los sistemas de reparación del ADN, por ejemplo por la administración de IL-12, pueden reducir los niveles de fotoinmunosupresión mediante la evasión de los fenómenos anteriores reestableciendo la normalidad en la función inmune (Schwarz, 2005). Esto explica el aumento de la incidencia de tumores cutáneos en individuos con problemas en la reparación del material hereditario, como es el caso del *xeroderma pigmentosum*, en comparación con el resto de la población (Daya-Grosjean, 2008).

Muchos autores están de acuerdo en el papel mediador del cis-UCA en la inmunosupresión inducida por la RUV. Se sabe que éste afecta a la presentación de antígenos (Norval, 2001) y que induce algunos cambios que induce en el perfil de secreción de citocinas favoreciendo la inmunidad humoral (Gibbs y col., 2008). Sin embargo, su mecanismo de acción es bastante desconocido, habiendo más vías implicadas en el proceso de inmunosupresión inducida por el cis-UCA.

La RUV afecta principalmente a las capas superiores de la piel, por tanto en la epidermis es donde se observan los mayores efectos tras la irradiación. Es por ello que las células de Langerhans tienen un papel central en los procesos de fotoinmunosupresión. Pero además, otras células de la epidermis también están implicadas en este proceso, como son los queratinocitos. Estos ejercen una importante influencia sobre las células de Langerhans en su estimulación. Fallos en la interacción entre ambos tipos celulares, pueden reducir la efectividad de la presentación de antígeno.

Ante la RUV, el sistema inmune debería generar una respuesta de tipo celular, en su función de vigía ante posibles transformaciones de las células dañadas por la RUV. Sin embargo, las células dendríticas dañadas presentan preferiblemente el antígeno a las células Th₂, induciendo una respuesta humoral y suprimiendo la respuesta celular. Esto reduciría la eficacia en la lucha ante infecciones intracelulares y células tumorales.

Las EROs, derivadas de la exposición a la RUV, pueden modificar el perfil de citocinas liberadas por las células de la piel. Éstas pueden modificar la acción de las células de defensa, tanto de células presentadoras de antígeno, como de las células efectoras (Simon y col., 1994).

Efecto inmunosupresor local

El estudio de la influencia de la RUV a nivel local en la piel se ha centrado en el número, morfología y función de las células de Langerhans.

La RUV reduce el número de células de Langerhans, debido tanto al rango UVB (Murphy y col., 1993) como al UVA (Seite y col., 2003). Se han encontrado dos explicaciones para la disminución del número de estas células presentadoras de antígeno. Por un lado, los cambios inducidos en la epidermis inducen la respuesta migratoria de estas células a los nódulos linfoides (Dandie y col., 1998); en este sentido se demostró que la UVB induce el descenso del número de células dendríticas en los nódulos (Macve y col., 2004), por lo que la migración no es correcta, supuestamente debido a cambios en las moléculas de adhesión. Por otro lado, el daño inducido por la RUV en el genoma de esas células conduce a la pérdida de eficacia de su función (Vink y col., 1997) y al aumento la apoptosis, reduciéndose el número de células de Langerhans presentes en la epidermis.

Por otra parte, las células de Langerhans presentes en la epidermis tras la acción de la RUV muestran defectos morfológicos, siendo los más característicos el aumento de tamaño celular y la reducción del número de ramificaciones. Estas modificaciones afectan a las funciones celulares, reduciendo la eficacia de la de la presentación de antígenos.

La función presentadora de antígenos trata de ser reemplazada por neutrófilos, macrófagos y monocitos infiltrados (Cooper y col., 1993; Meunier y col., 1995) en la piel. Esto es posible gracias a los cambios de permeabilidad de membrana inducidos por la RUV en el endotelio capilar y a la secreción de citocinas por las células de la piel. Sin embargo, estas células son poco efectivas en la presentación antigénica.

Por todo lo anterior, la acción de la RUV compromete la inmunidad de la epidermis conduciendo a inmunotolerancia a nivel local.

Efectos Perjudiciales de la RUV

Efecto inmunosupresor sistémico

La RUV induce cambios el perfil de citocinas, promoviendo la secreción de aquellas de acción inmunosupresora; siendo éstas las responsables del efecto inmunosupresor sistémico de la RUV.

Las citocinas secretadas activan a las células Th₂, promoviendo la vía humoral de la inmunidad. Pero también se estimulan otros tipos de células T como son las células T reguladoras (T_{reg}) y células T Natural Killer (NK-T), aumentando la señal supresora de la inmunidad celular y, por tanto, favoreciendo los fenómenos de inmunotolerancia.

La RUV aumenta la liberación de prostaglandinas proinflamatorias. Este aumento se debe a dos causas. Por un lado, la activación directa de la ciclooxigenasa-2 por la RUV y, por otro, la peroxidación de los lípidos de la membrana mediada por la presencia de ERO (Athar y col., 2001). Como consecuencia de la inflamación, se eleva el metabolismo celular, aumentando los niveles de radicales libres presentes en la célula, aumentando el daño oxidativo y potenciando la producción de citocinas proinflamatorias, principalmente PGE₂. La liberación de PGE₂ se acompaña de la producción de IL-4 e IL-10, que tienen efecto inmunosupresor sistémico (Shreedhar y col., 1998). Estas interleucinas promueven la inmunidad humoral mediada por los linfocitos Th₂ e inhiben la humoral mediada por los Th₁; estimulando además la acción citotóxica de los linfocitos CD8+.

Consecuencias de la fotoinmunosupresión

Las principales consecuencias de la inmunosupresión son: en primer lugar, la falta de reconocimiento de células tumorales y, por tanto desarrollo del tumor. En segundo lugar un aumento de la susceptibilidad a infecciones (principalmente las intracelulares). Además, se está estudiando la posible relación de la inmunosupresión inducida por la RUV en la inducción, desarrollo o potenciación de enfermedades autoinmunes (Norval, 2006).

En la figura 4 se representa a modo esquemático las vías por las que la RUV induce inmunosupresión a nivel sistémico y local.

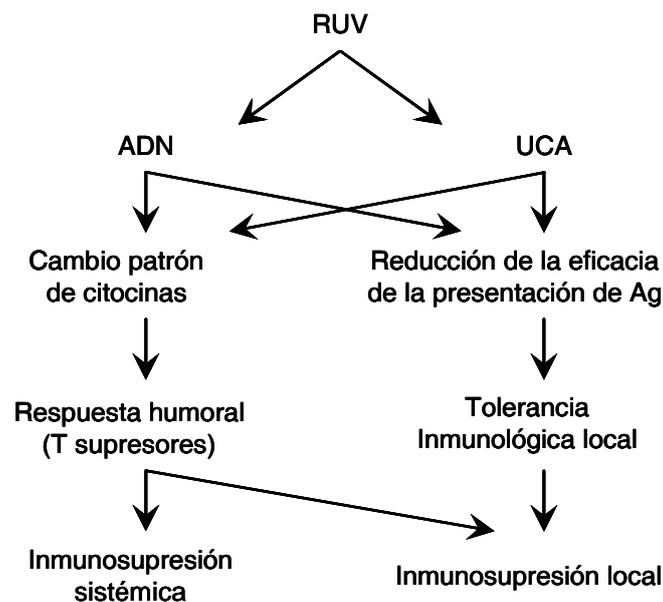


Figura 4: esquema de las vías por las que la RUV induce inmunosupresión tanto a nivel sistémico como local.

3.6. Fotoenvejecimiento

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

Los factores intrínsecos, son los propios del sujeto y del tejido, como son la información genética, el tipo celular y el número de ciclos replicativos. Esto conduce al denominado envejecimiento intrínseco o innato, propio de las zonas no expuestas al exterior. Microscópicamente se caracteriza por la reducción de los niveles de colágeno, la degradación de la red elástica y la pérdida de hidratación. A nivel macroscópico se observan arrugas muy finas y adelgazamiento de la piel debido a la atrofia de la dermis y la pérdida del tejido adiposo subcutáneo.

Efectos Perjudiciales de la RUV

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

La acción de los factores extrínsecos conduce a un aumento de los RLO en las células, afectando a su estabilidad y funcionalidad, acelerando el proceso intrínseco de envejecimiento y modificando su patrón de evolución.

Se resumieron las principales características del fotoenvejecimiento y los principales cambios que se producen en las células (Rabe y col., 2006), atribuyendo a la RUV los siguientes efectos: la disminución de las tasas de proliferación de los distintos tipos celulares cutáneos y la menor eficacia en la respuesta ante estímulos intra y extracelulares. Estos hechos conllevan la pérdida de las funciones de barrera de queratinocitos y a irregularidades en la respuesta inmune de la piel. En la matriz extracelular disminuye la actividad de las metaloproteinasas, inhibiéndose la degradación de las fibras de elastina y colágeno. Esto provoca un aumento del grosor y una pérdida de la estructura de la piel. Asimismo, aumenta la vascularización mediada por cambios en la síntesis de factores de crecimiento y sus inhibidores en respuesta a la UVB. Otra característica del fotoenvejecimiento es una disminución de los niveles de antioxidantes, enzimáticos o no, en la piel.

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

3.7. Fotocarcinogénesis

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

En la iniciación, tiene lugar la transformación de células sanas en células precancerígenas, caracterizadas por presentar fallos en los mecanismos de regulación del ciclo celular y en la señalización intercelular. Para que esto ocurra es necesario que lesiones sufridas en el ADN se hayan fijado y que ocurra un fallo en los procesos que desencadenan la muerte de las células dañadas. Si se dan estas dos condiciones, la célula portadora de mutaciones puede proliferar transmitiendo los daños a las células hijas que, a su vez, podrán acumular nuevos daños. Las mutaciones clave son aquellas que ocurren en protooncogenes, dando lugar a oncogenes, y en genes supresores de tumor. Debido a estas mutaciones las células se hacen resistentes a las señales de terminación del crecimiento y de diferenciación. En este punto se puede hablar de células transformadas, iniciadas o precancerígenas y puede decirse que se ha iniciado el proceso de tumoración.

La segunda etapa del desarrollo del tumor es la promoción. Ésta se caracteriza por la expansión clonal de células transformadas y por la inducción de la proliferación y/o inhibición de la apoptosis. Estos hechos conducen a la formación de una masa local preneoplásica que requiere la presencia continua de estímulos promotores de tumor para su mantenimiento. En este punto, el correcto funcionamiento del sistema inmune es de vital importancia; tanto en el reconocimiento de las células transformadas, como en la generación de una respuesta citotóxica frente a dichas células.

En el tercer estadio del desarrollo tumoral, la progresión, se da la conversión de las lesiones premalignas o malignas en tumores con capacidad invasiva y metastática (Klaunig y Kamendulis, 2004). Junto con el acúmulo de un mayor número de daños en el genoma, tiene lugar la aparición de vasos sanguíneos de nueva formación para la irrigación de las células neoplásicas.

Un punto crítico en la iniciación de células tumorales en la piel es la mutación del gen supresor de tumor p53 en los queratinocitos epidérmicos, lo que favorece la aparición, y por tanto el acúmulo, de más mutaciones al no inducirse los mecanismos de reparación del ADN y al continuar proliferación celular por la inhibición de la apoptosis.

Efectos Perjudiciales de la RUV

Además, hay que recordar que, debido a la inmunosupresión inducida por la RUV, se produce una situación de tolerancia inmunológica que evita el reconocimiento de las células transformadas por el sistema inmune y, por tanto, que dicho sistema no desencadene la respuesta apropiada, lo que favorece no sólo la supervivencia de las células sino también la propagación de las mismas.

RUV y carcinogénesis

La relación entre la exposición a la radiación solar y el cáncer de piel está avalada por las siguientes evidencias epidemiológicas: los cánceres de piel son más frecuentes en las regiones de mayor irradiancia solar, en personas sensibles al sol, en aquellos que se exponen a la radiación, predominando en zonas del cuerpo expuestas y su aparición se reduce mediante la aplicación de agentes protectores (English y col., 1997).

Los mecanismos de acción por los que la RUV actúa son todos aquellos que hemos tratado en este apartado, principalmente el daño sufrido por el genoma, la inducción de inmunotolerancia y la reducción de la efectividad de las funciones de la piel derivadas de su envejecimiento. Todas estas acciones inducen, favorecen o potencian el proceso de carcinogénesis en cada uno de sus estadios. Esto lo realiza bien de forma directa debida a la capacidad mutagénica de la energía que porta, bien mediante el daño oxidativo derivado de la generación de especies reactivas, las cuales, además son capaces de activar agentes carcinogénicos.

Influencia de las ERO en la carcinogénesis

Las ERO están implicadas en la potenciación de la carcinogénesis, actuando en cada uno de los estadios de desarrollo del tumor. Esto se ha observado tanto en la piel como en otros tejidos (Bickers y Athar, 2006). Los mecanismos por los cuales las ERO llevan cabo esta acción se resumen en los siguientes tres puntos: favoreciendo la aparición de mutaciones y aberraciones cromosómicas, potenciando la proliferación celular de células transformadas y ejerciendo una selección negativa sobre el resto de células del tejido.

Las ERO y los RLs inducen la generación de mutaciones. Como ya se ha comentado anteriormente, estas especies son capaces de reaccionar con el ADN causando lesiones tanto

en las bases nitrogenadas como en el esqueleto carbonado. Además, reducen la eficacia de los mecanismos de reparación de estas lesiones, favoreciendo la fijación de mutaciones que, en función de los genes afectados puede inducir transformación celular, por lo que la relación de las EROs con la iniciación del tumor es clara. En los otros estadios del cáncer, en la promoción y progresión, tiene lugar la acumulación de un mayor número de daños en su genoma, pudiendo convivir en un mismo tumor células que, compartiendo su origen, portan distintas mutaciones y aberraciones cromosómicas. En función de a qué regiones o genes afecten estos cambios, se podría inducir la malignización tumoral. En este punto, las EROs actúan directamente y mediante la activación o potenciación de agentes mutagénicos procancerígenos como el 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA). Es por ello que éste ha sido utilizado en experimentación para la iniciación del cáncer de piel en modelos animales.

La segunda vía por la que las EROs fomentan la carcinogénesis es favoreciendo la proliferación celular. Esto lo realizan mediante la activación de factores de transcripción, como el NF- κ B. Este mismo efecto es producido si se activan sustancias promotoras del tumor como el tetradecanoil forbol-13 acetato (TPA). Este es utilizado en modelos de cáncer de piel inducidos por sustancias químicas. Además, la presencia de niveles de EROs superiores a los normales simulan la acción de los promotores tumorales. Estos mecanismos no sólo actúan en la promoción, sino también en la progresión tumoral.

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

Tipos de cáncer de piel

En la piel se pueden diferenciar tres tipos de tumores en función del tipo celular implicado. El primero de ellos son los linfomas de células T cutáneas, cuando afecta a este

Efectos Perjudiciales de la RUV

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

Existen dos tipos de melanomas en función del tipo de epidermis en la que se desarrolla. Así, por un lado están los melanomas de las palmas de las manos y plantas de los pies, donde la epidermis esta formada por un gran número de capas de queratinocitos y es más difícil que la RUV alcance la capa basal en la que se localizan los melanocitos. Se considera por ello que estos tumores no son inducidos por la RUV. Por otro lado, están los melanomas de áreas de la piel donde la epidermis es más fina y la RUV puede penetrar hasta el nivel de los melanocitos. Sin embargo, existe cierta controversia sobre la importancia de la radiación en la incidencia de este tipo de melanoma, puesto que el componente genético para el desarrollo de esta enfermedad tiene gran peso (Hansson, 2008). Esto no descartaría la implicación de la RUV en la etiología de este tipo de melanoma, puesto que éste es mucho más frecuente en fototipos claros que en los oscuros y en personas que residen en lugares que reciben una alta irradiación solar. Asimismo, la incidencia de melanoma en personas que han migrado de zonas de menor irradiación solar a zonas que reciben una mayor irradiación es más elevada que en los nativos y desciende con la edad en la que se emigró. Es por ello, que la incidencia de la RUV en edades tempranas es crítica, al igual que el haber sufrido procesos inflamatorios de la piel debidos a la RUV "quemaduras solares". Las personas no expuestas con frecuencia a la irradiación y de un nivel socioeconómico más elevado presentan una mayor incidencia de melanoma y de mortalidad por dicha enfermedad, por lo que se asocia a la irradiación con un patrón de exposición intermitente relacionado con el tiempo libre y los periodos vacacionales. Las áreas del cuerpo afectadas se relacionan con las zonas de exposición al sol siendo más raros los casos de zonas no expuestas. Los casos de melanoma se asocian a la presencia simultánea de cánceres de piel no melanómico, elastosis solar, léntigo y queratosis actínica.

Los cánceres de piel no melanocíticos se pueden clasificar en dos tipos: carcinomas de células basales y de células escamosas. Ambos tipos presentan bajas tasas de mortalidad

y de metástasis, pero pueden dar lugar a la destrucción del tejido adyacente. El carcinoma de células basales es más frecuente de que el de células escamosas, alcanzando una tasa del 75% de todos los cánceres de piel.

Existen cuatro subtipos principales de carcinoma de células basales: nodular (60%), superficial (25%), morfeaforme (2%) y micronodular (15%). Los dos últimos subtipos son considerados más agresivos y con un mayor riesgo de recurrencia local que los carcinomas nodulares y superficiales.

Es más frecuente en los fototipos claros que en los fototipos oscuros y aparece en lugares del cuerpo expuestos a la radiación solar. Su incidencia aumenta en los lugares cercanos al ecuador. Se relaciona con una exposición ligada al tiempo de ocio y al periodo vacacional, así como a los episodios de inflamación inducida por la RUV sufridas principalmente en la infancia. También se ha relacionado este tipo de cáncer con infección por papiloma virus. No hay que olvidar el factor genético, ya que la deficiencia de enzimas reparadores, como en el caso del xeroderma pigmentosum, u otro tipo de moléculas de carcinoma de células basales nevoide, aumentan la propensión a padecer esta enfermedad (Tilli y col., 2005). Por otra parte, su padecimiento también se asocia a queratosis actínica y, en menor medida, a telangiectasia facial.

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

4. MECANISMOS DE DEFENSA DE LA PIEL ANTE EL DAÑO INDUCIDO POR LA RUV

En respuesta al daño inducido por la RUV, las células activan mecanismos para el mantenimiento de la homeostasis tisular, siendo de primordial importancia la función de los sistemas de prevención, reversión o anulación de las lesiones en el ADN.

Dos características de la piel determinan la capacidad de la RUV de penetrar en la piel, éstas son el grosor de la epidermis y la pigmentación de la piel (Costin y Hearing, 2007). La penetración de la RUV en la piel se ve reducida si la epidermis está engrosada o pigmentada. En respuesta a la RUV, la piel estimula la división de los queratinocitos, lo que conduce al aumento del grosor de la epidermis, y los procesos de melanogénesis y transferencia de melanina a los queratinocitos, favoreciendo la pigmentación de la piel. Estos dos procesos se consideran mecanismos de defensa de la piel por su efectividad en la prevención del daño inducido por la RUV.

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

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

La acción de los mecanismos de defensa está regulada por la acción de mediadores celulares, como citocinas y factores de crecimiento, y por factores de transcripción, como el p53, NF- κ B y el nrf2, que estimulados por cambios celulares, modifican la transcripción de genes en función de las necesidades celulares.

4.1. Cambios en la epidermis

En respuesta a la RUV, la capa más externa de la piel reacciona para evitar la penetración de dicha radiación en las capas más internas. Esto lo consigue de dos maneras, por un lado engrosándose, sobre todo la capa córnea, y, por otro, aumentando la pigmentación de la piel, para absorber el máximo de radiación posible en capas más superficiales (Costin y Hearing, 2007).

Engrosamiento de la piel

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

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

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

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

Mecanismos de Defensa de la Piel frente al Daño Inducido por la RUV

Pigmentación

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

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

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

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

Pigmentación inducida por la RUV

La RUV induce el aumento de los niveles de pigmentación actuando, bien sobre los melanocitos directamente, o bien indirectamente a través de los queratinocitos. Además, estímulos nocivos o estresantes pueden estimular la melanogénesis. Así, tras la incidencia de la RUV en la piel, el daño sufrido por el ADN y el aumento de EROs, en especial los peróxidos lipídicos, induce la melanogénesis. Por otra parte, la melanina, principalmente la

eumelanina, es capaz de neutralizar ROS, lo cual aumenta su actividad fotoprotectora (Costin y Hearing, 2007).

Además de evitar que la RUV penetre a capas más profundas y favorecer la eliminación de las EROs, la melanina actúa como fotoprotector estimulando la apoptosis de las células dañadas por la radiación (Yamaguchi y col., 2008).

En los melanocitos, la RUV activa los sistemas enzimáticos implicados en la síntesis de melanina y la tasa de transferencia de melanosomas a los queratinocitos.

La RUV actúa sobre los queratinocitos induciendo la síntesis y secreción de sustancias de acción paracrina que estimulan la síntesis de melanina, la transferencia de melanosomas a los queratinocitos y la inducción de cambios en los melanocitos aumentando su número y la ramificación de las dendritas. Además, promueve el cambio de expresión de moléculas de adhesión a la matriz extracelular, facilitando la movilidad de estas células, lo que favorece el aumento del número de melanocitos (Costin y Hearing, 2007).

Además, el aumento del número de queratinocitos inducido por acción de la RUV, conlleva una mayor demanda de melanina, potenciando la estimulación de los queratinocitos sobre los melanocitos.

Fases del aumento de la pigmentación inducido por la RUV

Al igual que ocurre con el proceso de inflamación, en la pigmentación de la piel inducida por la RUV también se pueden distinguir dos fases (Sturm, 1998). En primer lugar se produce una pigmentación temprana o inmediata, de rápida aparición pero poco duradera; comienza a observarse inmediatamente tras la exposición, alcanzándose el máximo 1-2 horas más tarde y recuperándose el nivel basal de pigmentación entre 3 y 24 horas después. En la pigmentación inmediata se observa la redistribución de los melanosomas en los melanocitos, dirigiéndose principalmente a las dendritas; pero sin acompañarse de aumento del tamaño o del número de melanosomas.

Si el estímulo ha sido fuerte o repetitivo, se induce la pigmentación tardía de la piel que, aunque tarda más en observarse, es más oscura, evidente y duradera que la pigmentación temprana. Se empieza a observar 48-72 horas tras el estímulo, el máximo es a las 3 semanas y no se recupera la pigmentación normal en ausencia de estímulo hasta 8-10 meses más tarde. La pigmentación tardía es debida a que los melanocitos sufren cambios

Mecanismos de Defensa de la Piel frente al Daño Inducido por la RUV

que favorecen su actividad celular, sobre todo del enzima tirosinasa; aumenta la superficie de los melanocitos, por prolongación de las dendritas, y aumenta el número de melanosomas y de melanocitos (Costin y Hearing, 2007).

4.2. Sistema antioxidante

Necesidad de un sistema antioxidante

El paso de la atmósfera reductora a una oxidadora supuso la adaptación del metabolismo energético de muchos organismos al uso del oxígeno como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria, aumentando así el rendimiento energético. Sin embargo, debido a la alta reactividad del oxígeno, éste supone un peligro para los organismos aerobios. Estos organismos poseen en sus tejidos moléculas de acción antioxidante para defenderse frente al daño oxidativo. Un antioxidante es cualquier sustancia que, presente a bajas concentraciones, en comparación con las de los sustratos oxidables, retrasa o previene la oxidación de dichos sustratos (Halliwell y col., 1995).

Las moléculas antioxidantes difieren en su naturaleza, modo de acción y compartimentación, sin embargo existe una dependencia funcional entre todas ellas, por lo que al conjunto de todos los antioxidantes se le denomina red antioxidante (*antioxidant network*) (Podda y Grundmann-Kollmann, 2001).

La principal función de la red antioxidante es la eliminación específica de especies reactivas previniendo así el daño oxidativo, lo cual se consigue mediante la reducción de la misma; pero además, también actúa quelando metales prooxidantes y modificando la expresión de genes implicados en el mantenimiento de la homeostasis en función de las necesidades tisulares (Valko y col., 2006). Los distintos componentes de la red antioxidante establecen relaciones entre sí con varios fines:

- Función coenzimática: los enzimas de actividad antioxidante se valen de otros antioxidantes no enzimáticos que actúan como aceptores de electrones en la reacción catalizada.
- Regeneración de estados moleculares funcionales: cuando un elemento de la red antioxidante actúa reduciendo un sustrato, éste se oxida perdiendo su funcionalidad. La regeneración de su estado funcional, reducido, está mediada

por otro antioxidante de naturaleza no enzimática y mayor potencial redox bien directamente, como es el caso de la regeneración de tocoferol por parte de ascorbato, o bien por mediación de algún enzima antioxidante, como es el caso de la regeneración del glutatión reducido (GSH) a partir del glutatión oxidado (GSSG) por el $\text{NADPH} + \text{H}^+$ mediante la acción del enzima glutatión reductasa (GR).

- Por último, existe una relación funcional entre algunos enzimas antioxidantes, cuya colaboración alcanza el resultado esperado por la defensa antioxidante; así, por ejemplo, la superóxido dismutasa (SOD) requiere la posterior actuación de la catalasa (CAT) o de la glutatión peroxidasa (GPx) para la reducción completa del O_2^- a H_2O y O_2 .

Clasificación de los elementos que componen la red antioxidante

Los elementos que componen la red antioxidante pueden clasificarse según su naturaleza en antioxidantes de alto peso molecular, de función enzimática, y antioxidantes de bajo peso molecular y función no enzimática. Dentro de estos últimos se diferencian dos grupos en función de su polaridad: los liposolubles y los hidrosolubles, característica por la cual se encuentran en distintas localizaciones celulares.

- Antioxidantes no enzimáticos: las moléculas antioxidantes de bajo peso molecular son también denominadas antioxidantes no enzimáticos debido a que no tienen función catalizadora como tal.

Aunque existen excepciones, como es el caso del GSH, el metabolismo de los mamíferos no permite biosintetizar estas moléculas antioxidantes, por lo que se depende en gran medida de las fuentes dietéticas. En general, son moléculas fácilmente absorbibles, lo que favorece que, tanto en las células como en los tejidos fisiológicos, se alcancen niveles relevantes.

Una vez concluida su acción, los antioxidantes quedan en un estado oxidado que en algunos casos puede ser reactivo, lo cual es revertido mediante procesos de dismutación, recombinación o reducción por otros antioxidantes (Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999).

Mecanismos de Defensa de la Piel frente al Daño Inducido por la RUV

Como ya hemos comentado, dentro de este conjunto de antioxidantes de bajo peso molecular se distinguen dos grupos en función de su polaridad:

- Hidrosolubles o polares: las moléculas antioxidantes de bajo peso molecular hidrosolubles se localizan en los compartimentos celulares acuosos, en donde realizan sus funciones. Las principales moléculas de este tipo son el glutatión, y el ascorbato.
 - El glutatión es una molécula multifuncional, estructuralmente es un tripéptido formado por ácido glutámico, cisteína y glicina y posee un grupo tiol (SH) de la cisteína. Su principal función es la de actuar de antioxidante en los compartimentos acuosos celulares, donde es el antioxidante más abundante.

El glutatión en su forma reducida (GSH) es una de las moléculas antioxidantes más extendidas en la naturaleza y los organismos poseen el sistema enzimático necesario para su síntesis, lo que reduce la dependencia de las fuentes dietéticas para el mantenimiento de los niveles adecuados. Puede actuar por su cuenta, eliminando RLO o sirviendo de cofactor en las reacciones de enzimas antioxidantes. Además tiene otras funciones en el metabolismo y en el transporte de cobre, sobre el que actúa como quelante.

La capacidad antioxidante del GSH radica en el átomo de azufre del radical tiol, el cual dona un electrón con facilidad, generando un radical tiil (GS^{\cdot}), cuya vida media es superior a los de muchas otras especies reactivas: $GSH + R^{\cdot} \rightarrow GS^{\cdot} + RH$.

Los GS^{\cdot} pueden reaccionar entre sí generando la forma dimérica oxidada del glutatión GSSG: $GS^{\cdot} + GS^{\cdot} \rightarrow GSSG$.

El GSSG puede acumularse en la célula en la cual existen enzimas para la regeneración de GSH a partir de esta forma oxidada. Por lo que, aparte de las medidas de GSH y GSSG en un tejido, la relación que existe entre las dos formas es un buen indicador del estado redox en que se encuentra un tejido.

Altos niveles de GSSG en el microambiente celular pueden derivar en el daño oxidativo de proteínas sulfuradas, muchas de las cuales

tienen actividad enzimática: $\text{GSSG} + \text{Proteína-HS} \rightarrow \text{proteína-SSG} + \text{GSH}$.

Una función importante del glutatión es la prevención de la oxidación de proteínas sulfuradas nucleares implicadas en traducción y reparación del ADN, estas proteínas son muy sensibles a cambios oxidativos en el ambiente ácido nuclear. La reacción del GSH con los primeros productos de la oxidación de proteínas conduce a la generación de un conjugado entre la proteína oxidada y el GSH, previniendo la oxidación irreversible de las proteínas conjugadas: $\text{GSH} + \text{Proteína-S} \cdot \rightarrow \text{proteína-SSG} + \text{H}^+$.

El GSH también está implicado en la inhibición de los mecanismos de apoptosis, por lo que para el tratamiento de cánceres con fármacos proapoptóticos es necesario inducir un descenso de los niveles de GSH para facilitar el tratamiento del tumor.

- Ascorbato (vitamina C): a pesar de que no sólo plantas, sino también muchos animales tienen la capacidad de sintetizar esta molécula, los mamíferos han perdido la batería de enzimas necesaria para su síntesis, lo que les hace dependientes de la dieta para su obtención. El ascorbato tiene dos radicales hidroxilo, que le confieren su capacidad de actuar como donador de electrones. Tras la donación del primero, se transforma en el radical ascorbil y, tras la donación del segundo, dehidroascorbato. Para la regeneración de la forma reducida, requiere la acción del GSH o, por acción del enzima NADH-semidehidroascorbato reductasa, del NADH.

Existen dos formas más radicales derivadas del ascorbato, una radical denominada tricarbonilascorbato (AscH^*) y otra el radical semidehidroascorbato ($\text{Asc}^{\cdot-}$), producto de la oxidación del ascorbato por algunas EROs.

El ascorbato tiene gran importancia en la regeneración de la forma reducida del tocoferol, por lo que tiene una gran importancia en la preservación las membranas lipídicas a pesar de su polaridad. Otro efecto positivo del ascorbato es su capacidad de actuar como mediador

Mecanismos de Defensa de la Piel frente al Daño Inducido por la RUV

celular e influir en la expresión de algunos genes implicados en el ciclo celular y en genes supresores de la apoptosis.

Por otra parte, se le ha atribuido cierta capacidad prooxidante, la cual se explica por la reacción de esta molécula con algunos metales liberados en células dañadas.

- Otras sustancias hidrofílicas de bajo peso molecular y actividad antioxidante son el ácido úrico, los dipéptidos de histidina y la melatonina; aunque la acción de estos no es muy importante en la piel.
- Liposolubles o apolares: se encuentran en membranas lipídicas y en lipoproteínas, su función es evitar la peroxidación de los lípidos y la formación de hidroperóxidos a partir de 1O_2 . Los más importantes son el tocoferol y la ubiquinona.
 - Tocoferol (Vitamina E): esta molécula se puede presentar en ocho formas distintas, entre las cuales la α es la más eficaz. Es el antioxidante más eficaz en la eliminación de los peróxidos lipídicos de los fosfolípidos de membrana mediante la donación del átomo de hidrógeno de su grupo OH, transformándose en el radical cromanoxilo, que se estabiliza con facilidad por deslocalización aromática convirtiéndose en α -tocoferilquinona, o bien puede regenerarse el α -tocoferol por acción del ascorbato.

Otras acciones del tocoferol son la activación de endonucleasas y la ralentización de la tumorigénesis al inhibir la multiplicación celular y favorecer la apoptosis de las células transformadas.

- Ubiquinol: forma reducida de la ubiquinona, está implicado en la reconversión de la forma reducida del tocoferol en las lipoproteínas y en los liposomas.
- Carotenoides: se obtienen de la dieta y, una vez en los tejidos, pasan a formar parte de las membranas celulares, en las que realizan su función principal: evitar que el 1O_2 induzca la peroxidación de los lípidos presentes en la misma membrana gracias a su capacidad de donar electrones. En la reacción, los carotenoides quedan en estado

catiónico, que es revertido por la acción del tocoferol presente en la membrana (Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999).

- Antioxidantes Enzimáticos: su función principal es la reducir el $O_2^{\cdot-}$ y el HO^{\cdot} . Hay que tener en cuenta dos aspectos de los que deriva la importancia de estas moléculas: uno es que las produce el organismo, por lo que hay menor dependencia de la dieta, y por otro lado que su síntesis y activación se regula en función de las necesidades y de los estímulos recibidos por las células (Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999). Los antioxidantes enzimáticos se pueden clasificar en dos tipos principales: por un lado, aquellos enzimas que catalizan una reacción propiamente antioxidante, como son, por ejemplo, la superóxido dismutasa y la catalasa, y, por otro lado, los que catalizan reacciones de regeneración de estados reducidos de coenzimas, como son la glutatión reductasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
 - o Enzimas reductores:
 - La superóxido dismutasa (SOD, E.C. 1.15.1.1) es el principal enzima encargado de la reducción del $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 . En humanos se diferencian tres isoformas: una citosólica, principal en la defensa primaria antioxidante, otra mitocondrial de importancia antitumoral y, por último una extracelular, que se secreta en respuesta a citocinas. Como el H_2O_2 tiene capacidad reactiva, es necesaria su reducción a O_2 y H_2O , lo que es llevado a cabo por los enzimas catalasa y glutatión peroxidasa.
 - La catalasa (CAT, E.C. 1.11.1.6) es un enzima común a la mayoría de los seres aeróbicos. Posee una alta especificidad por el sustrato y una alta capacidad de catálisis. Se localiza en los peroxisomas.
 - La glutatión peroxidasa (GPx, E.C. 2.5.1.18) que cataliza la reducción del H_2O_2 a O_2 y H_2O a expensas de la oxidación del GSH, que actúa como cofactor enzimático. Este enzima también está implicado en la reducción de otros compuestos oxidados, especialmente aquellos derivados del daño oxidativo sobre los lípidos de las membranas.
 - La glutatión S-transferasa (GST, E.C. 2.5.1.18) es otro de los principales enzimas implicados en la primera defensa frente a ERO. La GST lleva a cabo la conjugación de radicales oxidados con el glutatión.

Mecanismos de Defensa de la Piel frente al Daño Inducido por la RUV

El conjugado formado se eliminará por vía urinaria. En este caso no se puede recuperar la molécula de glutatión.

- Enzimas regeneradores de estados reducidos de coenzimas:
 - La glutatión reductasa (GR, E.C. 1.6.4.2). La necesidad de reducir el glutatión oxidado deriva de la gran importancia de su forma reducida en la defensa frente al daño oxidativo, ya que son muchas las reacciones, enzimáticas o no, en las que se consume esta molécula. Sin embargo, el potencial redox del glutatión es muy elevado, por lo que para la regeneración de la forma reducida se requiere la mediación de un enzima que cataliza su reducción, la glutatión reductasa, que utiliza como coenzima el $\text{NADPH} + \text{H}^+$ como coenzima donador de electrones.
 - Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDh, E.C. 1.1.1.49): enzima del ciclo de las pentosas fosfato, es el principal regenerador de la forma reducida del NADPH en el citoplasma, por lo que la regeneración de este cofactor depende de la actividad de dicha vía metabólica.

A pesar de que la función de estos enzimas es proteger de las especies reactivas, en algunas ocasiones y debido a su naturaleza proteica, dichas especies reactivas pueden dañar al enzima afectando a su función, como por ejemplo, las ERN reducen la efectividad de la Mn-SOD (Dedon y Tannenbaum, 2004).

Las defensas antioxidantes de la piel y el efecto de la RUV sobre ellas

Como hemos visto, existen muchas moléculas antioxidantes; la importancia de cada una de ellas radica en el tipo de EROs generadas, las causas y las vías por las que han producido y sus posibles dianas de oxidación (Halliwell y col., 1995), por lo que en las distintas capas de la piel, en función de las necesidades del momento y de estímulos externos es más necesario la acción de algunos tipos de antioxidantes.

La piel, al ser el órgano más externo del cuerpo, es un tejido altamente expuesto al daño oxidativo debido a la generación de EROs, tanto las producidas por el metabolismo del propio tejido como las derivadas de la interacción con agentes externos, como la RUV y contaminantes ambientales (Thiele y Ekanayake-Mudiyanselage, 2007). Por esto mismo, las

distintas capas de la piel están equipadas con un arsenal de moléculas antioxidantes para su defensa y se ha descrito la presencia de sustancias antioxidantes tanto enzimáticas como no enzimáticas y, dentro de estas últimas, se diferencian en la piel tres grandes grupos de compuestos hidrofílicos y cinco grupos de hidrofóbicos (Kohen y Gati, 2000).

La RUV afecta a la piel y a los sistemas de defensa presentes en ella. Los niveles de antioxidantes de bajo peso molecular se ven reducidos tras la irradiación, siendo más sensibles los liposolubles que los hidrosolubles (Podda y col., 1998). La reducción de la actividad antioxidante de los antioxidantes lipofílicos favorece la oxidación de las membranas celulares y, por tanto, su desestabilización.

En un estudio *in vivo* realizado en ratones *hairless* irradiados (Shindo y col., 1994) se observó que una baja energía de RUV, inferiores a 2 dosis eritemógenas mínimas (DEM), reducían algunos antioxidantes de bajo peso molecular, como el ascorbato, mientras que para la reducción de otros como el ubiquinol, el glutatión y el tocoferol, se necesitaban dosis de radiación más altas (2-10 DEM).

Para que la RUV afecte a los antioxidantes de la piel no es necesario que se alcancen altas dosis de irradiación, ya que a dosis suberitemógenas (0,75 DEM) se observó la reducción del α -tocoferol del estrato córneo en un 50% en ratones y en un 85% en humanos. La reducción de los niveles de este antioxidante podría deberse a que la capa córnea es pobre en ascorbato, lo que reduce la tasa de regeneración de la forma reducida del tocoferol (Thiele y Ekanayake-Mudiyanselage, 2007).

En la figura 5 se representa, a modo esquemático, las relaciones entre los principales componentes de la red antioxidante.

Mecanismos de Defensa de la Piel frente al Daño Inducido por la RUV

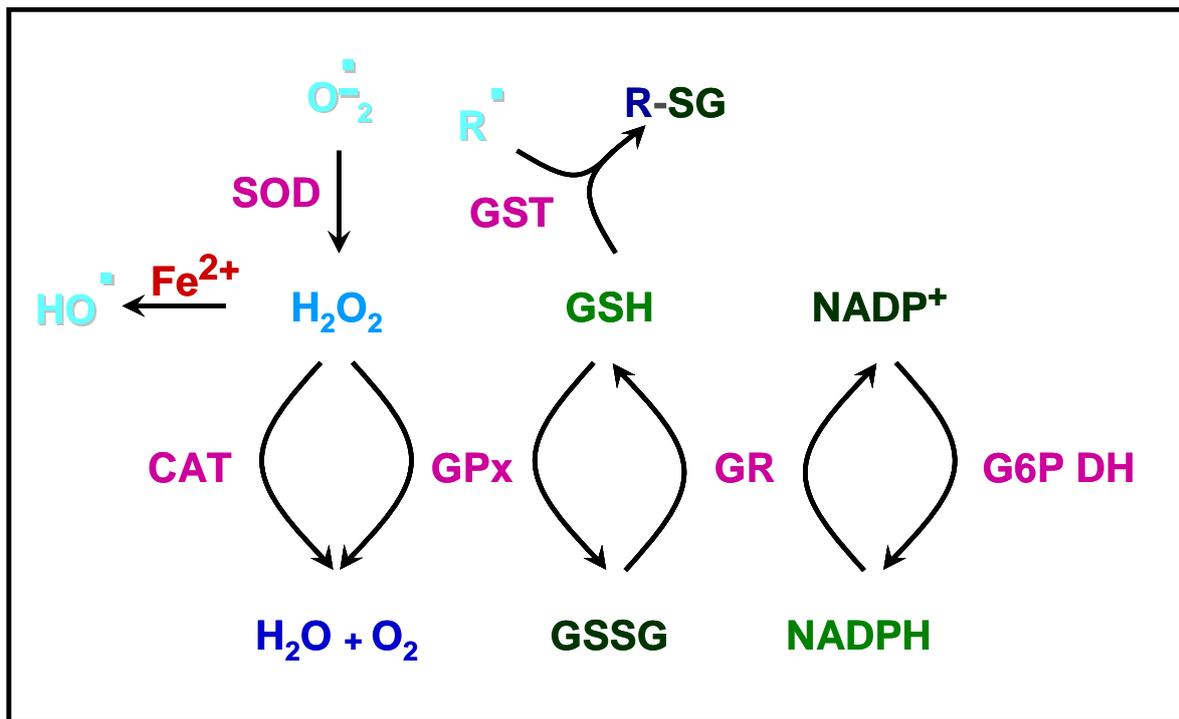


Figura 5: esquema de las relaciones entre los principales componentes de la red antioxidante.

4.3. Antimutagenicidad

Las células poseen mecanismos de reparación del daño sufrido por el material hereditario. La activación de un tipo de sistema de reparación en concreto depende del tipo de lesión que presente el ADN. Por otra parte, la efectividad y la fiabilidad en la reparación es diferente en cada uno de los tipos de mecanismos reparadores, pudiendo evitar la mutación o, fijándola en favor de la restauración del ciclo celular. A continuación se explican cómo actúan los mecanismos de reparación ante los daños inducidos por la RUV en el ADN.

Reparación de dímeros de pirimidinas y fotoproductos 6-4

En la naturaleza existen importantes y eficaces sistemas de reparación de los CPDs y 6-4PP por acción de enzimas denominados fotoliasas que se activan por UVA y luz azul (350-450nm); la eficacia de estos sistemas radica en que la causa del daño (RUV cercana y lejana) se asocia con el estímulo activador de estos sistema de reparación (Carell y col., 2001); sin embargo este sistema no se ha encontrado en humanos (Ywan Feng y col.,

1993). En general se acepta que está ausente en mamíferos placentarios (Kato Jr y col., 1994), por lo que en estos organismos, otros mecanismos alternativos tratan de minimizar el daño inducido por la RUV. Estos mecanismos, además de ser menos eficaces, pueden verse negativamente afectados por la RUV. El más importante de estos mecanismos para la resolución de las lesiones anteriormente nombradas en mamíferos es el sistema de reparación por escisión de nucleótido (NER).

Dentro del sistema de reparación NER pueden diferenciarse dos subsistemas en función del modo de reconocimiento de la lesión; así pues, diferenciamos el sistema NER de reparación del genoma global (GGR-NER, global genome repair NER), que reconoce daños que distorsionan la estructura de doble hélice, siendo su efectividad proporcional a la dimensión de la distorsión sufrida por la molécula de ADN, y el de reparación acoplada a la transcripción (TCR-NER, transcription coupled repair NER), que se induce por bloqueo de la ARN-polimerasa II. Al reconocer lesiones diferentes, los espectros de lesiones reparadas por estos sistemas son diferentes.

Los dímeros de pirimidinas y los fotoproductos 6-4 son lesiones que no distorsionan la doble hélice en gran medida por lo que principalmente son reconocidas por el sistema TCR-NER; sin embargo, gracias al complejo de unión al ADN dañado (DDB, Damage DNA Bindingh Complex), el GGR-NER también es capaz de reconocer su presencia e iniciar la reparación. Se ha observado que el sistema GGR-NER es más importante que el TCR-NER en la protección frente al desarrollo de tumores inducidos por la RUV en piel (Wijnhoven y col., 2007).

Por otro lado, la reparación de sitiosapurínicos derivados de la oxidación de bases es reparado preferentemente por el sistema de reparación por escisión de base (BER) (Lloyd, 1998; Kanno y col., 1999). Además existen otros sistemas capaces de revertir otro tipo de lesiones (Kanno y col., 1999; Matsumura y Ananthaswamy, 2004).

Reparación del daño oxidativo

Se ha descrito que en situaciones de estrés oxidativo mediado por la RUV en la piel aumentan los valores de p53 (Vile, 1997), disminuyendo la presencia de mayores cantidades de antioxidantes; el p53 se asocia en muchos tejidos con la inducción de apoptosis, sin embargo se ha observado que en la piel, un aumento del p53 se asocia inicialmente con la activación de los sistemas de reparación del ADN, concretamente en el mecanismo NER

Mecanismos de Defensa de la Piel frente al Daño Inducido por la RUV

(Renzing y col., 1996). Este sistema de reparación también es una de las vías de acción de la IL-12, a través de la cual ejerce su acción de evitar la inmunosupresión y la inmunotolerancia inducidas por la RUV (Schwarz y col., 2005).

4.4. Inducción de la muerte celular

La presencia de mutaciones en las células puede implicar la reducción de la eficacia de sus funciones y favorece la fijación de nuevas mutaciones, aumentando el daño génico y, en función de los genes implicados, puede inducirse la transformación tumoral.

Ante la presencia de células transformadas o que presenten un gran número de lesiones en el ADN, la única vía efectiva para mantener la homeostasis tisular es la inducción de la muerte de las células. Existen dos vías de inducción de muerte en estas células: por un lado la activación de mecanismos apoptóticos y, por otro, la citotoxicidad mediada por el sistema inmune.

Apoptosis

En la apoptosis, las células dañadas entran en un proceso ordenado de muerte que conduce a la disgregación del núcleo y del citoplasma en vesículas denominadas cuerpos apoptóticos que, debido a la composición de sus membranas, atraen a células fagocíticas que se encargan de la eliminación de estos residuos celulares de una manera limpia, sin inducir inflamación ni citotoxicidad en la periferia.

Tras la RUV se observa la entrada de algunos queratinocitos en apoptosis, son las denominadas *sunburn-cells*, que histológicamente se reconocen por presentar el núcleo picnótico y el citoplasma eosinofílico (Claerhout y col., 2006). Se ha observado que por acción de la RUV las células de Langerhans sufren apoptosis, pero no se han descrito los mecanismos que actúan en estos casos, aunque podrían ser los mismos que en los queratinocitos.

La apoptosis puede llevarse a cabo a través de dos tipos de vías en función de la localización del estímulo que la induce: por un lado, si el estímulo es externo a la célula, se induce la vía extrínseca (1) y, si el estímulo es interno, la vía intrínseca (2). Se ha observado

que la RUV es capaz provocar la muerte apoptótica de los queratinocitos mediante la inducción de ambas vías (Claerhout y col., 2006) que se explican a continuación.

1) En primer lugar, la vía extrínseca es aquella inducida por señales externas que son recibidas a través de los denominados receptores de muerte. Estos son receptores de membrana y citoplásmicos pertenecientes a las superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral cuya activación desencadena la muerte celular programada mediante el desencadenamiento de la cascada de las caspasas que conduce a la apertura de poros en la membrana mitocondrial interna liberando citocromo c al citoplasma, lo que activa las últimas caspasas responsables de la iniciación de la apoptosis por esta vía. La exposición a la RUV activa esta vía de apoptosis; por un lado induce la expresión de los receptores de muerte (Chow y Tron, 2005) y, por otro, reduce la especificidad ligando-receptor, pudiendo un ligando proapoptótico unirse a un receptor de muerte que no le corresponde, desencadenando la muerte celular programada.

2) En segundo lugar, la vía intrínseca, inducida por estímulos localizados en el interior celular. La RUV induce la vía intrínseca de la apoptosis mediante dos estímulos principales: la presencia de lesiones en el ADN (2a) y la presencia de EROs en el interior celular (2b).

2a) La presencia de lesiones en el ADN activa el sistema de reparación *mismatch* que reconoce pares de bases mal apareadas y desencadena el proceso apoptótico mediante la síntesis de proteínas proapoptóticas; por ello, para que se observe ha de pasar cierto tiempo tras la exposición a la RUV (>20h), por lo que se conoce como apoptosis tardía (Clydesdale y col., 2001). Un aumento de los niveles de enzimas reparadores del daño celular reduce la presencia de *sunburn-cells* tras la exposición de la piel a la RUV; sin embargo, no se suprime del todo la apoptosis de queratinocitos, indicando que otros mecanismos proapoptóticos continúan actuando (Kulms y Schwarz, 2002).

2b) Las sustancias tóxicas, como las EROs generadas por acción de la RUV en las células de la piel, activan la vía intrínseca de la apoptosis. Como se ha comentado anteriormente, estas especies son capaces de dañar el material hereditario, sin embargo esta vía no es la más importante en la inducción de la apoptosis, sino que lo hacen mediante la oxidación de las membranas celulares, en concreto, al dañar la membrana mitocondrial interna conduciendo a la pérdida del potencial de membrana y, consecuentemente, a la liberación de citocromo c, desencadenando el proceso apoptótico (Kulms y Schwarz, 2002); debido a que está mediada por proteínas constitutivas, se puede observar antes de 4 horas tras la exposición a la RUV, por lo

Mecanismos de Defensa de la Piel frente al Daño Inducido por la RUV

que se conoce como apoptosis temprana (Clydesdale y col., 2001). El tratamiento de células con sustancias antioxidantes, como el pirrolineno ditiocarbamato, reduce parcialmente la apoptosis inducida por la RUV.

Citotoxicidad mediada por el sistema inmune (Boticario y Cascales, 1995)

En las primeras fases del desarrollo de un tumor, las células transformadas pueden presentar antígenos específicos capaces de ser reconocidos como extraños por el sistema inmune, lo que puede generar una respuesta inmune frente a dichas células. Esta respuesta puede ser de dos tipos: por un lado, se pueden crear anticuerpos específicos que forman un complejo con los antígenos celulares inactivándolos y, por otro, puede inducirse la proliferación de un clon de células linfoides (linfocitos T citotóxicos y NK) específicamente reactivas capaces de destruir las células cancerosas.

Se podría pensar que, para que se desarrolle un tumor en un individuo, es necesario que éste esté inmunocomprometido. Sin embargo, también se desarrollan tumores en individuos inmunocompetentes, debido a la capacidad de supervivencia inmune algunos tumores. Ésta se debe a la falta de reconocimiento de las propiedades antigénicas del tumor, a que el sistema inmune, debido a la localización del tumor, no puede alcanzarlo en un estadio controlable o a que el tumor segregue factores que bloquean la acción inmune.

Se ha observado que el sistema inmune es más efectivo frente a las células cuya transformación ha sido mediada por la acción de un virus que frente a aquellas que se han transformado espontáneamente, debido a que, en este último caso, la transformación es más paulatina, producto de muchos pasos en los que se van seleccionando aquellas células capaces de burlar al sistema inmune; mientras que las células transformadas por virus presentan, en poco tiempo, mayores diferencias respecto a las no transformadas, lo que las hace más detectables por el sistema inmune.

Hay que recordar que por efecto de la RUV, el sistema inmune se muestra suprimido, tanto a nivel local como sistémico, lo que puede comprometer la eficacia del reconocimiento de las células, a la presentación de antígenos y/o la generación de una respuesta inmune correcta.

4.5. Regulación de los mecanismos de defensa frente a la RUV de la piel

Papel central del p53

Ante el daño sufrido en el ADN por la RUV aumentan los niveles de expresión de p53. Este factor de transcripción actúa en respuesta al daño genético mediante dos vías: por un lado, deteniendo el ciclo celular y, por otro, aumentando la transcripción de genes implicados en la reparación del daño y/o la apoptosis. En principio, se trata de recuperar la integridad genómica, lo que reduciría los niveles de p53 en el medio, permitiendo la continuación del ciclo celular y la división. La p53 aumenta la expresión de proteínas implicadas en el reconocimiento del daño por el GGR-NER (Brash, 2006) y en la activación del sistema de reparación. Si no se consigue restablecer la integridad genómica, el aumento de los niveles de p53 en el núcleo activaría la transcripción de la apoptosis por la vía intrínseca, es decir la apoptosis tardía (Rass y Reichrath, 2008).

La p53 es una proteína ampliamente estudiada en los procesos de carcinogénesis debido a su implicación en las situaciones de estrés celular, siendo el más relevante su función como supresor tumoral. En la estructura de la p53 se pueden diferenciar tres regiones: la N-terminal está encargada de la transactivación, la central de la unión al ADN y la C terminal tiene características reguladoras. Según la situación o los estímulos recibidos, la proteína puede sufrir varias modificaciones postranscripcionales, regulando sus funciones y su estabilidad.

En condiciones normales, la p53 es una proteína citoplasmática, pero ante algunos estímulos estresantes se internaliza en el núcleo modulando la expresión de genes implicados en diferentes procesos biológicos.

Las funciones de esta proteína son muy numerosas y pueden clasificarse en dos grupos por el modo en el que actúa; así, podemos hablar de: a) funciones dependientes de transcripción, que son todas aquellas funciones derivadas de la actuación del p53 como factor de transcripción y, b) un grupo de funciones independientes de la transcripción.

El gen p53 se activa en la piel tras el daño inducido por la RUV en el ADN. Si el daño no es muy grave, aumentan los niveles de p53 y su tasa de activación por fosforilación (Prives y Hall, 1999), favoreciendo la detención del ciclo celular en el estadio G1 para facilitar la reparación del daño, antes de que tenga lugar la replicación. Si el daño es grave, se activa la vía apoptótica, la p53 se actúa de factor de transcripción, activando la expresión de genes

Regulación de los Mecanismos de Defensa frente a la RUV de la Piel

promotores de la apoptosis e inhibiendo la transcripción de genes supresores de la apoptosis, así ocurre en la generación de *sunburn cells* tras una irradiación aguda a dosis superiores a la DEM (Hill y col., 1999).

En cuanto a la irradiación, se observó que diferentes dosis de RUV inducen similares respuestas de detención del ciclo celular y reparación o apoptosis en los distintos tipos celulares de la piel (queratinocitos, melanocitos y fibroblastos) pero diferentes respuestas en cuanto a factores inmunológicos. (Latonen y Laiho, 2005). Por otro lado, la respuesta celular desencadenada por la RUV en los queratinocitos varía según su estadio.

En casos de estrés oxidativo, otra función de la p53 es la inducción de la transcripción del gen TIGAR (*Tp53-inducible glycolysis and apoptosis regulator*), lo que conduce a la desviación del metabolismo de los glúcidos de la vía glucolítica a la de las pentosas fosfato, aumentando así los niveles de NADPH (Vousden y Lane, 2007), favoreciendo la reducción del GSSG y pudiendo promover la eliminación de EROs generadas por la acción de la irradiación.

Otras funciones de la p53 son el mantenimiento de la estabilidad genómica, la vigilancia de la replicación correcta del ADN y la inhibición de la angiogénesis, por lo que no sólo es importante a nivel celular, sino también tisular.

No en todas las ocasiones en las que se activa la p53 se activan todas las vías de señalización en las que está implicada; así, en función del estímulo y de la localización celular puede actuar de una u otra forma.

En condiciones normales el gen p53 debe ser controlado, esto se realiza regulando los niveles de proteína, reduciendo su síntesis y aumentando su sensibilidad, así como regulando su localización intracelular e inhibiendo su actividad.

Otros factores de transcripción activados por la RUV

1) NF- κ B

La familia de factores de transcripción NF- κ B está implicada en la regulación de los procesos inmunes, inflamatorios y en la prevención de la apoptosis en respuesta al daño celular o a la secreción de citocina; además, en la piel está implicado en la diferenciación y morfogénesis embriológica de la piel y en la hiperproliferación de la epidermis.

La proteína I κ B retiene el NF- κ B inactivo en el citoplasma, lo que conlleva la liberación del factor de transcripción permitiendo su translocación (Sur y col., 2008).

La activación del NF- κ B provoca la transcripción de varias citocinas proinflamatorias activadoras de las células T y de la interacción de éstas con las células B, por lo que este factor de transcripción está asociado con los procesos inflamatorios de la piel. Por otra parte, el bloqueo de este factor de transcripción, también promueve la inflamación: se observa una infiltración masiva de células inmunes en la piel, principalmente neutrófilos y macrófagos, acompañada de hiperproliferación e hiperqueratosis y el aumento de la tasa de apoptosis. La principal diferencia entre ambos procesos inflamatorios, por activación y por bloqueo del NF- κ B, radica en el tipo de células inmunes. Por lo tanto, la homeostasis de la piel depende del equilibrio de la actividad del NF- κ B.

Dado que este factor de transcripción promueve la proliferación de los queratinocitos y el proceso de inflamación de la piel, no es extraña su implicación en el desarrollo del cáncer de piel (Sur y col., 2008). Entre otros estímulos, la RUV activa la translocación del NF- κ B al núcleo y, por tanto, la expresión de los genes asociados a la activación de dicho factor de transcripción. Se ha demostrado la implicación del NF- κ B en la iniciación y en la promoción de la carcinogénesis inducida por la RUV en la piel.

2) AP1

La familia de factores de transcripción AP-1 (*activator protein 1*) está implicada en la regulación de la expresión y de la función de genes implicados en la supervivencia y en la proliferación celular. Se ha demostrado que estos factores de transcripción están implicados en la promoción y progresión de tumores cutáneos inducidos tanto por agentes químicos como por la RUV (Cooper y Bowden, 2007).

5. EFECTOS BENEFICIOSOS Y APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LA RUV

Efectos beneficiosos de la RUV

Cuando se centra una exposición o un debate sobre la influencia de la RUV en los organismos, se suelen plantear los efectos negativos que hemos comentado anteriormente, sin embargo, también existen ciertos efectos beneficiosos, entre los que destacamos los siguientes: síntesis de vitamina D (Fraser, 1995), regulación de secreción hormonal (Slominski y col., 1996; Hiramoto y col., 2003), favorece el ánimo y mejora del flujo sanguíneo periférico.

La dosis de UVB necesaria para la síntesis de vitamina D es normalmente la equivalente a exponer una pequeña superficie del cuerpo a un tercio de la DEM (Gilchrest, 2008).

Usos terapéuticos

Por otro lado, se han aprovechado los efectos que tiene la RUV en la piel para tratar ciertos desórdenes de la misma, siendo las terapias PUVA (Psoralen-UVA) y la fototerapia UVB las que se llevan a la práctica. La terapia PUVA se basa en la inducción de aductos psolareno-ADN en las células de la piel inhibiendo su proliferación pero manteniendo su viabilidad. Otro efecto, de este tratamiento es la inducción de apoptosis en linfocitos, que en psoriasis presentan una elevada infiltración en la piel, por tanto, la terapia PUVA ejerce una acción inmunosupresora y antiinflamatoria, cuyos mecanismos de acción no han sido clarificados del todo (Matsumura y Ananthaswamy, 2004). Sin embargo, esta terapia además de los efectos negativos de la radiación UVA, tiene otros efectos adversos. Así, los psoralenos activados por la acción de la radiación UVA producen EROs al reaccionar con el oxígeno, lo que conduce a un episodio de fototoxicidad aguda. Las células de Langerhans también se ven afectadas por el tratamiento PUVA, reduciendo la eficacia de su función e induciendo inmunodeficiencia local (Middelkamp-Hup y col., 2004a). Además, para mantener el efecto terapéutico es necesario incrementar la dosis de irradiación según se van sucediendo las sesiones.

La fototerapia UVB se aplica en enfermedades inflamatorias de la piel como psoriasis y dermatitis atópica, basándose en sus efectos inmunosupresores (explicados anteriormente) y en su baja penetración. Este tratamiento disminuye la infiltración de linfocitos activados en la piel y restaura las pautas de proliferación de queratinocitos alteradas en la psoriasis (Matsumura y Ananthaswamy, 2004).

Estos tratamientos, a dosis elevadas o tiempos largos, tienen muchos efectos adversos, tanto a corto plazo, como inflamación y mutación, como a largo plazo, siendo el principal efecto adverso el desarrollo de cáncer de piel, generalmente de tipo no melanoma.

6. FOTOPROTECCIÓN

Los seres humanos estamos expuestos a la RUV y, por tanto, a sus posibles efectos nocivos. Sin embargo, y como se comentó anteriormente, ésta puede ser beneficiosa y tener usos terapéuticos. Por esto, cabe preguntarse cuál sería la RUV que se debe o se puede recibir.

Valoración del riesgo de la radiación

La sensibilidad de la piel ante la RUV difiere entre individuos, por lo que, para valorar el riesgo de la radiación, han de estudiarse las características personales.

El factor personal más estudiado es la pigmentación natural de los individuos. Además existen otros factores como la competencia inmunológica o los niveles epidérmicos de enzimas reparadores del ADN (Kripke, 1977), así como de factores genéticos que predispongan a patologías de piel o cánceres (Hansson, 2008).

Para facilitar el estudio de la piel se definieron seis tipos de piel, a los que se denominó fototipos (Fitzpatrick, 1988). Esta clasificación se realizó en función de su comportamiento ante la RUV del sol de mediodía y se relacionó con características fácilmente apreciables. Entre éstas estarían la pigmentación de piel, cabello y ojos y la capacidad de broncearse por efecto de la radiación solar. Siendo, aquellos fototipos más claros los que padecen un mayor riesgo ante la RUV, lo cual es avalado por estudios epidemiológicos.

Además se consideran en mayor riesgo de sufrir quemaduras solares, y por tanto de un mayor daño por acción de la RUV, a los niños menores de 3 años, a las embarazadas, a los afectados cardiovasculares, a aquellos que hayan sufrido quemaduras, a personas que han recibido un transplante y a los pacientes oncológicos (Ismail y col., 2006; Morales-Molina, 2006).

Concepto de fotoprotección

De la búsqueda del equilibrio entre los beneficios y los perjuicios de la RUV en los seres vivos surge el concepto de fotoprotección. Éste tratar de englobar todos aquellos recursos y hábitos capaces de evitar el efecto nocivo de la RUV.

A un nivel general podemos hablar de todas las medidas capaces de evitar la degradación de la capa de ozono. En cuanto a la fotoprotección de la población en general, se puede hablar de programas de concienciación y educación para la salud sobre los efectos dañinos de la RUV y la concienciación sobre su riesgo. También la educación en hábitos de exposición moderada y prácticas recomendables que minimicen los daños derivados de ella. Dentro de éstas últimas estarían el uso de indumentaria apropiada o la aplicación de filtros solares. Todas estas prácticas han de ser más estrictas durante la infancia debido a la importancia que tiene la exposición a la RUV durante ese periodo de la vida (Gallagher y Lee, 2006).

Valoración del daño de la RUV y de la protección frente a ella

El daño inducido por la RUV en la piel de un individuo se mide en función de la dosis energética mínima necesaria para que induzca la formación de eritema evidente y de bordes definidos en la piel. Ésta es denominada dosis eritemógena mínima (DEM), a la que ya hemos hecho alusión, y se expresa en unidades de energía por superficie, generalmente en J/cm^2 . Puesto que generalmente se habla de RUV generada por el sol, en algunos casos se expresa esta variable en función del tiempo mínimo de exposición al sol necesario para generar dicho eritema.

El nivel de protección que ejerce una prenda o sustancia fotoprotectora se mide dividiendo la DEM de la piel protegida entre la DEM de la misma piel no protegida, manteniéndose la energía de irradiación. El valor resultante es denominado factor de protección solar (FPS). La graduación de los niveles de protección solar se realiza en función de la capacidad de los filtros solares de aumentar la DEM, lo que se realiza mediante un fototest *in vivo* (Morales-Molina, 2006).

Sin embargo, confiar la valoración del daño derivado únicamente en función del eritema es un error, ya que a dosis de radiación suberitemógenas ya se observan

Fotoprotección

alteraciones morfológicas en la piel y daño oxidativo, por lo que mediante el FPS se está minusvalorando la capacidad nociva de la RUV (Lavker y col., 1995; Halliday y Lyons, 2008).

En la actualidad se están realizando esfuerzos para tener en cuenta el daño oxidativo. Por ello, se ha creado un nuevo índice de protección solar en base a la capacidad de los filtros solares de prevenir el daño oxidativo denominado factor de protección solar radical (*radical sun protection factor*, RSF). Este se define como el incremento de tiempo de permanencia bajo una fuente de RUV en el que se genera el mismo nivel de especies reactivas y radicales libres que en la piel no protegida, debido a la protección antioxidante y antirradicalar del filtro (Herrling y col., 2006).

Medidas de fotoprotección a adoptar

Medidas primarias

Las primeras recomendaciones de los expertos en cuanto a las medidas a adoptar para evitar el efecto nocivo de la RUV se centran en evitar la exposición a la RUV directa o indirectamente.

En primer lugar se recomienda evitar la exposición a fuentes artificiales de RUV, a excepción de terapias con UV. Así como evitar el sol directo, sobre todo en la franja horaria del mediodía (11-16h). En segundo lugar, evitar la exposición directa mediante el uso de sombreros, gafas de sol y ropa oscura.

Filtros solares

El uso de filtros solares es una de las principales y más efectivas barreras para proteger la piel de la incidencia de la RUV. En función del modo en que evitan la RUV se distinguen tres tipos de filtros (Morales-Molina, 2006; Rass y Reichrath, 2008)

- Filtros químicos u orgánicos: absorben la luz, pero no de todo el espectro por lo que se consideran filtros parciales.

- Filtros físicos o inorgánicos: reflejan y dispersan la luz. Estos son menos alergénicos y más efectivos que los anteriores ya que actúan frente a un mayor espectro de radiación. Por ello se considera que tienen efecto "pantalla total".
- Filtros biológicos: son filtros químicos o físicos, que contienen sustancias capaces de interferir con procesos derivados de la exposición a la RUV. Entre ellos encontramos varias sustancias con distintas acciones como puede ser la inhibición de la inflamación, la estimulación del sistema inmune, la activación de los sistemas de reparación de ADN o la prevención del daño oxidativo.

Los filtros solares comerciales indican cual es su FPS, éste depende de su correcto uso, es decir, de que sean aplicados a dosis de $2\text{mg}/\text{cm}^2$. Sin embargo, en la práctica no se suele aplicar una dosis tan elevada. La elección del nivel de FPS se ha de realizar en función del fototipo y su aplicación ha de repetirse periódicamente.

Este tipo de protección está asociada al periodo vacacional, cuando se realizan actividades, en las que se expone conscientemente el organismo a la acción de la RUV, pero habitualmente es descuidada el resto del tiempo.

Fotoquimiopreención

Partiendo de la idea de mejorar la protección diaria de manera sencilla y de que ésta esté al alcance de la mayoría de la población, nace el concepto de fotoquimioprotección o fotoquimiopreención. Éste es considerado un mecanismo de prevención de la aparición de cáncer u otras lesiones o enfermedades de la piel mediante la administración tópica u oral de compuestos o fórmulas naturales o sintéticas que previenen, reducen o revierten el daño producido por la RUV. Esto es posible gracias a su efecto no tóxico, antimutagénico, anticancerígeno e inhibidor de procesos celulares implicados en los distintos procesos patológicos de la piel (Uliasz y Spencer, 2004; Afaq y col., 2005). La alimentación y los fotoprotectores de administración oral serían los primeros enfoques de esta nueva visión de la protección solar.

La principal ventaja de los quimiofotoprotectores de administración oral frente a los filtros solares de uso tópico, o incluso de los quimiofotoprotectores de uso tópico, es que, al tener un efecto sistémico, suministran una protección uniforme en toda la piel (Middelkamp-Hup y col., 2004b).

Fotoprotección

Por otra parte, la posible reducción de los niveles de asimilación de vitamina D asociada al uso de agentes fotoprotectores apoya el uso de sustancias fotoprotectoras de administración oral, que permiten la incidencia de la RUV en la piel reduciendo sus efectos nocivos (Rass y Reichrath, 2008).

7. *Polypodium leucotomos*

7.1. Características del género *Polypodium* y de la especie *P. leucotomos*

El género de helechos *Polypodium* (del griego *poly*=mucho, *podia*=pies, debido a la forma de los rizomas semejantes a pequeños pies) es también conocido por el nombre de *Phlebodium*.

Este género, perteneciente a la familia de las Polypodiaceas, abarca un gran número de especies de extensa distribución. Éstas crecen principalmente en lugares oscuros y húmedos de zonas subtropicales. Se caracterizan por su alta tolerancia al estrés ambiental, principalmente a la sequía; además, hay especies adaptadas a altos niveles de salinidad, altas temperaturas o a heladas (Bagniewska-Zadworna y col., 2008).

Para sobrevivir en estas condiciones adversas, estos helechos poseen mecanismos anatómicos y producen metabolitos secundarios que favorecen la adaptación al ambiente estresante. Por lo que las propiedades de estos helechos están determinadas por las sustancias que presentan. Entre ellas: compuestos fenólicos, resinas, ecdisonas, saponinas y algunos carbohidratos específicos. Además, acumulan azúcares, lo que estabiliza las membranas y las proteínas.

Por otra parte es sabido que, durante épocas de estrés ambiental, se incrementa la generación de EROs en las células de las plantas. En estas condiciones, para proteger las membranas de la oxidación, se requiere la presencia de sustancias antioxidantes que eliminen las especies reactivas, previniendo así la degradación de los tejidos de la planta.

Un estudio realizado en los rizomas de helechos de la especie *Polypodium vulgare*, determinó la localización celular de polifenoles. Éstos son sustancias con características antioxidantes, se observan principalmente en vacuolas citoplasmáticas y en membranas celulares secundarias, mientras que sus niveles en la membrana plasmática son muy bajos (Bagniewska-Zadworna y col., 2008).

Por lo tanto, las plantas se sirven de las sustancias que sintetizan para asegurar su supervivencia. Esas mismas sustancias son las responsables de las propiedades terapéuticas de estos helechos. Si bien la mayoría de las aplicaciones medicinales se han realizado con extractos derivados de la especie *P. leucotomos* (PL), también se han empleado otras

Polypodium leucotomos

especies con fines similares. Debido a su proximidad filogenética, esas especies sintetizan las mismas sustancias o parecidas, por lo que comparten algunas propiedades.

En concreto la especie *P. leucotomos* (PL), también descrita como *P. aureum*, vulgarmente conocida por los nombres "calaguala" y "anapsos", crece en altitudes de entre 700 y 2500m de ciertas regiones de Centro y Sudamérica. Fue introducido en Europa en 1788 tras el regreso de una expedición con fines botánicos dirigida por Ruiz y organizada por la corona española (González y col., 2007).

7.2. Evidencias del efecto beneficioso de estos helechos

La primera cita encontrada sobre el efecto curativo de los helechos de la familia Polypodiaceae es de Dioscórides (s.I), que describe algunas propiedades medicinales de las raíces de estos helechos. Entre ellas, la cicatrización de grietas en la piel por administración tópica (Font i Quer, 2000).

En las regiones de América Central y del Sur, la especie *Polypodium leucotomos*, y otras pertenecientes al mismo género, han sido utilizadas por la medicina tradicional como tratamiento en diversos trastornos inflamatorios cutáneos y en tumores.

7.3. Primeros estudios que demostraron su efecto

Estudios empíricos demostraron su efectividad en el tratamiento de varias enfermedades de la piel como vitíligo (Mohammad, 1989), psoriasis (Capella Pérez y Castells Rodellas, 1981; Del Pino Gamboa y col., 1982; Pineiro Alvarez, 1983) y dermatitis atópica (Jimenez y col., 1986; Jimenez y col., 1987).

Los desórdenes o las enfermedades de la piel en las que se ha observado un efecto beneficioso del *Polypodium* cursan con inflamación y, en su desarrollo, probablemente esté implicado un mecanismo autoinmune (Rayward y col., 1997); en algunas de ellas, se observa una hiperproliferación de las células de la piel (Vasänge y col., 1997), principalmente de los queratinocitos.

La aplicación de la planta directamente en casos de psoriasis y dermatitis atópica mostró pocos resultados significativos. Esto probablemente es debido a las bajas concentraciones de

los compuestos activos beneficiosos presentes en la misma, por lo que se aplican extractos hidrófilos purificados de las hojas (González y col., 2007) o, en algunos casos, de los rizomas del helecho (Sempere-Ortells y col., 2002).

Los resultados beneficiosos de distintos derivados de estos helechos, en concreto de la especie *P. leucotomos*, en el tratamiento de enfermedades cutáneas, llevó a plantearse las propiedades, los componentes bioactivos presentes en los extractos y mecanismos de acción de dichos componentes bioactivos.

7.4. Propiedades

Se ha demostrado que el *P. leucotomos* presenta varias propiedades: capacidad inmunomoduladora, antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena y fotoprotectora. Se cree que esta última, se debe, en parte, a la combinación de las demás propiedades del *Polypodium*. Es por ello, que el estudio de todas sus actividades permitirá conocer los mecanismos por los que ejerce la acción fotoprotectora

Inmunomoduladora

La acción del *Polypodium* sobre el sistema inmune sigue dos vías. Por un lado, promueve un efecto inmunorregulador y, por otro, favorece la inmunidad humoral.

En 1983 se verificó su acción inmunomoduladora al demostrarse la capacidad de un extracto del helecho de reducir la respuesta linfoblástica inducida por mitógenos y de favorecer el aumento de los linfocitos CD8⁺ frente a los CD4⁺ (Vargas y col., 1983). Este hecho planteó su posible uso como antivírico al favorecer la expansión de los linfocitos citotóxicos.

Un extracto metanólico de *Polypodium* mostró la capacidad de inhibir la respuesta proliferativa en monocitos inducida por mitógenos derivados de los linfocitos T, lo que se revertía al añadir IL-2 al medio (Rayward y col., 1997).

El *P. leucotomos* modifica el patrón de secreción de citocinas liberadas por monocitos activados en cultivo. Para ello inhibe la liberación de citocinas activadoras de linfocitos del subtipo CD4⁺ Th1 en favor de aquellas activadoras de la acción de los linfocitos CD4⁺ Th2 y

Polypodium leucotomos

supresoras de la actividad de los Th1. Lo que, en parte, explica el efecto del *P. leucotomos* en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y en procesos inflamatorios, ya que, en ambos procesos, la actividad de los linfocitos del subtipo Th1 está anómalamente aumentada (González y col., 2000).

El tratamiento con *P. leucotomos* mostró un efecto protector al prevenir el descenso del número de células de Langerhans inducida por la RUV (González y Pathak, 1996). En otros estudios no se observaron cambios en el número, pero sí preservación de la morfología dendrítica; evitando así su aumento de tamaño ante los efectos de la RUV (González y col., 1997; Middelkamp-Hup y col., 2004b). Además, se observó su acción reductora de la infiltración de mastocitos en la piel inducida por RUV, reduciendo así la inflamación.

Recientemente (Siscovick y col., 2008) se observó que en ratones irradiados a los que se les había administrado *P. leucotomos* por vía oral mantenían la reacción de hipersensibilidad y los niveles de infiltrado inflamatorio en la piel, en comparación con los que no habían sido tratados con *P. leucotomos*. Esto demuestra la capacidad del *P. leucotomos* de prevenir la inmunosupresión inducida por la RUV, tanto cuando la sensibilización se realizó a nivel local, como a nivel sistémico.

Antiinflamatoria

Se observó que tanto el *P. leucotomos* como el *P. decumanum* poseen capacidad antiinflamatoria (Punzón y col., 2003).

El efecto antiinflamatorio del *P. leucotomos* es conocido por su uso tradicional. Además, se ha demostrado *in vitro* la capacidad de los helechos de este género de inhibir la señal inflamatoria inducida por el TNF (Punzón y col., 2003) y la expresión génica medida por NF- κ B (Manna y col., 2003).

El mecanismo por el cual los derivados del *P. leucotomos* pueden regular la acción del sistema inmune es desconocido, pero se apunta a su capacidad de bloquear la acción del NF- κ B (Manna y col., 2003). Este factor de transcripción está implicado, entre otros procesos, en la inflamación, la proliferación celular y la tumorigénesis.

Podría suponerse que, en ambos helechos, los mecanismos de acción por los que ejercen su acción antiinflamatoria fuesen comunes. Sin embargo, los estudios realizados con *P. decumanum* demostraron que este helecho inhibe la acción de las citocinas

proinflamatorias TNF, IL-6 e IL-1 β por macrófagos activados mediante la inhibición de la producción de las dos primeras y favoreciendo la expresión de receptores de membrana inhibidores para TNF e IL-1 β . A diferencia del *P. decumanum*, el tratamiento con *P. leucotomos* no mostró cambios en los niveles de NO, de IL-1 β , en los niveles de activación de linfocitos, ni en la inhibición del NF- κ B.

Otra propiedad del *P. leucotomos* que se ha descrito, es su capacidad de prevenir la vasodilatación en piel inducida por la UVR (Middelkamp-Hup y col., 2004a; Middelkamp-Hup y col., 2004b).

Antioxidante

Varios estudios avalan su capacidad antioxidante. González y Pathak demostraron su capacidad de reducir *in vitro* la producción del anión superóxido y de peróxidos lipídicos generados por la radiación ultravioleta. De forma menos notable, también reduce la producción de $^1\text{O}_2$ (González y Pathak, 1996).

Otro estudio *in vitro* demostró la capacidad del *P. leucotomos* de eliminar el HO \cdot , el O $_2^{\cdot-}$ y el $^1\text{O}_2$, siendo para este último más efectivo que *in vivo*. Sin embargo, su capacidad de eliminar el H $_2$ O $_2$ es muy reducida, casi nula (Gomes y col., 2001).

Un estudio en cultivos de queratinocitos y fibroblastos demostró que dosis de 0,01 a 1% de EPL en el medio de cultivo, inhiben la peroxidación lipídica en ambos tipos de cultivos en ausencia de irradiación. Asimismo, dosis de 0,1 y 1% de EPL en el medio de cultivo inhiben la peroxidación lipídica en ambos tipos celulares sometidos a la RUV de tipo A y B por separado (Philips y col., 2003).

En el mismo estudio anterior, se determinó la integridad de las membranas mediante la liberación de lactato deshidrogenasa al medio. Tanto en queratinocitos como en fibroblastos no irradiados y cultivados en medio con EPL al 0,1 y 1%, la integridad de la membrana se vio significativamente mejorada. Esta mejora se observó en fibroblastos irradiados con UVA y UVB y en queratinocitos irradiados con UVB, pero no en los tratados con UVA (Philips y col., 2003).

Polypodium leucotomos

Anticancerígena

La capacidad antitumoral del *P. leucotomos* fue descrita por primera vez en 1967. Se comprobó en un estudio en el que evaluaba la capacidad de un extracto procedente del rizoma del *P. leucotomos*, al que denominaron Calagualina. Horvath y col. en 1967 (Horvath y col., 1967) describieron esta capacidad por primera vez en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* de distintos tipos de tumores, entre ellos el carcinoma de células basales. En estos estudios se observó que su administración en pacientes con tumores aumentaba ligeramente la supervivencia, sin presentar efectos adversos. Este estudio, concluyó además, que la actividad antitumoral se debía a una actividad anabólica y no a una actividad citostática, como es en el caso de otros antitumorales procedentes de extractos de vegetales.

Esta acción se ha explicado por el efecto inhibitor del factor de transcripción NF- κ B. Su activación conlleva la inhibición de la transcripción de genes implicados en la apoptosis y la activación de otros implicados en el aumento de la proliferación celular (Manna y col., 2003).

Por otra parte, se demostró la capacidad del *P. leucotomos* de prevenir el daño en el ADN, lo que reduce la tasa de mutaciones. Esto se observó en voluntarios sometidos a RUV aguda, en los que el tratamiento con *P. leucotomos* por vía oral redujo la presencia de dímeros de pirimidinas en los queratinocitos (Middelkamp-Hup y col., 2004b). Por lo que el extracto, o bien previene de la formación de éstos dímeros, o facilita la actividad de los sistemas de reparación dicho daño.

Fotoprotectora

El efecto fotoprotector del *P. leucotomos* es, en parte, producto de la suma de las propiedades anteriormente descritas. Además, se ha observado que el *P. leucotomos* actúa mediante mecanismos de acción específicos, previniendo el fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis.

Los estudios que han demostrado la capacidad fotoprotectora del *P. leucotomos* se realizaron en cultivos celulares de queratinocitos o fibroblastos en los que se incluía *P. leucotomos* en el medio y en modelos animales a los que se les administraba el *P. leucotomos* por vía tópica u oral.

Protección frente a la inflamación y otras reacciones tempranas de la piel ante la RUV

Se demostró la capacidad del *P. leucotomos*, administrado por vía tópica, de retrasar la respuesta fototóxica, tanto en cobayas, aumentado la DEM más de 8 veces, como en humanos, ya que en algunos pacientes mostró protección hasta 10 veces la DEM (González y Pathak, 1996).

En humanos voluntarios sanos se demostró la capacidad del tratamiento con *P. leucotomos*, administrado tanto por vía tópica como por oral, de aumentar la dosis de radiación solar requerida para alcanzar la DEM, la pigmentación inmediata y la dosis fototóxica mínima. Los mejores resultados fueron observados en los individuos sometidos al tratamiento por vía oral respecto a aquellos a los que se les administró por vía tópica (González y col., 1997). El efecto fotoprotector también se observó en pacientes sometidos a tratamiento con psoralenos. Así pues, el *P. leucotomos*, por su acción antioxidante, disminuye los niveles de EROs y la peroxidación de membranas que inducen estos compuestos, reduciendo, por tanto, la respuesta inflamatoria.

En voluntarios sometidos a irradiación aguda con UVA, la administración conjunta de *P. leucotomos* oral y psoralenos retrasó la aparición de eritema y de edema en la piel, aumentando la DEM y la dosis fototóxica mínima. Además, redujo la hiperpigmentación a los 4 meses de la irradiación, en 4 de los 6 pacientes tratados (Middelkamp-Hup y col., 2004a).

Mejora de parámetros histológicos en piel

Se demostró a partir de estudios *in vivo* el mantenimiento de ciertas características histológicas de la piel. Entre ellas, la prevención del adelgazamiento de la piel y la disminución de la elastosis inducidas tras la exposición a UVR en los animales tratados con EPL, frente a los que no lo habían sido (González y Pathak, 1996; Alcaraz y col., 1999).

Se observó una mejora de la apariencia histológica de las biopsias tras el tratamiento con *P. leucotomos* por vía oral en voluntarios sometidos a RUV aguda, apreciándose menos desórdenes de maduración, microvesiculación y vacuolización de queratinocitos (Middelkamp-Hup y col., 2004a).

Polypodium leucotomos

El *P. leucotomos* favorece mantenimiento de la integridad estructural de la piel previendo de la degradación de la matriz extracelular (MEC) y la membrana basal mediante la inducción de la síntesis de colágeno y la regulación de una citocina denominada factor de crecimiento transformante (*transforming growth factor- β* , TGF- β) conduciendo a un descenso de actividad de las metaloproteinasas (MMPs) y a un aumento de la actividad de los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (*tissue inhibitors of matrix metalloproteinase*, TIMPs) (Philips y col., 2009a). Además, se observó la capacidad del *P. leucotomos* de reducir la activación de las proteínas del shock térmico (*heat shock proteins*, HSP) (Philips y col., 2009b).

Fotoinmunoprotección

Se ha descrito la capacidad de este helecho de inhibir la fotoisomerización del ácido trans-urocánico, por lo que el *Polypodium* sería capaz de prevenir la inmunosupresión inducida por la forma cis de este ácido (Capote y col., 2006).

En voluntarios sometidos a RUV, se observó que el tratamiento con *P. leucotomos* por vía oral previno la reducción del número y la pérdida de morfología de las células de Langerhans. Además, se redujo la infiltración de mastocitos en la dermis papilar (Middelkamp-Hup y col., 2004a).

Mantenimiento de la supervivencia y prevención de la apoptosis

En fibroblastos en cultivo sometidos a una dosis de UVA de 1J/cm², el tratamiento con EPL (extracto semisólido de PL) aumentó la tasa de supervivencia y de proliferación, en ambos casos, de manera dosis-dependiente. Asimismo, se observó que la capacidad de proliferación se mantenía significativamente superior a la del control en dosis de radiación de hasta 5J/cm² (Alonso-Lebrero y col., 2003).

No se observó ningún efecto del *P. leucotomos*, administrado por vía oral, sobre la proliferación de queratinocitos (células Ki-67⁺) tras irradiación aguda de la piel. Sin embargo, redujo significativamente la presencia de *sunburn cells* en el grupo tratado, respecto al control no tratado (Middelkamp-Hup y col., 2004a).

Protección frente al fotoenvejecimiento

La radiación UVA incrementa la expresión de la elastina de manera significativa en fibroblastos en cultivo, mientras que en queratinocitos el aumento no alcanza la significación estadística. Por su parte, la radiación UVB reduce dicha expresión en fibroblastos y la aumenta en queratinocitos en cultivo. El tratamiento con EPL disuelto en el medio de cultivo aumenta la expresión de elastina en ambos tipos celulares. Esto se observó a dosis de 0,1 y 1%, tanto en los cultivos de fibroblastos no irradiados como en los irradiados con UVA o UVB, y a dosis de 1% en los queratinocitos no irradiados e irradiados con UVA o UVB. De estos hechos se desprende que el EPL favorece la expresión de elastina tanto en ausencia, como en presencia de radiación UVA o UVB en ambos tipos celulares (Philips y col., 2003).

La expresión de MMP-1 (*matrix metaloproteinase 1*) se vio disminuida en queratinocitos cultivados con EPL al 0,1 y 1% no irradiados e irradiados tanto con UVA, como con UVB. En fibroblastos tratados pero no irradiados no se observaron cambios en la expresión de la proteína. En cambio, se observó la inhibición de dicha expresión en los tratados con EPL al 1% cuando son irradiados con UVA y en los tratados con EPL al 0,01, 0,1 y 1% cuando son irradiados con UVB (Philips y col., 2003).

Protección frente a la fotocarcinogénesis

Como hemos comentado anteriormente, se observó que el tratamiento con *P. leucotomos* vía oral reduce la presencia de dímeros de pirimidinas inducidos por la RUV en los queratinocitos (Middelkamp-Hup y col., 2004b). No se observaron diferencias significativas respecto a angiogénesis (células CD31⁺) (Middelkamp-Hup y col., 2004a).

7.5. Composición

Las propiedades de los extractos de los helechos del género *Polypodium* han de deberse a uno o varios de los compuestos que lo constituyen, si bien, cada especie puede presentar algún componente peculiar o mostrar proporciones características. Por otra parte, algunos de los extractos usados en medicina proceden de las partes aéreas de los helechos y otros de

Polypodium leucotomos

los rizomas. Con el fin de determinar su composición, varios autores trataron de purificar y determinar los componentes del extracto.

Vasänge determinó la presencia simultánea de cinco flavonoides en los extractos metanólicos de las hojas de las especies *P. decumanun* y *P. triseriale*, ambas procedentes de Honduras (Vasänge y col., 1997). Sin embargo, la presencia de estos compuestos en las plantas resultó ser muy baja, por lo que no podía explicar la actividad del extracto crudo de las mismas.

Se determinó la composición de los compuestos fenólicos de un extracto de EPL comercial obtenido a partir del EPL para facilitar su administración oral. El contenido total de fenoles de este producto es de 250mg/l. Mediante HPLC se pudieron diferenciar distintos fenoles en función del tiempo de retención (García y col., 2006). Además, se evaluó la capacidad antioxidante de varios de esos compuestos fenólicos, siendo los ácidos cafeico, clorogénico y ferúlico los principales componentes funcionales del extracto de *P. leucotomos* (Gombau y col., 2006).

La presencia de compuestos antioxidantes en los derivados del helecho no implica que estos sean los responsables de su acción, puesto que para que para que ejerzan su efecto, tras su administración oral, es necesario que dichos antioxidantes sean absorbidos y no sean inmediatamente catabolizados. Esto se estudió valorando la tasa de absorción de los cinco compuestos fenólicos presentes en el extracto de *P. leucotomos*. Todos ellos mostraron una buena capacidad antioxidante en la preservación de la oxidación del luminol por el H₂O₂. Además, se determinaron las tasas de absorción intestinal de los cinco compuestos mediante un sistema monocapa de células Caco-2, que oscilaron entre el 70 y el 100%. La absorción de dichos compuestos depende de un mecanismo de transporte activo saturable dependiente de concentración, siendo más efectiva la absorción a una dosis de 50µM que a 200µM. En cuanto al catabolismo de estos compuestos fenólicos, se observó que dos de ellos (los ácidos cumárico, ferúlico y vanílico) son catabolizados mediante reacciones de fase I y II, manteniéndose disponibles un periodo de tiempo significativo. Mientras que otros (ácidos clorogénico y cafeico) son inestables, por lo no pudo estudiarse su catabolismo por acción de enzimas celulares (Gombau y col., 2006).

Además de los compuestos fenólicos, en los derivados del *P. leucotomos* pueden presentarse otros compuestos bioactivos. Por ejemplo, se determinó la presencia de adenosina en el helecho, la cual se supone responsable de la acción inhibidora de la liberación de elastasa por los neutrófilos (Tuominen y col., 1992).

La capacidad del *P. leucotomos* de prevenir el cáncer de piel puede ser debida al conjunto de propiedades que presenta, así como al mantenimiento de la repuesta inmune (Siscovick y col., 2008).

7.6. Derivados del *P. leucotomos* usados en los experimentos de esta memoria

El EPL es un extracto obtenido a partir de las partes aéreas del *P. leucotomos* (García y col., 2006). En esta memoria se exponen cinco experimentos: en el primero se evaluó la capacidad antioxidante del EPL, en los tres siguientes se evaluaron diferentes parámetros relacionados con la capacidad antioxidante y fotoprotectora del EPL y, en el último, se administró a humanos voluntarios sanos cápsulas de EPL. Estos materiales fueron donados por Industrial Farmacéutica Cantabria.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Teniendo en cuenta que el *Polypodium leucotomos* tiene propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenas y fotoprotectoras, su administración oral debería ser capaz de prevenir o retrasar el daño causado por la RUV en la piel, manteniendo un buen estado de la defensa antioxidante sanguínea.

Objetivos

Para dilucidar si la hipótesis de trabajo es cierta, se propusieron los siguientes cinco objetivos:

1. Valorar la capacidad antioxidante del EPL mediante las técnicas ORAC y FRAP.
2. Evaluar la influencia de la administración oral del EPL en ratas *hairless* sometidas a RUV aguda, analizando los siguientes parámetros:
 - Los valores de actividad de enzimas implicados en la defensa frente a los radicales libres de oxígeno en eritrocitos y en fracción soluble de epidermis.
 - Los valores de otros parámetros relacionados con el estado oxidativo en eritrocitos, plasma y epidermis.
 - El número de células de Langerhans presentes en la epidermis.
3. Evaluar la influencia de la administración oral del EPL en ratones *hairless* sometidos a RUV crónica capaz de desencadenar tumores cutáneos, analizando los siguientes parámetros:
 - La supervivencia condicionada por la tumorogénesis.
 - El peso corporal.
 - Los valores de actividad de enzimas implicados en la defensa frente a los radicales libres de oxígeno en eritrocitos y fracción soluble de piel; así como los valores proteicos de algunos de esos enzimas presentes en la piel.

Hipótesis y Objetivos

- Los valores de otros parámetros relacionados con el estado oxidativo en piel, eritrocitos y plasma.
 - Parámetros histológicos de la piel:
 - El grosor de las distintas capas de la piel.
 - El número de células de Langerhans, de células p53⁺ y de células proliferantes en la epidermis.
 - La cantidad de vasos sanguíneos, glándulas sebáceas y mastocitos infiltrados en la dermis.
4. Evaluar la influencia de la administración por vía oral del EPL en ratones *hairless* sometidos a RUV aguda, analizando los siguientes parámetros:
- Los valores de actividad de enzimas implicados en la defensa frente a los radicales libres de oxígeno en eritrocitos y los valores proteicos de algunos de esos enzimas presentes en la piel.
 - Los valores de otros parámetros relacionados con el estado oxidativo en eritrocitos y plasma.
 - Valoración histológica de la piel de estos animales:
 - Cambios observables en los cortes histológicos.
 - El número de células p53⁺ y de células proliferantes en la epidermis.
5. Evaluar la influencia de la administración de las cápsulas de EPL en el estado de las defensas antioxidantes sanguíneas de humanos voluntarios sanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con los estudios que se incluyen en esta memoria tratamos de comprobar la capacidad fotoprotectora del *P. leucotomos* y su posible relación con sus propiedades antioxidantes, y también determinar la influencia del extracto del helecho sobre los parámetros sanguíneos bioquímicos relacionados con la defensa antioxidante. Para todo esto se diseñaron diferentes estudios unos *in vitro* y otros *in vivo*, tanto en modelos animales como en humanos.

Los estudios *in vitro* tenían por objetivo valorar la actividad antioxidante del EPL. En los estudios con modelos animales se pretendía valorar la capacidad fotoprotectora del EPL, por lo que los animales fueron sometidos a RUV según se concreta más adelante para cada caso. El estudio realizado en humanos trató de valorar posibles modificaciones en el sistema antioxidante sanguíneo debidas a la administración de las cápsulas de EPL.

En este apartado, inicialmente comentaremos algunos aspectos relativos al trabajo con modelos animales de experimentación y a su manipulación, que se practican de forma habitual en nuestro laboratorio y, en concreto, en los estudios que aquí se exponen. Luego se hace una descripción de cada uno de los estudios realizados. Posteriormente, se explican los procedimientos para la obtención y procesamiento de las muestras, los métodos llevados a cabo para las distintas determinaciones y el análisis estadístico de los valores obtenidos.

Los reactivos utilizados fueron de calidad analítica de casas comerciales suministradoras de productos de laboratorio (Panreac, Sigma-Aldrich, Merck, Probus y Fluka). En esta memoria sólo se especifican las referencias comerciales de aquellos compuestos que consideramos necesario detallar debido a que cambios de comercial o de referencia pudieran conllevar cambios en las valoraciones.

Para el procesamiento y determinación de las muestras se utilizaron los siguientes aparatos:

- Balanzas:
 - o AH-600 de Blauscall para medidas mayores de 6g.
 - o GR-200 de ANG para medidas inferiores a 6g.
 - o NK-2000B Petit Balance de Chyo para pesada de animales.
- Centrifugas:
 - o RT 6000D de Sorvall® para centrifugaciones a 4°C.

Consideraciones sobre el Trabajo con Modelos Animales de Experimentación

- RB3.11 de Jouan® para centrifugaciones a T^a ambiente.
- CIRCE 7 de Denver Instruments, para tubos de 1,5 y 0,5ml.
- Ultracentrífuga T-1045 de Centrikon, para centrifugaciones a 129000xg.
- Espectrofotómetros:
 - Lambda 2 de Perkin Elmer para lecturas en cubetas.
 - Cobas-Mira de Roche Diagnostics para lecturas automatizadas
 - Kinetic QCL™ de Bio-Whittaker para lecturas en placas multipocillo.
- Fluorímetros:
 - LS50 de Perkin Elmer para lecturas en cubetas.
 - Fluoroskan Ascent de Labsystems para lecturas en placas multipocillo.

1. CONSIDERACIONES SOBRE EL TRABAJO CON MODELOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Antes de exponer los diferentes diseños experimentales que se llevaron a cabo, se comentan algunas cuestiones comunes a los estudios realizados en modelos animales:

- Elección del modelo animal: el uso de modelos animales libres de pelo facilita el estudio del efecto de la RUV en la piel (de Gruijl y Forbes, 1995), ya que favorece la acción de la RUV en el tejido y la observación de efectos macroscópicos, sin necesidad de depilar o rasurar al animal. Por lo tanto, para los estudios de irradiación en modelos animales se optó por la elección de animales libres de pelo. Para el primer estudio, se eligieron ratas sin pelo de la línea NU (*hairless*) ICO:OFA-hr/hr y, para los posteriores estudios, ratones SKH1.
- Edad y sexo: los animales a su llegada contaban con 6 semanas de edad. El estudio en ratas se realizó con machos. El primer estudio realizado con ratones era un estudio a largo plazo, y se realizó con hembras puesto que la convivencia entre ellas presenta menos incidencias. El segundo estudio realizado con ratones se llevó a cabo en hembras para que fuese lo más parecido posible al anterior.
- Aclimatación: a pesar del certificado de ausencia de patógenos, a su llegada, para mayor seguridad y para su aclimatación, los animales se estabularon bajo condiciones de cuarentena durante una semana.
- Condiciones ambientales estandarizadas y controladas: desde su llegada, los animales estuvieron en el animalario de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira i Virgili. En dicho animalario, se mantienen las siguientes condiciones ambientales controladas: $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, $50\pm 10\%$ de humedad relativa y ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas de duración.
- Jaulas: las jaulas en las que se albergaron los animales eran del tipo homologado de 23x46cm de superficie x 14cm de altura (Makrolon[®]). En el fondo de las mismas se puso serrín y la limpieza de las jaulas se llevó a cabo dos veces por semana. El número de animales por jaula se determinó en función de la especie y del diseño experimental. Así pues, todos los animales enjaulados juntos pertenecían al mismo grupo de estudio.

Consideraciones sobre el Trabajo con Modelos Animales de Experimentación

- Alimentación: todos los animales fueron alimentados con pienso estándar para roedores presentado prensado en bolitas (Panlab rat chow, Panlab, Barcelona). Durante todo el tiempo en que se llevaron a cabo los estudios, a excepción de la víspera del sacrificio, los animales tuvieron acceso libre a la comida. Igualmente, tuvieron acceso libre a la bebida (agua o solución de EPL, según correspondía).
- Ayunas: la noche anterior al sacrificio, se mantuvieron los animales en ayunas, con libre acceso a agua de bebida y aislados del suelo para prevenir la posible ingestión de heces o serrín. Todo ello con el fin de evitar interferencias en los análisis y para favorecer la acción de la anestesia.
- Factores y grupos de estudio: en los estudios con animales se manejaban dos factores de influencia en los animales: la irradiación y el tratamiento, por lo se debía contar con los grupos controles de estos factores. Así, en cada estudio, los animales fueron asignados a uno de los siguientes cuatro grupos:
 - A. Control: no tratado y no irradiado.
 - B. Control de irradiación: no tratado e irradiado.
 - C. Control del tratamiento: tratado con EPL y no irradiado.
 - D. Problema: tratado con EPL e irradiado.

Las dosis de tratamiento y la energía de irradiación varió en cada estudio, por lo que estos aspectos se detallarán cuando se exponga el diseño experimental de cada estudio.

Para evitar posibles diferencias debidas al estrés por manipulación de los animales irradiados, los lotes no irradiados, fueron sometidos al mismo estrés de manipulación e irradiación, pero protegidos por una cubierta opaca.

Manipulación: Los animales fueron manipulados por personal cualificado. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Animal de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de Reus; protocolo nº 691 para el estudio realizado en ratas y el protocolo nº 3146 para los estudios realizados en ratones.

2. DISEÑOS EXPERIMENTALES

Estudio 1: actividad antioxidante del EPL

El objetivo de este estudio fue de determinar la capacidad antioxidante del EPL mediante los métodos ORAC y FRAP.

Material: extracto de *P. leucotomos* semisólido enviado periódicamente por Industrial Farmacéutica Cantabria.

Obtención de la fracción soluble:

- Muestras analizadas por el método ORAC: en primer lugar se realizó una dilución 1:2 del EPL en tampón fosfato potásico 75mM pH 7,4 y se mantuvo 1h en agitación. Tras la centrifugación a 1900xg y T^a ambiente durante 10min, se recogió el sobrenadante, a partir del cual se hicieron las diluciones analizadas.
- Muestras analizadas por el método FRAP: se hizo en primer lugar una dilución 1:2 del EPL en agua destilada y posteriormente se centrifugó en las mismas condiciones de antes y se recogió el sobrenadante, del cual se hicieron las distintas diluciones para el análisis.

Diluciones: de las diluciones analizadas por ambos métodos se escogieron aquellas comprendidas en la zona recta de las funciones de trabajo con el fin de determinar la expresión matemática que las define (área bajo la curva/concentración para el método ORAC y densidad óptica/concentración para el método FRAP). Las concentraciones escogidas para la determinación de la capacidad antioxidante por el método ORAC estaban comprendidas entre el 0,01 y el 0,5‰ de EPL en tampón fosfato potásico 75mM pH 7,4 y, para la determinación de la capacidad reductora por el método FRAP, entre el 0,75 y el 5‰ en H₂O.

Estudio 2: efecto de la administración oral del EPL en ratas sometidas a RUV aguda

Animales: para este estudio se usaron 20 ratas macho *hairless* suministradas por IFFA CREDO (Lyon, Francia). Inicialmente se asignaron 5 ratas a cada grupo de estudio.

Diseños Experimentales

Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9
EPL								
						RUV		Sacrificio

Esquema 1: esquema cronológico del tratamiento y la manipulación de los animales del estudio 2.

Tratamiento: se realizó durante 7 días seguidos:

- Grupos tratados: la dosis diaria de EPL fue de de 30mg/kg, el cual se administró por sonda gástrica a razón de 5ml/kg.
- Grupos no tratados: para someterlos al mismo estrés que los anteriores se les administró por sonda gástrica una solución al 5% de glucosa en agua a razón de 5ml/kg.

Irradiación:

- La irradiación se llevó a cabo con seis lámparas UVB (Philips TL 20W/12RS UV-B Medical, Luximport, Barcelona, España), que se utilizaron tras 30min de calentamiento. La razón UVB/UVA era de 0,9 y el espectro mostraba un pico a 312nm. La energía de radiación se midió con un radiómetro Solatell Sola-Scope I (Solatell, Croydon, Reino Unido). La distancia entre las lámparas y los animales fue de 20cm.
- Los animales de los grupos irradiados se sometieron a un total de $7J/cm^2$ de energía de irradiación en una única dosis, lo que equivale a 2 DEM. La DEM se conocía por estudios previos realizados por nuestro equipo en este modelo de experimentación. El tiempo total de exposición fue de aproximadamente 10min. Los animales fueron anestesiados previamente por vía intraperitoneal con una mezcla de ketamina (80mg/kg) y xilazina (10mg/Kg) a una relación volumen/peso de 5ml/kg.
- Los animales de los grupos no irradiados habían de ser sometidos al mismo estrés de manipulación que los irradiados, por lo que fueron anestesiados del mismo modo y sometidos al calor de las lámparas de luz UV, pero la radiación se bloqueo con una lámina opaca.

- Estos procedimientos tuvieron lugar el último día del tratamiento 60min después de la administración del mismo.

Sacrificio: se llevó a cabo 48h después de la irradiación. Los animales fueron anestesiados, del mismo modo que para la irradiación. Una vez sedados, se les depiló el dorso con cera templada para eliminar posibles pelos residuales, tras lo cual se sacrificaron por exsanguinación por punción en la aorta abdominal y posterior dislocación cervical para asegurar y acelerar la muerte.

Obtención de las muestras:

- Se extrajo el máximo de sangre de cada animal por punción de la aorta abdominal. La sangre se recogió en dos tubos, uno con heparina-Li y otro con EDTA-Na₂ para evitar la coagulación.
- Se diseccionó la piel del dorso del animal, la cual se troceó para favorecer la separación de la epidermis mediante la incubación en el tampón correspondiente.

Estudio 3: efecto de la administración oral del EPL en ratones sometidos a RUV crónica

Animales: el estudio crónico se realizó en 121 ratones *hairless* hembra de 6 semanas de edad, adquiridos en Charles River Laboratories (Barcelona, España). Los animales fueron divididos en los cuatro grupos de estudio, formado cada grupo por 30 animales, excepto el grupo control irradiado que estaba formado por 31 ratones. En la semana 46 del estudio se cedieron dos animales, uno del grupo control irradiado y otro del grupo problema a otro grupo de investigación y al final del estudio murió un ratón del grupo problema. Por lo que, al final del estudio quedaban 30 animales en el grupo control *Polypodium* y 29 animales en los demás grupos.

Irradiación:

- Fuente de irradiación: se utilizaron 8 tubos Philips® F40 UVB/UVA, que se utilizaron tras 30min de calentamiento. La distancia entre las lámparas y los animales fue de 20cm.
- El control de la intensidad de irradiación se midió con un radiómetro Solatell® Sola-Scope I (Solatell, Croydon, Reino Unido). Para la filtración de posible UVC se utilizó una lámina Kodacell (Kodak®).

Diseños Experimentales

- La primera irradiación se realizó cuando los animales contaban con 8 semanas de edad, a una intensidad de $20\text{mJ}/\text{cm}^2$. La dosis se duplicó cada semana hasta alcanzar los $640\text{mJ}/\text{cm}^2$ en la sexta semana de irradiación. Los animales se irradiaron cinco días a la semana, de lunes a viernes. Para la irradiación, los animales se colocaron en grupos de diez en una jaula sin techo, que se dividió en diez compartimentos con el fin de aislar a cada animal. La situación de cada animal cada uno de los días de irradiación se fue cambiando, para garantizar la distribución homogénea de la energía recibida. Los animales de los grupos "pseudoirradiados" se sometieron al mismo protocolo, pero en este caso la jaula se cubrió con una cartulina opaca que impedía el paso de los rayos UV.
- En una modificación del protocolo con el fin de acelerar el proceso carcinogénico, a la semana de vida 32 se subió la energía de irradiación a $1000\text{mJ}/\text{cm}^2$ durante una sesión. Puesto que al día siguiente no mostraban eritema, se subió la dosis a $1200\text{mJ}/\text{cm}^2$; debido a que los animales mostraron eritema a las 24h, se bajó la dosis a $1000\text{mJ}/\text{cm}^2$ durante tres sesiones más y como, no recuperaban el color normal se volvió a la dosis de $640\text{mJ}/\text{cm}^2$. En la semana 43 de vida de los animales se volvió a cambiar la dosis de irradiación para acelerar el proceso carcinogénico, en este caso se aumento la dosis a $800\text{mJ}/\text{cm}^2$, manteniéndose hasta el final del estudio.

Tratamiento con EPL:

- El EPL se administró a dosis diarias de $300\text{mg}/\text{kg}$ de peso disuelto en el agua de bebida. La mezcla fue preparada diariamente de lunes a jueves y los viernes se preparaba para todo el fin de semana. Para evitar la posible fotodegradación de la mezcla, los biberones se cubrieron con pintura oscura opaca.
- En una modificación del protocolo, en la semana 43 de vida de los animales (semana 35 de irradiación) se aumentó la dosis a $400\text{mg}/\text{kg}$ de peso, que se mantuvo hasta el final.

Criterio de sacrificio y punto final: partiendo del criterio que los animales irradiados debían desarrollar tumores inducidos por la RUV, el momento del sacrificio se determinó de forma dependiente de los grupos irradiados. Así, el criterio establecido para el sacrificio de los animales irradiados fue que presentasen al menos un tumor que alcanzase los 4mm de diámetro. En cuanto a los animales no irradiados, que previsiblemente no debían desarrollar

tumores, cada uno de ellos estaba previamente asociado a uno irradiado, y se sacrificó en el momento en que su correspondiente irradiado cumplía el criterio establecido.

Teniendo en cuenta que podía haber animales que tuviesen que ser sacrificados por motivos distintos al previsto (presencia de tumor que cumpliera los criterios), se estableció un criterio de punto final de tal manera que cualquier animal que sufriese un descenso del 10% de su peso en una semana o mostrase un comportamiento anómalo de estrés fuese sacrificado.

En el transcurso del estudio se observó que varios animales presentaron heridas en el lomo derivadas de la irradiación y, debido al crítico estado que alcanzaron, tuvieron que ser sacrificados por este motivo.

Sacrificio:

- Anestesia: con el fin de anestesiar a los animales, se les administró por vía intraperitoneal una solución combinada de ketamina (100mg/kg de peso) y xilazina (10mg/kg de peso) en PBS a razón de 10ml/kg de peso.
- Sacrificio: una vez anestesiados los animales, se procedió al sacrificio de los mismos mediante exsanguinación por punción cardíaca, lo cual permitió la obtención del mayor volumen de sangre posible para su posterior análisis. Esto también provocó la reducción del volumen de sangre presente en los tejidos periféricos, evitando así posibles interferencias que la sangre presente en la piel pudiese causar en las determinaciones que se realizaron posteriormente en este tejido. Tras la exsanguinación, los animales fueron sometidos a dislocación cervical para garantizar y acelerar su muerte.

Obtención de las muestras:

- Se extrajo el máximo de sangre de cada animal por punción cardíaca. La sangre se recogió con distintos anticoagulantes: 18 animales/grupo con heparina-Li y 12 animales/grupo con EDTA-Na₂.
- Se diseccionó la piel del dorso del animal, como explicaremos más adelante. Las muestras destinadas a la determinación de las células de Langerhans se seccionaron en cuadrados de 0,5cm de lado para favorecer la separación de la epidermis mediante la incubación en el tampón correspondiente.

Diseños Experimentales

Estudio 4: efecto de la administración oral del EPL en ratones sometidos a RUV aguda

Animales: este estudio se llevó a cabo en 58 hembras de ratón *hairless* de 6 semanas de edad, adquiridos en Charles River Laboratories (Barcelona, España).

- Estudio previo de la dosis eritemógena mínima: para lo cual se destinaron dos animales.
- Estudio anatomopatológico de la piel: 28 animales se distribuyeron en los cuatro grupos de estudio, enjaulándose juntos 7 animales del mismo grupo.
- Estudio bioquímico de sangre y western blot de epidermis: 28 animales se distribuyeron en los cuatro grupos de estudio, enjaulándose juntos 7 animales del mismo grupo.

Anestesia: los animales de estos estudios fueron anestesiados tanto para la irradiación como para el sacrificio a razón de 10ml/kg de peso de una solución combinada de ketamina (100mg/kg de peso) y xilazina (10mg/kg de peso) en PBS.

Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
EPL						
				RUV		Sacrificio

Esquema 2: esquema cronológico del tratamiento y la manipulación de los animales del estudio 4.

Cálculo de la dosis eritemógena mínima: el cálculo de la DEM se realizó en dos animales. Tras la anestesia, se les cubrió con un papel de plata en el que había seis ventanas circulares a través de las cuales se irradiaron seis zonas del dorso del animal, cada una a una intensidad. Se sometió a los animales a las dosis de irradiación siguientes: 0, 200, 400, 600, 800 y 1000mJ/cm². A partir de estos valores y sabiendo la intensidad de irradiación de las lámparas, se calcularon los tiempos a los que se debían exponer cada una de las ventanas, los cuales variaron entre 56s la menor dosis y 4min 40s la dosis mayor.

- Irradiación: la irradiación se llevó a cabo usando 8 tubos Philips® F40 UVB/UVA, que se utilizaron tras 30min de calentamiento. La distancia entre las lámparas y los animales fue de 20cm. El control de la intensidad de irradiación se midió con un

radiómetro Solatell® Sola –Scope I. Ambos grupos fueron sometidos a una única dosis de irradiación el día 5 de tratamiento, 48h antes del sacrificio.

- En el estudio anatomopatológico de la piel, los animales de los grupos irradiados se sometieron a una única dosis de irradiación de $400\text{mJ}/\text{cm}^2$, energía que equivale a 1DEM (1min 5s).
- En el estudio bioquímico de la sangre y western blot de la epidermis, los animales se sometieron a una única dosis de irradiación de $600\text{mJ}/\text{cm}^2$, energía equivalente a 1,5DEM (2min 45s).

Los animales de los grupos no irradiados fueron sometidos al mismo estrés de anestesia y manipulación que los grupos irradiados, pero mantenidos a la sombra.

Tratamiento: a los animales de los grupos tratados de ambos estudios se les administró el EPL disuelto en el agua de bebida a dosis de $300\text{mg}/\text{kg}$.

Sacrificio: los animales se anestesiaron como se explicó anteriormente, tras lo cual se sometieron a exsanguinación por punción cardiaca para la obtención de la sangre. Posteriormente se les practicó la dislocación cervical para asegurar la muerte y reducir el sufrimiento.

Obtención de las muestras: de los animales de ambos estudios se extrajeron la sangre y la piel

- la sangre, como se comentó en el apartado anterior, se realizó por exsanguinación mediante punción cardiaca. Todas las muestras de sangre fueron anticoaguladas con heparina-Li.
- La piel del dorso de cada animal se diseccionó una vez muerto el animal. La piel de los animales del estudio de anatomía patológica fueron sumergidas en formaldehído a 4% y la piel de los animales del estudio de western blot se seccionó en cuadrados de $0,5\text{cm}$ de lado y se sumergió en tampón de separación de epidermis para la obtención de ésta.

Estudio 5: efecto de la administración de cápsulas de EPL sobre la capacidad antioxidante de la sangre en humanos

Objetivo: la finalidad de este estudio era valorar el efecto de la administración oral de cápsulas de EPL sobre la capacidad antioxidante de la sangre en voluntarios humanos sanos, para lo cual se compararon parámetros sanguíneos relacionados con el estrés oxidativo antes y después de la administración del producto.

Voluntarios: 13 adultos voluntarios sanos, los cuales habían firmado el consentimiento informado. La muestra estaba formada por 6 hombres y 7 mujeres, de edades comprendidas entre los 21 y 61 años. Dos participantes, abandonaron el estudio: un hombre, debido a problemas en la obtención de la segunda extracción, y una mujer por alergia al colorante E110 presente en la cubierta de la cápsula que le provocó irritación gastrointestinal y diarrea. Por lo que, en el estudio se incluyeron los 11 participantes de los que se obtuvieron las dos muestras de sangre.

Producto: se administraron cápsulas de EPL de protección entérica a los voluntarios.

Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
1ª extracción							
EPL	EPL	EPL	EPL	EPL	EPL	EPL	EPL
2ª extracción							

Esquema 3: esquema cronológico de la administración de tratamiento con las cápsulas de EPL y de las tomas de muestras de sangre realizadas a los voluntarios del estudio 5.

Administración del producto: se realizó por vía oral, por la mañana en ayunas durante ocho días. La dosis administrada fue de 4 cápsulas/día.

Extracciones de sangre: cada voluntario fue sometido a dos extracciones de sangre, ambas en ayunas, de ellas se extrajeron 5ml en un tubo anticoagulado con heparina-Li y 5ml en un tubo anticoagulado con EDTA-Na₄, ambas extracciones se realizaron a la misma hora. La primera extracción tuvo lugar el día de comienzo del tratamiento justo antes de la administración del mismo y, la segunda, el último día del tratamiento, 2h después de la última dosis.

3. VALORACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES DEL ESTUDIO DE IRRADIACIÓN CRÓNICA

Medidas realizadas *in vivo*

Se midió un pliegue del dorso de los animales de los cuatro grupos, cuando los grupos irradiados llevaban 19 semanas siendo sometidos al efecto de las lámparas de RUV o, lo que es lo mismo, cuando contaban con 27 semanas de vida. Para llevar a cabo la medición, se inmovilizó al animal y se separó un pliegue de piel del dorso cuyo grosor se midió con un micrómetro (*Dial Thickness Gauge 7301*, Mitutoyo).

Debido a los tumores y heridas que presentaron los animales irradiados no fue posible la repetición de la medida en una edad más avanzada, cuando los animales hubiesen sufrido un mayor efecto de la irradiación.

También se midió el peso de los animales. Se realizaron medidas semanales del peso de cada uno de los animales para controlar si, debido al estrés de irradiación y/o manipulación, alguno de ellos sufría una disminución acusada del peso corporal. Además, se midió el peso en el momento del sacrificio, para evaluar posibles diferencias en el peso entre los cuatro grupos de estudios. Recordamos que los animales en el momento del sacrificio llevaban una noche en ayunas.

Análisis de la supervivencia

En el análisis de la supervivencia se compararon ambos grupos irradiados. La unidad de tiempo escogida para la medida fueron semanas, contando desde el nacimiento hasta el momento en que se decidió el sacrificio de cada uno de los animales irradiados, teniendo en cuenta si dicha decisión se realizó por el cumplimiento del criterio establecido o movido por algún otro motivo.

4. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

4.1. Procesamiento de las muestras de sangre

En los estudios realizados en humanos, ratas y ratones del estudio de irradiación crónica, para las extracciones de sangre se usaron dos tipos de anticoagulante: EDTA-Na₂ (sal disódica del ácido etildiaminotetraacético) y heparina-Li. En el caso de humanos y de ratas, de cada individuo se extrajo una muestra con cada uno de estos anticoagulantes. En el caso de ratones del estudio de irradiación crónica, de cada animal se extrajo una muestra con un anticoagulante: 12 animales/grupo con EDTA-Na₂ y 18 animales/grupo con heparina-Li.

En las muestras extraídas con EDTA-Na₂ se determinaron las actividades SOD, CAT, GR, GPx y la capacidad antioxidante por el método ORAC de plasma total y, en ratones, en plasma precipitado. Además, en humanos se determinó la capacidad antioxidante del plasma por el método FRAP.

En las muestras anticoaguladas con heparina-Li procedentes de ratas, humanos y de 12 animales/grupo del estudio crónico de ratones, fueron determinados los glutationes plasmáticos y eritrocitarios, la actividad GST y el porcentaje de hemólisis inducida por H₂O₂. La hemoglobina y el hematocrito se determinaron en las muestras anticoaguladas con heparina-Li en humanos y ratas y en todas las muestras de sangre de los ratones.

En 6 animales/grupo del estudio crónico en ratones, cuya sangre fue anticoagulada con heparina-Li, se determinó en la sangre total la hemoglobina y el hematocrito y en el plasma los glutationes. Estas valoraciones se recogen en esta memoria.

A los ratones del estudio de irradiación aguda se les extrajo sangre sólo con Heparina-Li. En estas sangres se determinó la hemoglobina, el hematocrito, los glutationes plasmáticos y eritrocitarios, la capacidad antioxidante del plasma nativo, y las actividades enzimáticas SOD, CAT, GST, GR y GPx.

4.1.1. Procesamiento de la sangre anticoagulada con EDTA-Na₂

Sangre total: en el estudio de irradiación crónica, a partir de la sangre total se determinó la hemoglobina y el hematocrito:

- Hemoglobina: 10µl de sangre de las muestras se diluyeron 1:250 en reactivo Drabkin.
- Hematocrito: se llenaron 2 capilares por muestra para la determinación del hematocrito de las mismas.

Separación de plasma y células: se separó el plasma de las células mediante centrifugación a 715xg durante 15min a 4°C. Después se recogió el plasma por un lado, se desecharon los leucocitos y se dejaron los eritrocitos en el mismo tubo para sus lavados.

Procesamiento de los eritrocitos:

- En primer lugar los eritrocitos se lavaron dos veces añadiéndoles el mismo volumen de suero fisiológico (solución de NaCl al 0,9%) y posteriormente se centrifugaron a 1120xg durante 5min a 4°C; desechando el sobrenadante. Los eritrocitos se mantuvieron en el tubo.
- Para preparar las muestras para la determinación de la actividad SOD:
 - o Hemólisis eritrocitaria: se hemolizaron 1:5 100µl de eritrocitos de las muestras procedentes de ratas y ratones y 500µl de eritrocitos de las muestras de humanos con H₂O fría. Tras esto, se sometieron las muestras procedentes de ratones a un ciclo de congelación-descongelación a -20°C y a dos ciclos en las muestras procedentes de humanos y en ratas.
 - o Extracción de la SOD: a los 500µl de la muestra procedente de ratones se les añadieron 800µl de una mezcla de etanol/cloroformo (6,25/3,75). En el caso de muestras procedentes de ratas y de humanos, se trabajó con 1ml del hemolizado al que se añadió 1,6ml de la mezcla etanol/cloroformo. Se agitó manualmente y se centrifugó a 1610xg 5min a 4°C. La actividad SOD eritrocitaria se determinó a partir de diluciones del sobrenadante, por lo que dicho sobrenadante se conservó a 4°C para la posterior determinación.

Obtención y Procesamiento de las Muestras

- Las determinaciones de las actividades CAT, GR y GPx eritrocitarias se realizaron a partir de un hemolizado de los eritrocitos en H₂O fría. En las muestras procedentes de ratas y ratones la hemólisis se realizó 1:10, obteniéndose un volumen final de 2ml de los eritrocitos de rata y 500µl de los eritrocitos de ratón. En muestras procedentes de humanos la hemólisis se realizó 1:20 alcanzando un volumen final de 5ml. Del hemolizado resultante se hicieron dos alícuotas:
 - o 50µl en el caso de muestras de ratones y 100µl en el caso de muestras de ratas y de humanos para la determinación de la CAT eritrocitaria.
 - o El resto, se destinó a la determinación de los enzimas eritrocitarios GR y GPx.

Procesamiento del plasma: a partir del plasma se obtuvieron distintas alícuotas para las determinaciones que se pretendían realizar.

- 10µl del plasma nativo se alicuotaron para la determinación de la capacidad antioxidante del plasma nativo por el método ORAC, conservándose a -20°C hasta su determinación.
- Para la determinación de la capacidad antioxidante del plasma libre de proteínas por el método ORAC, se incubaron 150µl de plasma nativo con 25µl de TCA al 70% durante 20min a 4°C (muestras procedentes de ratones) y 1ml de plasma con 176µl de TCA al 70% (muestras procedentes de ratas y de humanos). Después de la incubación se centrifugó la mezcla a 715xg, 10min a 4°C; tras lo cual se recogió el sobrenadante que se conservó a -20°C para la determinación.
- El plasma restante se conservó a -80°C.

4.1.2. Procesamiento de la sangre anticoagulada con Heparina-Li (excepto estudio de irradiación aguda en ratones)

En la sangre total se realizaron dos determinaciones:

- Hemoglobina: 20µl de sangre en muestras procedentes de ratas y de humanos y 10µl de sangre de muestras de ratones se diluyeron 1:250 en reactivo Drabkin.
- Hematocrito: se llenaron 2 capilares por muestra para la determinación del hematocrito de las mismas.

Separación de sangre y células: se separó el plasma de las células mediante centrifugación a 715xg durante 15min a 4°C. Tras lo cual se recogió el plasma por un lado, se desecharon los leucocitos, y se dejaron los eritrocitos en el mismo tubo para ser lavados.

Procesamiento de los eritrocitos:

- En primer lugar, los eritrocitos se lavaron dos veces añadiéndoles el mismo volumen de suero fisiológico (solución de NaCl al 0,9%) y posteriormente se centrifugaron a 1120xg durante 5min a 4°C. Después se desechó el sobrenadante y se mantuvieron los eritrocitos en el tubo.
- Para la determinación de la susceptibilidad de los eritrocitos a la hemólisis inducida por H₂O₂, se hizo una dilución previa de los eritrocitos en una solución isoosmótica (PBS, tampón fosfato sódico 10mM pH 6,25) para preservar su integridad antes del ensayo. Esta dilución fue 1:10 en las muestras de ratones y 1:20 en las muestras de ratas y de humanos; se obtuvo un volumen final de 1ml en muestras de ratones, 2,5ml en muestras de ratas y 5ml en muestras de humanos.
- Para las determinaciones de actividad GST, glutationes y TBARS (ensayo para la valoración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, *Thiobarbituric acid reactive substances assay*) eritrocitarios, se hemolizaron los eritrocitos en tampón fosfato sódico 10mM pH 6,25, siendo el factor de dilución de las muestras procedentes de ratones 1:10 partiendo de 200µl de eritrocitos. En las muestras procedentes de ratas y humanos, el factor de dilución de los eritrocitos fue de 1:20 a partir de 1ml de eritrocitos, obteniéndose un volumen de hemolizado de 20ml.
 - o Para la determinación de la GST eritrocitaria, se recogieron 250µl del hemolizado comentado anteriormente y se procedió a la eliminación de la hemoglobina presente en las muestras mediante la separación por afinidad con Sephadex CM50 (Pharmacia Biotech) compactado (20g/l) en el tampón fosfato sódico 10mM pH 6,25. Para llevar esto a cabo, se mezclaron a partes iguales hemolizado y Sephadex, partiendo de 250µl en muestras procedentes de ratones, 7ml en muestras procedentes de rata y 5ml en muestras procedentes de humanos. Las mezclas se agitaron manualmente durante 3min, se centrifugaron a 1120xg 10min a 4°C. A continuación se recogió el sobrenadante para la correspondiente determinación.

Obtención y Procesamiento de las Muestras

- o La determinación de los glutaciones eritrocitarios se realizó en hemolizado libre de proteínas. Estas muestras se precipitaron con TCA al 70%. En el caso de las muestras procedentes de ratones se añadieron 265µl del TCA a 1,5ml del hemolizado 1:10, en las de ratas 880µl de TCA a 5ml del hemolizado 1:20 y en las de humanos 530µl de TCA a 3ml del hemolizado 1:20. Estas mezclas fueron incubadas 20min a 4°C y posteriormente se centrifugaron a 715xg durante 10min a 4°C. Tras lo cual se recogió el sobrenadante que se almacenó a -20°C hasta el momento de la determinación del contenido de glutaciones eritrocitarios de todas la muestras y de TBARS eritrocitarios en las muestras de humanos.

Procesamiento del plasma:

- Para determinar el contenido de glutaciones plasmáticos, se eliminaron las proteínas del plasma. Para ello se incubó el hemolizado con TCA al 70% durante 20min a 4°C. A 300µl de cada hemolizado procedente de ratón se le añadió 45µl de TCA, a 2ml de muestra procedente de rata se le añadieron 352µl de TCA y a 1ml de muestra procedente de humanos se le añadió 176µl de TCA. Tras la incubación se centrifugó la mezcla a 715xg durante 10min a 4°C; después se recogió el sobrenadante que se conservó a -20°C hasta el momento de las determinaciones de glutaciones.
- El plasma restante se almacenó congelado a -80°C.

4.1.3. Procesamiento de la sangre anticoagulada con Heparina-Li en el estudio de irradiación aguda en ratones

Todas las muestras de sangre de los ratones del estudio de irradiación aguda (estudio 4) fueron extraídas con heparina-Li. En la sangre total se determinaron la hemoglobina y hematocrito como en los casos anteriores. La separación del plasma y de los eritrocitos, así como el lavado de eritrocitos, se realizaron del mismo modo que en los procedimientos anteriores.

Procesamiento de los eritrocitos: tras el doble lavado se hicieron distintos procesos en función de las determinaciones que se pretendieron realizar:

- 100µl se hemolizaron con 900µl de tampón fosfato sódico 10mM pH 6,25 para las determinaciones de los glutationes y la GST eritrocitarios.
 - o 250µl del hemolizado anterior se mezclaron con un volumen igual de Sephadex y, tras agitar manualmente 3min, se centrifugó a 1120xg durante 10min a 4°C. El sobrenadante se recogió para, a continuación, llevar a cabo la determinación de la GST eritrocitaria.
 - o Se precipitaron las proteínas de 750µl del hemolizado 1:10 en H₂O con 132,5µl de TCA al 70%. Después de incubar la mezcla 2min a 4°C se centrifugó a 715xg durante 10min. El sobrenadante se recogió y se conservó a 4°C hasta el momento de la determinación de los glutationes eritrocitarios.
- 100µl se hemolizaron con 400µl de H₂O fría. Tras un ciclo de congelación/descongelación, se le añadieron 800µl de la mezcla etanol/cloroformo (6,25/3,75). Se agitó manualmente 3min y se centrifugó a 1610xg durante 5min a 4°C. El sobrenadante se recogió y se conservó a 4°C para la posterior determinación de la actividad SOD.
- 50µl de eritrocitos se diluyeron 1:10 con H₂O fría. De los 500µl resultantes, se hicieron las siguientes alícuotas que se conservaron a -20°C hasta el momento de realizar cada determinación:
 - o 50µl para la determinación de la actividad CAT.
 - o 20µl que se diluyeron 1:8 con 140µl de tampón fosfato sódico 10mM pH 6,25 para la determinación de la actividad GR.
 - o 15µl que se diluyeron 1:10 con 135µl de tampón fosfato sódico 10mM pH 6,25 para la determinación de la actividad GPx.

Procesamiento del plasma:

- 10µl para la determinación de la capacidad antioxidante del mismo por el método ORAC.
- 250µl para la determinación de los glutationes plasmáticos, a los cuales se les eliminaron las proteínas por precipitación con 45µl de TCA. La mezcla se incubó 20min a 4°C y, posteriormente se centrifugó a 715xg 10min. El sobrenadante se recogió y se conservó a 4°C hasta el momento de la determinación.

Obtención y Procesamiento de las Muestras

4.2. Procesamiento de las muestras de piel

4.2.1. Muestras de piel del estudio realizado en ratas

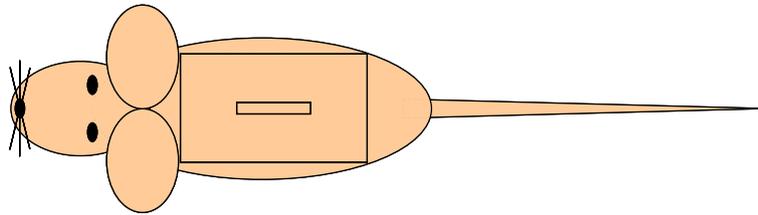


Figura 6: esquema de la piel dorsal de las ratas del estudio 2, en cuya epidermis se determinaron los parámetros bioquímicos; la piel del rectángulo central se destinó a la determinación del número de células de Langerhans.

Una vez sacrificados los animales, se depiló el dorso con cera templada ya que, a pesar de ser una cepa libre de pelo, presenta algunos pelos residuales. Posteriormente se diseccionó la piel de toda la zona dorsal.

La piel de la línea media fue destinada a la determinación de las células de Langerhans, para lo cual se cortó en porciones de 5mm de lado y se sumergió en tampón de separación de la epidermis durante 1h a 37°C. Transcurrido este tiempo se separó la epidermis con ayuda de unas pinzas y se colocó en las placas de Petri, donde se llevó a cabo la tinción de las células de Langerhans como se expondrá más adelante en el apartado de métodos.

El resto de la piel se destinó a la determinación de parámetros relacionados con el estrés oxidativo en la epidermis. Para ello se separó ésta de la dermis sumergiendo porciones de 7mm de lado en tampón de separación de la epidermis durante 2h a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación se separó la epidermis con ayuda de unas pinzas y se le añadieron 9 volúmenes de tampón de fosfato sódico 200mM pH 6,25 para llevar a cabo la homogenización con un émbolo de teflón Polytron®. Ésta se realizó en cinco intervalos de 30s, descansando entre dichos intervalos y manteniendo los viales de homogenización sobre hielo para evitar el posible recalentamiento de la muestra.

La mezcla se centrifugó a 129000xg 4°C durante 1h en la ultracentrífuga. A continuación se recogió el sobrenadante del que se hicieron las siguientes alícuotas para las

determinaciones correspondientes: 50µl para las proteínas, 350µl para la actividad SOD, 100µl para la actividad CAT, 600µl para la actividad GST, 300µl para las actividades GR y GPx, 400µl para los glutationes. Estas alícuotas se guardaron a -20°C hasta el momento en que se llevó a cabo la determinación correspondiente, excepto para la actividad GST que se realizó el mismo día del sacrificio. Asimismo, la alícuota destinada a la determinación de los niveles de glutationes requirió un procesado previo para la precipitación de proteínas; por ese motivo se incubaron 20min a 4°C con 70,4µl de TCA al 70% y se centrifugaron 10min a 715 xg y 4°C. El sobrenadante se recuperó y se conservó a -20°C hasta el momento del análisis.

4.2.2. Muestras de piel del estudio realizado en ratones para la valoración de la irradiación crónica

Una vez sacrificados los animales, se diseccionó la piel dorsal, la cual se dividió en varias secciones en función de las determinaciones que se pretendían realizar. El esquema diseñado para esto se muestra en la figura 7. La zona más afectada por la radiación, donde se localizaban los mayores efectos, era el área central del dorso. De esa área se tomaba una pieza de 2cm de largo por 1 de ancho para la determinación de parámetros histológicos y anatomopatológicos (1') y dos de 1x1cm para genómica (2'). Las áreas adyacentes a éstas se tomaron como control no dañado del mismo animal (números 1 y 2 de la figura 7). De la zona caudal se sacaron otras dos piezas de 1x1cm (números 3 de la figura 7), destinadas a realizar distintos tipos de análisis. La adjudicación de cada animal a un determinado tipo de estudio, para esa zona de piel, se hizo de forma aleatoria y "a priori" según el número de identificación del animal. De cada grupo, 12 animales fueron destinados a la medida de la actividad enzimática, contenido de glutationes y actividad antioxidante; las muestras de otros 6 animales fueron congeladas para western blot; la de otros 6 animales se congelaron para el análisis de ARNm y, por último, de 5 animales de cada lote se obtuvo muestras de piel para la cuantificación de las células de Langerhans. Las muestras de piel destinadas a las determinaciones de genómica y ARN aún no se analizaron, por lo que estos estudios no están incluidos en esta memoria.

Obtención y Procesamiento de las Muestras

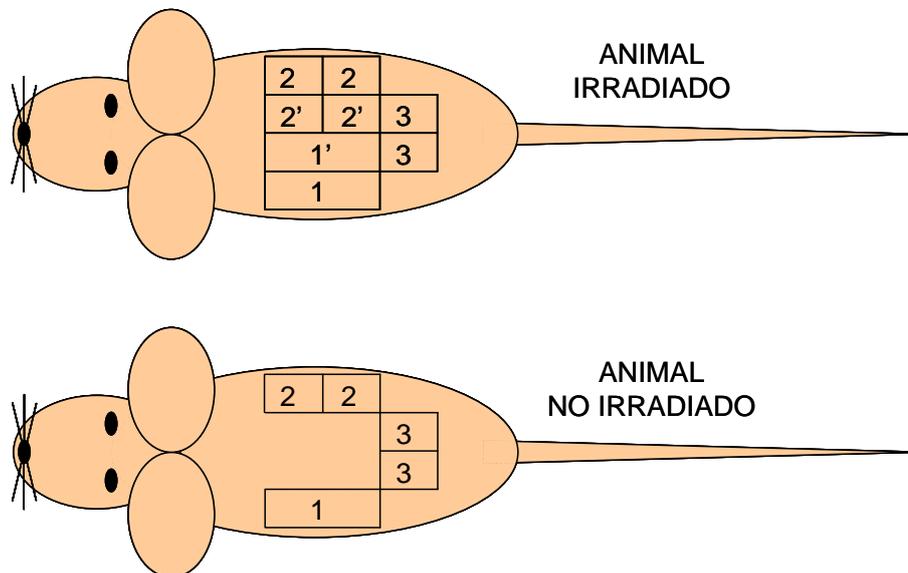


Figura 7: representación de la piel dorsal de los animales del estudio crónico, en la cual se identifican las distintas zonas que fueron separadas para posteriores análisis. Zonas 1: destinadas a preparaciones de histología; zona 2: destinadas a determinaciones de genómica; zonas 3: destinadas a las determinaciones bioquímicas, western blot, ARNm o células de Langerhans. El subíndice prima (') indica las muestras que sólo se tomaron en los animales irradiados.

De los animales no irradiados se tomaron muestras de las mismas zonas que de los irradiados, exceptuando las de la línea media dorsal, ya que no es comparable con las mismas zonas de los animales irradiados.

Las muestras reservadas para el estudio histológico y anatomopatológico fueron sumergidas en formaldehído al 4% durante 24h en un vial de plástico. Trascorrido este tiempo, se cambió el formaldehído por etanol al 70% y fueron enviadas al Hospital Clínico de Barcelona para su inclusión en bloques de parafina.

El mismo día del sacrificio se procesaron aquellas zonas de piel destinadas a las siguientes determinaciones bioquímicas: los niveles de proteínas, glutatones, actividad enzimática y actividad ORAC; así como las secciones de piel en las que se cuantificaron las células de Langerhans.

Muestras destinadas a la valoración de parámetros bioquímicos: en primer lugar se homogenizaron las pieles 1:10 (P:V) en un tampón fosfato sódico (200mM, pH 6,25) en el homogenizador de cuchillas Polytron®, en cinco intervalos de 30s, descansando entre dichos

intervalos. Los viales de homogenización se mantuvieron todo momento sobre hielo para evitar el posible recalentamiento de la muestra. La mezcla se centrifugó a $129000 \times g$ 4°C durante 1h en la ultracentrífuga. A continuación se recogió el sobrenadante, que se alicuotó de la siguiente manera para facilitar las determinaciones bioquímicas posteriores: $30\mu\text{l}$ para la determinación de proteínas, $250\mu\text{l}$ para la actividad SOD, $150\mu\text{l}$ para la actividad CAT, $80\mu\text{l}$ para la actividad GST, $100\mu\text{l}$ para las actividades GR y GPx, $200\mu\text{l}$ para la determinación del contenido de glutationes, $50\mu\text{l}$ para las determinaciones de la capacidad antioxidante por el método ORAC y $100\mu\text{l}$ más para la determinación de la capacidad antioxidante por el método ORAC pero de muestra libre de proteínas. Las alicuotas se almacenaron a -20°C hasta el momento de la determinación correspondiente a excepción de la GST y las alicuotas destinadas a la determinación del contenido de glutationes y la capacidad ORAC de la muestra libre de proteínas. Así pues, la determinación de la actividad GST se realizó el mismo día del sacrificio. Con respecto a las valoraciones del contenido de glutationes y la capacidad ORAC de las muestras libres de proteínas, antes de congelar las alicuotas correspondientes para su almacenamiento, y con el fin de precipitar las proteínas presentes en las muestras, se incubó 20min a 4°C con $35\mu\text{l}$ de TCA al 70% en el caso de la alicuota de los glutationes y con $17,5\mu\text{l}$ en el caso del ORAC libre de proteínas. Posteriormente se centrifugó a $715 \times g$ durante 10min a 4°C . Se recogieron los sobrenadantes y se conservaron a -20°C hasta el momento de la determinación.

Las muestras destinadas a las determinaciones de western blot, ARNm y genómica se sumergieron durante 10s en N_2 líquido y seguidamente se congelaron a -80°C .

Las muestras de western blot fueron homogenizadas en una dilución 1:5 (P:V) en tampón fosfato sódico 100mM, pH 7; en el cual se había disuelto una pastilla del cóctel inhibidor de proteasas (*Complete Protease Inhibitor Coctail de Roche*) por cada 7ml de tampón. La homogenización se llevó a cabo en el homogenizador de cuchillas Polytron®, en cinco intervalos de 30s, descansando entre dichos intervalos y manteniendo los viales de homogenización sobre hielo para evitar el posible recalentamiento de la muestra. La mezcla se centrifugó a $129000 \times g$ 4°C durante 1h en la ultracentrífuga (T-1045 de Centrikon). Se alicuotó el sobrenadante en un vial para su almacenamiento, del cual $100\mu\text{l}$ se diluyeron 1:5 en tampón fosfato sódico 100mM pH 7 (dilución final 1:25) y, tras medir la proteína presente, se alicuotaron varios viales por muestra con un volumen equivalente a $5\mu\text{g}$ de proteína. Todas las alicuotas se conservaron a -80°C hasta el día de la determinación.

Obtención y Procesamiento de las Muestras

4.2.3. Muestras de piel del estudio realizado en ratones para la valoración de la irradiación aguda

Como se ha explicado en el diseño experimental del estudio de irradiación aguda en ratones, además de los animales en los que se cálculo la DEM, se trabajó con dos lotes de animales. En el primero, los grupos irradiados fueron sometidos a una dosis de irradiación de 400m^2 (1 DEM). De ellos se extrajo la piel del dorso para el estudio histológico y anatomopatológico, para lo cual se incluyeron las secciones de piel en formaldehído al 4% y se enviaron para su inclusión en parafina al Hospital Universitario de Guadalajara. Posteriormente, cortes de estas muestras fueron teñidos mediante las técnicas de hematoxilina-eosina y Orceína de Shikata, en el mismo hospital de Guadalajara, y mediante inmunohistoquímica frente a los antígenos p53 y PCNA en la Universidad Autónoma de Madrid. En el segundo lote de animales, cuyos grupos irradiados fueron sometidos a una dosis de irradiación de $600\text{mJ}/\text{cm}^2$ (1,5 DEM), se extrajo la piel del dorso, de la cual se separó la epidermis para realizar en ella las determinaciones de western blot. La separación de la epidermis de estos animales se realizó del mismo modo que en el estudio de parámetros bioquímicos de los ratones del estudio crónico, y la homogenización de muestra, a pesar de ser epidermis y no piel entera, se procesó igual que en el estudio de western blot de los animales del estudio crónico.

5. MÉTODOS

5.1. Métodos de Determinación de Parámetros Relacionados con el Estado Oxidativo de las Muestras

5.1.1. Métodos para la determinación de parámetros bioquímicos enzimáticos

5.1.1.1. Valoración de la actividades enzimáticas

Valoración de la actividad superóxido dismutasa (SOD)

Método: la actividad SOD se determinó por el método de Misra y Fridovich (Misra y Fridovich, 1972). Esta técnica se basa en la oxidación que sufre la epinefrina por los aniones O_2^- que ella misma genera al encontrarse en un medio básico; como producto de la oxidación de la epinefrina se obtiene adrenocromo, molécula que presenta un máximo de absorbancia a 480nm. La presencia de SOD en el medio transforma los aniones O_2^- en H_2O_2 , evitando la oxidación de la epinefrina y, por tanto, inhibiendo la formación de adrenocromo. La capacidad de la muestra de inhibir la formación de adrenocromo permite estimar la actividad de la SOD presente en ella.

Muestras:

- Eritrocitos: se partió del sobrenadante resultante de la centrifugación de la extracción de la SOD mediante la mezcla de cloroformo y etanol. Se hicieron una serie de diluciones de la muestra en agua, de tal manera que en cada cubeta de reacción se añadió un volumen de 300 μ l de las diluciones 1:12,5, 1:16,667, 1:25, 1:50 y 1:100 en un volumen final de 3ml.
- Piel o epidermis: se añadieron directamente a las cubetas diferentes volúmenes de la fracción soluble del tejido a las cubetas de la batería de lecturas de cada muestra, concretamente 10, 30, 50, 60 y 80 μ l, y se enrasó con H_2O hasta alcanzar un volumen de 300 μ l.

Método:

- Máxima formación de adrenocromo: en cada batería de cubetas de una muestra había una en la que además del tampón se añadan los 200 μ l de la solución de

Métodos

epinefrina disuelta en HCl 1mM, pero en lugar de muestra, se le añadieron 300µl de H₂O. Al no haber muestra, no habría actividad SOD, por lo que toda la epinefrina presente en ella se transformó en adrenocromo, esto permitió determinar las capacidad de inhibición de la formación de adrenocromo de las diluciones de cada una de las muestras.

- Diluciones de las muestras: en cada cubeta se pusieron 2,5ml del tampón, los 300µl de cada una de las diluciones del hemolizado en la determinación eritrocitaria o la suma del volumen de fracción soluble y H₂O en las determinaciones de piel o epidermis; y, justo antes de la lectura, 200µl de la solución de epinefrina disuelta en HCl 1mM.
- Muestras: para cada muestra se dispuso de seis cubetas, en las que se disponen 2,5ml de tampón carbonato sódico 50mM/EDTA-Na₂ 0,1mM, pH 10,2 y los 300µl de H₂O o de la dilución de la muestra correspondiente.
- El blanco de la reacción contiene el mismo volumen del tampón, 300µl de H₂O en lugar de la muestra y 200µl de HCl 1mM en lugar de la solución de epinefrina.

Lectura: a partir de la adición de la solución de epinefrina se realizaron lecturas cada 40s durante 10min, por espectrofotometría a 480nm,

Cálculos: se representaron los valores de absorbancia en función del tiempo de cada una de las cubetas y se calculó la pendiente de la zona de incremento lineal. Se determinó el porcentaje de incremento de cada una de las diluciones de la muestra respecto al incremento que se produjo en la cubeta control de la formación máxima de adrenocromo. Se realizó un gráfico con cada uno de los puntos de la muestra en el que se representó el % de formación de adrenocromo frente a hemoglobina, en el caso de la determinación eritrocitaria, o de la proteína soluble, en el caso de la piel y la epidermis; y se establecieron las funciones lineal y exponencial a las que mejor se ajustan los puntos, escogiéndose entre las dos la que presentaba el coeficiente de correlación más alto. A partir de la ecuación de la función escogida, se calculó el valor de hemoglobina o de proteína soluble capaz de inhibir el 50% de la formación de adrenocromo.

Expresión de resultados: se definió la unidad enzimática de SOD como el valor de hemoglobina o proteína soluble de una muestra capaz de inhibir el 50% de la formación de adrenocromo. Este valor se hubo de referir a la unidad de hemoglobina, en el caso de los valores eritrocitarios, o a la unidad de proteína o de tejido, en las valoraciones de piel y epidermis.

Valoración de la actividad catalasa (CAT)

Método: la actividad CAT se determinó por el método de Cohen (Cohen y col., 1970), basado en la medida de la extinción de la absorbancia a 420nm de una solución de H₂O₂ inducida por cierto volumen de muestra durante en función del tiempo. Esto nos permitió determinar las unidades de CAT (µmoles transformados por minuto) presentes en la muestra, por lo que hubo de referir el valor de actividad enzimática a la cantidad de proteína o hemoglobina presente en cada muestra.

Muestras:

- Muestras eritrocitarias: las determinaciones se llevaron a cabo en diluciones de los eritrocitos 1:100, por lo que fue necesario realizar diluciones previas:
 - o Humanos: partiendo del hemolizado 1:20 de eritrocitos en H₂O y se realizó una dilución más 1:5 también en H₂O.
 - o Ratas y ratones: a partir del hemolizado 1:10 de eritrocitos en H₂O, se realizó otra dilución 1:10 en tampón fosfato potásico 100mM pH 7,5, por lo que la dilución final de los eritrocitos fue 1:100.
- Muestras de piel o epidermis: se partió de la fracción soluble de piel o epidermis 1:10 tampón fosfato sódico 200mM pH 6,25 y se realizó una dilución 1:4 en el mismo tampón; por lo que las determinaciones se llevaron a cabo a partir de una dilución 1:40 de la fracción soluble del tejido.

Reacción: se realizó en cubetas de cuarzo debido a que el plástico absorbe luz a la longitud de onda de lectura (240nm):

- Muestras eritrocitarias: se pusieron 20µl de la muestra correspondiente y 2,980ml de la solución 17mM de H₂O₂ en tampón fosfato potásico 100mM pH 7,5; tomando como blanco el valor de absorbancia del tampón fosfato potásico 100mM pH 7,5.
- Valoraciones de piel y epidermis: se pusieron 166,67µl de la muestra correspondiente y 833,33µl de la solución 23,29mM de H₂O₂ en tampón fosfato potásico 100mM pH 7,5, tomando como blanco el valor de absorbancia del tampón fosfato potásico 100mM pH 7,5.

Lectura: se realizaron dos medidas por espectrofotometría 240nm: la primera en el momento de añadir la muestra y, la segunda, a los 30s de reacción.

Cálculos: se calculó el decremento de absorbancia entre ambos tiempos y se transformó este valor en unidades enzimáticas en función del valor de extinción molar del H₂O₂ (40M⁻¹cm⁻¹).

Métodos

Expresión de resultados: se definió la unidad de actividad CAT como los μmoles de H_2O_2 transformados por minuto y se expresó en referencia a la hemoglobina o proteína soluble presente en las muestras eritrocitarias y de piel o epidermis respectivamente.

Valoración de la actividad glutatión S-transferasa (GST)

Método: la actividad GST fue determinada por el método de Habig (Habig y col., 1974) basado en la medida de la absorbancia a 340nm del conjugado formado por el glutatión y el 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por acción del enzima GST.

Muestras:

- Muestras eritrocitarias: se partió del sobrenadante libre de hemoglobina de los eritrocitos hemolizados 1:20 en muestras de ratas y de humanos y 1:10 en muestras de ratón en tampón fosfato sódico 10mM pH 6,25. En las muestras de ratas y humanos se incubaron 2ml del hemolizado durante 25min a 4°C para la determinación de la GST total y 3ml del hemolizado a 52°C también durante 25min para la determinación de la GST termoestable.
- Muestras de piel de rata y epidermis de ratón: se probó directamente la fracción soluble de epidermis (1:10) o de piel (1:10).

Reacción:

- Muestras eritrocitarias humanas y de rata: además del blanco de la reacción se hicieron tres medidas: la actividad GST total a partir de la fracción de la muestra que no había sido calentada; la GST termoestable, a partir de la fracción de muestra que había sido incubada 25min a 52°C, y la formación espontánea del conjugado. Antes de añadir el CDNB se incubó el resto de la mezcla 5min a T^a ambiente.
 - o Como blanco se hicieron reaccionar 100 μl de GSH 30mM con 100 μl de etanol en 2,8ml de tampón fosfato sódico 10mM pH 6,25.
 - o La reacción espontánea: 100 μl de GSH 30mM, 100 μl de CDNB 30mM en disuelto en etanol y 2,8ml de tampón fosfato sódico 10mM pH 6,25.
 - o GST total: 0,5ml del hemolizado conservado a 4°C con 100 μl de GSH 30mM 100 μl de CDNB 30mM disuelto en etanol, completando los 3ml con tampón fosfato sódico 10mM pH 6,25.

- GST termoestable: 1ml del hemolizado incubado a 52°C durante 25min con 100µl de GSH 30mM y 100µl de CDNB 30mM disuelto en etanol, completando los 3ml con tampón fosfato sódico 10mM pH 6,25.
- Epidermis de rata: a 2,5ml de tampón fosfato sódico 10mM pH 6,25 se le añadieron 300µl de la fracción soluble de epidermis y 100µl de una dilución de GSH 60mM, tras incubar la mezcla 5min a T^a ambiente se añadieron 100µl del CDNB 30mM y se leyó la absorbancia.
- Sangre y fracción soluble de piel de ratón: en ratones únicamente se midió la GST total. Se llevó a cabo en el espectrofotómetro automatizado. Se hicieron reaccionar 20µl de la muestra con 245µl de CDNB 1,2mM y, tras 25s, con 20µl de GSH 15mM.

Lectura: todas las muestras se leyeron por espectrofotometría a 340nm durante 5min.

Cálculos:

- De las muestras leídas en el espectrofotómetro Lambda 3 de Perkin Elmer, se calculó la pendiente de la formación del conjugado. A los valores de la GST eritrocitaria total y termoestable y la GST de epidermis de rata se les restó el valor del blanco y la formación espontánea de conjugado. Se transformaron los valores de incremento de absorbancia en unidades enzimáticas en función del coeficiente de extinción molar del CDNB ($9,6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).
- Muestras leídas en el espectrofotómetro automatizado: la lectura de salida expresaba los valores de actividad en incremento de absorbancia/unidad de tiempo; se transformaron en unidades enzimáticas en mediante el valor de extinción molar del CDNB.
- En todos los casos, para una correcta expresión de los resultados, se tuvieron en cuenta las diluciones realizadas de las muestras.

Expresión de los resultados: la actividad GST se expresó en unidades enzimáticas, es decir, µmoles de sustrato transformados por minuto, por unidad de hemoglobina, proteína o tejido correspondiente.

Métodos

Valoración de la actividad glutatión reductasa (GR)

Método: la actividad GR se determinó por el método descrito por Wheeler (Wheeler y col., 1990) basado en la capacidad de este enzima de reducir el GSSG a expensas de la oxidación del NADPH, molécula que permite la valoración de su consumo, al presentar un máximo de absorción a 340nm.

Muestras:

- Muestras eritrocitarias: se partió de un hemolizado de eritrocitos en H₂O siendo el factor de dilución 1:20 en los eritrocitos humanos y 1:10 en los de rata y ratón. El hemolizado de ratón se diluyó 1:8 con tampón fosfato potásico 250mM/EDTA-Na₂ 2mM pH 7,0.
- Muestras de epidermis: se usó directamente, sin diluir, la fracción soluble de epidermis del homogenizado 1:10.
- Muestras de piel: se partió de la fracción soluble de piel 1:10 y se diluyó 1:5 en tampón fosfato potásico 250mM/EDTA-Na₂ 2mM pH 7,0.

Reacción:

- Muestras humanas y de rata: se mezclaron en la cubeta 2,75ml del tampón fosfato potásico 100mM/EDTA 0,5mM pH 7,5, 120µl del hemolizado 1:20 y 100µl de la solución GSSG 75mM. La mezcla se dejó incubar 5min a T^a ambiente, tras los cuales se añadieron 30µl de la solución 20mM de NADPH e inmediatamente se leyó.
- Muestras de ratón: se mezclaron en la cubeta 356µl del tampón de reacción de GR, 20µl GSSG 20mM, 20µl de NADPH 2mM y, en último lugar, 4µl de muestra.

Lectura:

- Muestras humanas y de rata: se leyeron las muestras en el espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2 a 340nm, cada 30s durante 5min.
- Muestras de ratón: se leyeron las absorbancias en el espectrofotómetro automatizado cada 25s durante 10min. El aparato nos muestra el resultado en U/l, ya que calcula el incremento de absorbancia de las lecturas en unidades enzimáticas.

Cálculos:

- Muestras humanas y de rata: los cambios de la absorbancia en el tiempo reflejaron el soluto transformado en ese tiempo lo que nos permitió calcular directamente la actividad del enzima.

- Muestras de ratón: se transformaron las unidades proporcionadas por el espectrofotómetro automatizado en función de la hemoglobina o de la proteína soluble presente en las muestras.

Expresión de resultados: la actividad GR se expresó como unidades enzimáticas, es decir, μ moles de sustrato transformados por minuto, por unidad de hemoglobina, proteína o tejido correspondiente.

Valoración de la actividad glutatión peroxidasa (GPx)

Método: la determinación de la actividad GPx se llevó a cabo por el método descrito por Wheeler et al (Wheeler y col., 1990), esta técnica permitió la determinación indirecta de la actividad GPx a través de la reacción en cadena de los enzimas GPx y GR y la medida de la extinción del NADPH. La GPx reduce un sustrato con el que se pone en contacto, el t-butil hidroperóxido (t-BOOH), oxidando el glutatión, que volverá a su forma reducida gracias a la catálisis mediada por la GR a expensas del NADPH, cuyo consumo puede medirse ya que la forma reducida de esta molécula presenta un máximo de absorción a 340nm.

Muestras:

- Muestras eritrocitarias: se partió del hemolizado 1:20 de eritrocitos humanos y del hemolizado 1:10 de los eritrocitos de rata; el hemolizado 1:10 de eritrocitos de ratón se diluyó 1:10 con tampón fosfato potásico 100mM/ EDTA- Na_2 1mM pH 7,0 (dilución final 1:100).
- Muestras de epidermis de rata o de piel de ratón: se usó directamente, sin diluir, la prueba la fracción soluble de epidermis del homogenizado 1:10 o la fracción soluble del homogenizado 1:10.

Reacción:

- Muestras humanas y de rata: se mezclaron en la cubeta 2,75ml del tampón fosfato potásico 100mM/EDTA 0,5mM pH 7,5, 120 μ l del hemolizado 1:20, 30 μ g de NADPH 20mM, 100 μ l de la solución de GSH 60mM y 4 μ l de la solución de GR (0,1U/l). Se dejó incubar la muestra 5min, tras los cuales se añadieron 100 μ l de la solución de t-BOOH al 0,16% e inmediatamente comenzaron las lecturas.
- Muestras eritrocitarias de ratón: 24 μ l de la muestra se hicieron reaccionar con 135 μ l del reactivo GPx para la determinación en el espectrofotómetro automatizado; dicho

Métodos

reactivo contenía 0,25mM de NADPH, 1,17mM de GSH y 6U/ml de GR; tras 2min 30s se añadieron 18µl de la solución de t-BOOH al 0,14%.

Lectura:

- Muestras humanas y de rata: se leyeron las muestras en el espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2 a 340nm, cada 30s durante 5min.
- Las muestras procedentes de ratón se leyeron cada 25s durante 2min 30s en el espectrofotómetro automatizado, que expresaba la lectura de salida en unidades enzimáticas por volumen de muestra.

Cálculos:

- Muestras humanas y de rata: los cambios de la absorbancia en el tiempo reflejaban el soluto transformado en ese tiempo lo que permitió calcular directamente la actividad del enzima.
- Muestras de ratones: el espectrofotómetro expresó las lecturas en unidades enzimáticas.
- En todos los casos se transformaron las unidades de salida en función de la hemoglobina o de la proteína soluble presente en las muestras, corrigiendo los volúmenes en función de las diluciones realizadas.

Expresión de resultados: la actividad GR se expresó como unidades enzimáticas, es decir, µmoles de sustrato transformados por minuto, por unidad de hemoglobina, proteína o tejido correspondiente.

5.1.1.2. Método para la determinación de la proteína presente en una muestra por western blot

Método: la técnica western blot tiene por objetivo detectar específicamente una proteína en una muestra, para lo cual se han de separar por electroforesis en un gel de poliacrilamida las proteínas de la muestras y transferirse a una membrana de nitrocelulosa, bloqueando el resto de la membrana con proteínas lácticas. Se ha de incubar la membrana con un anticuerpo específico frente a la proteína favorita y, tras lavar el exceso de anticuerpo primario, se incuba la membrana con un anticuerpo unido a peroxidasas de rábano frente al anticuerpo específico. Tras los lavados del exceso de anticuerpo secundario, se añade el

reactivo de revelado, que cual contiene luminol y H_2O_2 . En contacto con la peroxidasa, el luminol pasa a un estado excitado, emitiendo luz al recuperar el estado fundamental (no excitado). La luz es captada por una cámara CCD que la transforma en una imagen digital en la cual se puede medir la intensidad lumínica por densitometría, siendo dicha intensidad una función de la cantidad de proteína.

Muestras: se partió de la fracción soluble de piel o de epidermis homogenizada 1:5 con tampón fosfato sódico 200mM pH 6,25 y se diluyó de nuevo 1:5 en el mismo tampón.

Proceso:

- Preparación de la muestras: se prepararon 22 μ l de la mezcla de carga:
 - o Volumen de la muestra en el que hubiese 5,5 μ g de proteína.
 - o 5,5 μ l del tampón de carga (NuPAGE[®] LDS Sample Buffer 4X, Invitrogen).
 - o 2,2 μ l del agente reductor (NuPAGE[®] Sample Reducing Agent 10X, Invitrogen).
 - o Se completó con H_2O hasta alcanzar un volumen de 22 μ l.
- Desnaturalización: una vez preparada la muestra, se incubó 10min a 70°C con el fin de desnaturalizar las proteínas, tras lo cual se dejaron reposar 3min en hielo.
- Electroforesis: en la cubeta de electroforesis XCell SureLock MiniCell (Invitrogen).
 - o Gel: la electroforesis se llevó cabo en un gel comercial al 10% de poliacrilamida de 1mm de espesor, con 12 pocillos (NuPAGE[®] Novex 10% Bis-Tris Gels).
 - o Carga:
 - se cargaron ocho muestras por gel, dos por grupo, 20 μ l/calle (5 μ g de proteína/calle) en las ocho calles centrales. En cada una de ellas se determinaría uno de los enzimas antioxidantes y la β -actina.
 - cuatro calles de marcador de peso molecular:
 - dos con marcador visible (SeeBlue[®] Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen), uno en cada extremo (5 μ l/calle).
 - dos calles con marcador quimioluminiscente (MagicMark[™] XP Western Protein Standard, Invitrogen) una en cada extremo (0,5 μ l/calle).

Métodos

- Medio de electroforesis: el tampón de electroforesis es una dilución 1:20 del comercial (NuPAGE[®] MOPS SDS Running Buffer 20X). En compartimento exterior de la cubeta se pusieron 600ml de tampón de electroforesis 1x frío y en el interior 20ml de tampón de electroforesis 1x frío con 0,5ml de antioxidante (NuPAGE[®] Antioxidant, Invitrogen). Para evitar que se recalentase el medio de electroforesis, se colocó la cubeta sobre una bandeja con hielo.
- Corriente: se conectaron los bornes de la cubeta a la fuente de alimentación (E443 de Consort). La corriente para la electroforesis se fijó en un voltaje de 100V y una intensidad de 70mA y se dejó correr hasta que el frente alcanzó el polo opuesto (2h 30min).
- Transferencia: en el sistema de transferencia semihúmedo XCell II[™] Blot Module (Invitrogen).
 - Tampón de transferencia: dilución 1:20 del comercial concentrado (NuPAGE[®] Transfer Buffer 20X), 0,5ml del antioxidante (NuPAGE[®] Antioxidant, Invitrogen). Para activar la membrana, se añade metanol hasta un 10% del volumen final.
 - Membranas de nitrocelulosa de 0,45µm de espesor (Nitrocelulose Membrane/Filter Sandwiches 0,45µm, Invitrogen).
 - Se prepara el sándwich: Las esponjas y el papel de filtro debían estar empapadas de tampón de transferencia. La membrana se mantuvo en remojo 5min en el tampón de transferencia para su activación. Una vez preparados los componentes se monta el sándwich de la siguiente forma: ánodo, cuatro esponjas, papel de filtro empapado en tampón de transferencia, la membrana, el gel, otro papel del filtro, cuatro esponjas más y el cátodo. Se cerró el compartimento interno de la cubeta y se introdujo en la cubeta.
 - Se rellenó el compartimento interno con tampón de transferencia frío y el exterior con 500ml de H₂O fría.
 - Se conectaron los bornes de la cubeta a la fuente de alimentación (E443 de Consort). Para la transferencia se fijó la corriente en 30V de potencia y 225mA de intensidad. Se dejó transferir durante 1h.
- Bloqueo: se incubó durante toda la noche la membrana en tampón de bloqueo que porta un 2% de reactivo de bloqueo (ECL Advance Western Blotting

Detection Kit, Amersham Biosciences) y un 0,1% de Tween 20 en tampón Tris Salino (2,5mM de Tris, *Tris buffer saline*, TBS).

- Incubación de anticuerpos: los anticuerpos se diluyeron en tampón de bloqueo. Esta incubación se llevó a cabo cortando la membrana en horizontal de tal manera que quedase dividida en tres fragmentos, en dos de ellos se determinaría un enzima y en el tercero se determinaría la actina de la proteína presente en el carril.
 - o Anticuerpo primario: los anticuerpos primarios usados fueron IgG policlonales de conejo. Antes de la incubación, se lavó la membrana 10s en TBS y después se incubó el anticuerpo primario 1h a T^a ambiente. A continuación especificamos el comercial y la dilución de anticuerpo elegidos para estos estudios:
 - Anti-SOD-1: Abfrontier (LF-PA0013), 1:1000.
 - Anti-CAT de Calbiochem (219010), 1:4000.
 - Anti-GST- π : MBL (311), 1:2000.
 - Anti-GR: Abfrontier (LF-PA0056), 1:2000.
 - Anti-ACT: Abcam (Ab37063), 1:5000.

Tras la incubación se realizaron cinco lavados de 5min con solución de lavado (0,1% de SDS y 0,5% de NonidetTM p40 Substitute en TBS) a T^a ambiente en agitación constante; tras los cuales se lavó la membrana 10s con TBS.

- o Anticuerpo secundario: IgG de ratón ligada a peroxidasa de rábano frente a IgG1 κ de conejo de Jackson Inmuno Research Laboratories (P0448), diluido 1:10000. Se incubó la membrana con el anticuerpo 30min a T^a ambiente, tras lo cual se hicieron cinco lavados de 5min con tampón de lavado a T^a ambiente en agitación constante.
- Revelado: antes del revelado se hicieron dos lavados de 10min con TBS a T^a ambiente en agitación constante. Se lavó la membrana continuamente con 2ml de reactivo de revelado (ECL Advance Western Blotting Detection Kit, Amersham Biosciences) durante 5min tras lo cual se puso en la cámara oscura del generador de imágenes Versadoc (BioRad) y se toman fotografías durante 10min cada 30s.

Métodos

Cálculos: mediante el programa informático Quantity One se extrajeron los datos de densitometría de cada una de las bandas de interés y se escogió aquella fotografía en que las bandas de la proteína problema y la actina mostrasen la máxima densidad en la zona linealmente creciente en relación al tiempo de exposición.

Expresión de resultados: se expresaron los resultados en función de la relación de densidad óptica entre la banda problema y la banda de actina.

5.1.2. Determinación de parámetros bioquímicos no enzimáticos

5.1.2.1. Indicadores de la capacidad antioxidante

Valoración de la capacidad de absorción de los radicales peroxilo (ROO[·]) (ORAC, *Oxigen Radical Absorption Capacity*)

Método: se siguió el método de Cao (Cao y col., 1993), modificado para fluoresceína Ou (Ou y col., 2001). Este método se basa en el uso de un fluorocromo, en nuestro caso la fluoresceína sódica, que al sufrir daño oxidativo deja de emitir fluorescencia, lo que es inducido por un generador de radicales ROO[·], el AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano)dihidrocloro). Esta pérdida de fluorescencia se ralentiza en presencia de sustancias antioxidantes en el medio capaces transferir un átomo de hidrógeno a los radicales peroxilo (Huang y col., 2005). La capacidad de inhibición de la formación de ROO[·] de cada una de las muestras se refieren a la capacidad de un estándar antioxidante, en nuestro caso el trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico).

Muestras:

- EPL: se realizaron diferentes diluciones para la determinación de su capacidad antioxidante. Se partió de la fracción soluble del extracto en tampón fosfato potásico 75mM pH 7,4 y se realizaron varias diluciones en el mismo tampón para calcular la capacidad antioxidante en función de la concentración.
- Plasma:
 - o Plasma nativo: se realizó una dilución 1:1000 del plasma nativo de humanos y 1:250 del plasma nativo de ratones en tampón fosfato potásico 75mM pH 7,4.

- o Plasma libre de proteínas: tanto en humanos como en ratones el plasma libre de proteínas se diluyó 1:15 en tampón fosfato potásico 75mM pH 7,4.
- Fracción soluble de piel: se diluyó la fracción soluble de piel 1:10 en tampón fosfato potásico 75mM pH 7,4.

Reacción y lecturas:

- En cada uno de los 96 pocillos de la placa se pusieron 20µl de cada una de las muestras a realizar: el blanco (tampón fosfato potásico 75mM pH 7,4), las muestras problema o las diluciones del estándar de Trolox y se añadieron 270µl de la solución 49,17nM de fluoresceína sódica.
- Se realizó una primera lectura puntual, de la fluorescencia inicial.
- Se añadieron 10µl de la solución 0,384M de AAPH.
- Se midió la fluorescencia emitida cada minuto durante 2h.

Todas las lecturas se realizaron a las siguientes longitudes de onda: 458nm de excitación y 538nm de emisión en placas de 96 pocillos.

Cálculos: la capacidad antioxidante de las muestras se calculó restando el área bajo la curva de la función del blanco al área bajo la curva de la función de cada muestra y relacionando este valor con el obtenido por las cubetas del estándar de trolox.

Expresión de los resultados: el valor de la actividad ORAC de cada muestra se expresó en unidades de concentración de trolox equivalentes por unidad de volumen de muestra original.

Valoración de la capacidad de reducir el FeIII a FeII (FRAP, *Ferric ion Reducing Antioxidant Power assay*)

Método: el método FRAP desarrollado por Benzie y Stain (Benzie y Strain, 1996) consiste en una reacción redox basada en la capacidad de algunos antioxidantes de donar electrones en medio ácido, transformando la tripiridiltriayna férrica en su forma ferrosa lo que implica un cambio de color, que presenta un máximo de absorbancia 593nm.

Muestras:

- EPL: se realizaron diferentes diluciones para la determinación de la capacidad antioxidante del extracto. Se parte de la fracción de soluble del mismo diluida 1:2 en

Métodos

H₂O y se realizaron varias diluciones, también en H₂O, para calcular la capacidad antioxidante en función de la dosis.

- Plasma: se diluyó el plasma nativo de humanos 1:10 en H₂O.

Reacción: se añadieron 3ml de reactivo FRAP a 150µl de muestra. El reactivo FRAP es una mezcla 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 0,833mM y FeCl₃ 1,667mM en tapón acetato 0,3M pH 3,6. Tras una incubación de 5min, se midió la densidad óptica de la muestra a 593nm. Como blanco de la reacción se tomó una cubeta en la que en lugar de muestra contenía el mismo volumen de agua y como estándar de las muestras se midió la densidad óptica de distintas diluciones de trolox en H₂O comprendidas entre 0,001 y 1µmol/ml.

Lecturas: se realizó una lectura puntual de cada cubeta a 593nm.

Cálculos: para el cálculo de la capacidad de reducir el Fe³⁺ a Fe²⁺ de cada una de las muestras se hubo de extrapolar el valor de su densidad óptica de la función de absorbancia descrita por las concentraciones del estándar.

Expresión de resultados: los valores de capacidad reductora de la muestra se expresaron en unidades de concentración de trolox equivalente.

5.1.2.2. Indicadores del estado oxidativo

Hemólisis inducida por H₂O₂

Método: (Farrell y col., 1977) esta prueba es una evaluación de la resistencia de las membranas eritrocitarias ante la oxidación inducida por H₂O₂. Para hacer esta determinación es necesario realizar tres medidas: una la de la hemólisis basal, en la cual se mide la hemólisis espontánea de los eritrocitos; en segundo lugar la hemólisis sufrida por una solución de eritrocitos sometidos al efecto del H₂O₂ y, en último lugar, para obtener un valor del máximo de hemólisis que se puede producir, la hemólisis total de los eritrocitos.

Muestras: se partió de muestras de eritrocitos doblemente lavados que se diluyeron en PBS, siendo el factor de dilución 1:10 en las muestras de ratones y 1:20 en muestras de ratas y de humanos.

Reacción: en todos los tubos donde se llevó a cabo la reacción se puso un volumen igual de la dilución de eritrocitos en PBS: en humanos 300µl y en ratas y ratones 150µl.

- Hemólisis basal (3 tubos en humanos y 2 en rata y ratón): se añadió el mismo volumen de PBS que de la dilución de eritrocitos.
- Hemólisis en medio con H₂O₂ (3 tubos en humanos y 2 en rata y ratón): al volumen de la dilución 1:20 de eritrocitos en PBS se le añadió 260µl en humanos 130µl en ratas y ratones de la solución de H₂O₂ al 30% y 40µl en humanos y 20 en ratas y ratones de PBS.
- Hemólisis total (2 tubos en todos los modelos): al volumen de la dilución en PBS se le añadió H₂O hasta alcanzar un volumen de 3,8ml en humanos y 2,05ml en ratas y ratones.

Los tubos se incubaron en un baño a 37°. En humanos, tras la primera hora de incubación se leyó una muestra de los tubos de hemólisis basal y de hemólisis con H₂O₂ además de los dos tubos de hemólisis total. A la segunda hora se leyó otro tubo de cada una de los dos tipos primeros y se volvieron a leer las cubetas de la hemólisis total y lo mismo a la tercera con los tubos restantes. En ratas y ratones sólo se hicieron lecturas a la segunda y tercera hora.

Para la lectura de los resultados, se hubieron de igualar los volúmenes de los tubos de hemólisis basal y con H₂O₂ al de la hemólisis total, por lo que a esos tubos se les añadió PBS (3,5ml en humanos y ratas y 1,75ml en ratones). Se centrifugaron los tubos a 400xg 3min a T^a ambiente, tras lo cual se recogió el sobrenadante el cual contendría la hemoglobina liberada por los eritrocitos lisados.

Lectura: el sobrenadante de cada tubo se leyó cuando le correspondía, según se ha explicado anteriormente, a 405nm, utilizando PBS como blanco.

Cálculos: la hemólisis inducida por el H₂O₂ se calculó restándole el valor de los tubos de hemólisis basal al de los tubos de hemólisis inducida por el H₂O₂ y relacionándolo, en forma de porcentaje, con el de hemólisis total. Entre los valores obtenidos a las distintas horas, se escogió el más alto.

Expresión de los resultados: porcentaje de hemólisis respecto a la total, valor de los eritrocitos completamente lisados en H₂O.

Determinación de los niveles de glutaciones

Método: la determinación del contenido de glutatión reducido y el oxidado de una muestra por el método desarrollado por Hissin y Hilf (Hissin y Hilf, 1976) se basa en la capacidad del

Métodos

O-phthaldehido (OPT) de reaccionar con el GSH a pH 8 y con el GSSG a pH 12 generando en ambos casos un producto fluorescente que presenta un máximo de excitación a 350nm, emitiendo a 420nm.

Muestras: para poder hacer las valoraciones es necesario eliminar las proteínas de las muestras, lo cual, se llevó a cabo mediante la precipitación de proteínas con TCA (ácido tricloroacético): en todos los casos, la precipitación consistió en añadir a un volumen de mezcla un volumen de TCA de tal manera que la dilución de este es de 1:176,667; tras una incubación de 20min a 4°C se centrifugaron durante 10min a 4°C y 715xg; recuperando el sobrenadante, el cual contenía el glutatión de la muestra y a partir de él se hicieron las determinaciones.

Nota: los volúmenes que especificamos a continuación son para ratas y ratones, para humanos serían el doble.

- Origen de las muestras:
 - o Eritrocitos: se partió del hemolizado 1:20 de los eritrocitos en tampón fosfato sódico 100mm / EDTA 1mM pH 6,25 y se realizó la precipitación anterior.
 - o Plasma: se precipitaron 250µl de plasma nativo como se describió anteriormente.
 - o Fracción soluble de piel o epidermis: la precipitación de proteínas se realizó a partir de 200µl de la fracción soluble del tejido (1:10).
- Procesado previo de las muestras: a partir del sobrenadante resultante de precipitar las proteínas de las muestras, se realizaron dos alícuotas una para la determinación del GSH y otra para la del GSSG y se realizaron los siguientes tratamientos:
 - o Alícuota para la determinación del GSH: se diluyeron 1:10, 50µl de la muestra con 450µl de tampón fosfato sódico 100mM-EDTA-Na₂ 5mM a pH 8.
 - o Alícuotas para la determinación de GSSG: 50µl de cada muestra se incubaron durante 20min a T^a ambiente con 20µl de la solución de NEM (N-etilmaleimida) 5mg/ml con el fin de evitar la oxidación del GSH presente. Transcurridos el tiempo de incubación se añadió a cada mezcla 430µl de NaOH 0,1N.

Reacciones: la reacción se llevó a cabo en la cubeta donde se realizaría la lectura. Los volúmenes fueron iguales para las determinaciones en humanos y en modelos animales.

- Determinación del GSH:

- A 1,8ml de tampón fosfato sódico 100mM-EDTA-Na₂ 5mM a pH 8 se le añadieron 100µl de la muestra procesada para la determinación de GSH, de cada dilución del patrón de GSH o del mismo tampón para el blanco de la reacción.
- En último lugar se añadieron 100µl de la solución 1mg/ml de OPT, tras lo cual se incubó la reacción durante 15min a T^a ambiente se leyeron las muestras.
- Determinación de GSSG:
 - A 1,8ml de solución NaOH 0,1N se le añadieron 100µl de la muestra procesada para la determinación de GSSG, de cada dilución del patrón de GSSG o de la misma solución de NaOH para el blanco de la reacción.
 - En último lugar se añadieron 100µl de la solución 1mg/ml de OPT, tras lo cual se incubó la reacción durante 15min a T^a ambiente y se leyeron las muestras.

Lectura: las lecturas se realizaron por fluorescencia a bajo las siguientes condiciones: 350nm para la excitación y 420nm para la emisión.

Cálculos: a partir de los valores de fluorescencia de cada reacción y de la función de la recta patrón se calcularon los valores de los contenidos de GSH o GSSG de las muestras.

Expresión de resultados: los resultados se expresaron en unidades de masa de GSH o GSSG por unidad de masa de hemoglobina en las determinaciones eritrocitarias, por unidad de volumen de plasma nativo en las determinaciones plasmáticas y por masa de proteína o de tejido del que procede la muestra en el caso de fracción soluble de piel.

Ensayo de valoración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Método: la determinación de peróxidos lipídicos se llevó a cabo por el método desarrollado por Buege y Aust (Buege y Aust, 1978) modificado para fluorimetría según Richard (Richard y col., 1992). Este método consiste en la capacidad de los peróxidos lipídicos de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico formando un complejo fluorescente.

Muestras:

- Eritrocitos: en muestras procedentes de humanos se diluyó el hemolizado libre de proteínas 1:2 con suero fisiológico.
- Plasma: el plasma nativo se diluyó 1:50 con suero fisiológico.

Métodos

Reacción: en la determinación de TBARS, tanto eritrocitarios como plasmáticos, se hizo reaccionar 1ml de muestra con 2ml del reactivo TBARS, el cual contenía un 15% de TCA y 0,375% de ácido tiobarbitúrico en un medio 0,25N de HCl. Se sometió a 100°C durante 15min, tras lo cual se centrifugó a 1900xg durante 10min a 4°C y se recogió el sobrenadante del cual se leyó la fluorescencia. Como blanco se procesó un volumen de suero fisiológico en vez de muestra y, como estándar, distintas concentraciones de bis-dietilacetal-malondialdehido (MDA) de 0,014 a 0,082µM.

Lecturas: se leyó la fluorescencia de cada muestra a 515nm de excitación y 548nm de emisión.

Cálculos: se extrapoló el valor de cada muestra de la función de la recta patrón del estándar de MDA.

Expresión de resultados: se expresaron los resultados en unidades de concentración de MDA equivalentes por ml de plasma o por g de Hb de los eritrocitos.

5.1.3. Valoraciones para referenciar las determinaciones bioquímicas a sus muestras correspondientes

Determinación de la proteína soluble (Bradford)

Método: El método Bradford (Bradford, 1976) de determinación de la cantidad de proteína presente en una muestra se basa en la unión del colorante Comassie Brilliant Blue G250 a las proteínas solubles en la muestra, lo que desplaza su máximo de absorbancia de 465nm a 595nm; la medida de la absorbancia a 595nm es proporcional a la proteína presente en la muestra.

Procedimientos: se siguieron dos procedimientos diferentes en las determinaciones de la proteína de la fracción soluble de piel o epidermis:

1. Procedimiento con volumen de reacción de 1,5ml:

Muestras: este procedimiento se llevó a cabo en las muestras de fracción soluble de piel y de epidermis en las que se iban a valorar parámetros bioquímicos por métodos distintos al western blot. Las muestras de fracción soluble se diluyeron 1:5 en H₂O antes de la reacción (30µl de muestra + 120µl de H₂O).

Reacción: en cada cubeta se pusieron 50µl de la dilución de la muestra a los que se les añadió 1,45ml del reactivo Bradford. En lugar de la muestra, las cubetas del blanco llevaban 50µl de H₂O y en las cubetas del patrón el mismo volumen de la dilución correspondiente de seroalbúmina (0,125, 0,25, 0,375, 0,5, 0,6 y 0,75mg/ml).

Lectura: estas determinaciones se realizaron en el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2, a 620nm.

2. Procedimiento con volumen de reacción de 0,2ml:

Muestras: las muestras de fracción soluble de piel y epidermis que iban a ser sometidas a western blot. Estas muestras se diluyeron 1:5 en H₂O.

Reacción: en cada pocillo de muestra se pusieron 5µl de la dilución anterior de la muestra; a los que se les añadió 5µl de H₂O y 190 del reactivo Bradford. La mezcla se incubó 20min a T^a ambiente. Los pocillos del blanco contenían 10µl de H₂O y 190µl del reactivo Bradford. En las cubetas de los puntos de la recta patrón, además del reactivo, se pusieron 10µl de las siguientes diluciones de seroalbúmina: 0,125, 0,25, 0,375, 0,5, 0,6 y 0,75mg/ml.

Lectura: estas determinaciones se realizaron en placas de 96pocillos, a 620nm.

Cálculos: en ambos casos se determinó la cantidad de proteína en función del valor de absorbancia de cada muestra y la función de la recta patrón de seroalbúmina.

Expresión de resultados: los valores de proteína se expresaron en unidades de masa por unidad de volumen de fracción soluble o por masa de tejido equivalente.

Determinación de la hemoglobina y hematocrito

Hemoglobina (Drabkin & Austin)

Método: la medición de la hemoglobina presente en una muestra de sangre se realizó mediante el método de Drabkin y Austin (Drabkin y Austin, 1935), basado en la transformación de la hemoglobina sanguínea al entrar en contacto con el reactivo Drabkin (ferricianuro potásico y cianuro potásico) mediante dos reacciones consecutivas que conducen a la formación de cianometahemoglobina, molécula estable que absorbe luz a 540nm.

Muestras: se partió de muestras de sangre total.

Métodos

Reacción: se hizo reaccionar directamente la sangre con el reactivo Drabkin. En el caso de humanos y ratas 20µl de sangre total en 5ml del reactivo; en ratones se añaden 10µl de la sangre a 2,5ml del reactivo. La mezcla se incubó 20min a T^a ambiente.

Lectura: transcurridos los 20min de incubación, se tomaron 2ml de la muestra y se leyó la absorbancia tomando como blanco reactivo Drabkin. Todas las lecturas se realizaron a 540nm.

Expresión de los resultados: los valores de hemoglobina se expresaron en gramos por 100ml de sangre total. Las lecturas que nos da el espectrofotómetro ya están en estas unidades. En algunos casos se expresó el valor de hemoglobina por unidad de volumen de eritrocitos, para cuyo cálculo fue necesario el valor del hematocrito de los sujetos.

Hematocrito

Método: se determinó el valor del hematocrito mediante la centrifugación de un capilar heparinizado durante 3min a 6000xg a T^a ambiente.

Muestras: se llenaron directamente los capilares con sangre total.

Cálculo y expresión de los resultados: el valor del hematocrito será el porcentaje de la sangre total ocupado por los eritrocitos.

5.2. Métodos de Determinación de Parámetros Anatomopatológicos

Todas las muestras de piel en las que se realizaron valoraciones histológicas, a excepción de las muestras en las que se recontaron las células de Langerhans, fueron incluidas en parafina por el equipo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Barcelona.

5.2.1. Tinciones clásicas

Todas las tinciones clásicas fueron realizadas por el equipo del Dr. Cuevas del Servicio de Patología Molecular del Hospital de Guadalajara. Los recuentos se llevaron a cabo mediante microscopía óptica (Olympus Optical modelo CHT) por nuestro equipo.

Las muestras de la piel de los ratones incluidas en parafina fueron cortadas y teñidas por las siguientes tinciones clásicas:

- Hematoxilina-eosina: técnica de tinción basada en la combinación del colorante basófilo azulado hematoxilina con el acidófilo rosado eosina. Con esta técnica se observó el grosor de la epidermis de los ratones del estudio de irradiación aguda y se contaron las glándulas sebáceas de los animales del estudio de irradiación crónica:
 - o Grosor de la epidermis en las muestras de los ratones del estudio de irradiación aguda: los cortes histológicos fueron codificados y valorados por dos observadores con el fin de estimar la capacidad de discriminar entre las muestras que habían sido irradiadas y las que no lo habían sido.
 - o Recuento de las glándulas sebáceas en el estudio de irradiación crónica: se contaron las glándulas sebáceas por milímetro de longitud de piel bajo el objetivo 10x gracias a una escala de medida colocada en el ocular.

- Tricrómico de Masson: bajo esta tinción se midió el grosor de las distintas capas de la piel y el recuento de vasos sanguíneos, ambas determinaciones en las muestras de los animales del estudio crónico.
 - o El grosor de las distintas capas de la piel de los animales del estudio crónico se realizó bajo el objetivo 10x gracias a una escala de medida colocada en el ocular. En las zonas más afectadas por la irradiación, las medidas fueron realizadas en zonas subtumorales.
 - o El recuento de los vasos sanguíneos de los animales del estudio crónico se llevó a cabo en las preparaciones histológicas mediante la observación con un ocular que contenía una cuadrícula estandarizada. Se contaron todas las secciones de vasos del sector de la dermis influidos en la cuadrícula del objetivo. El número obtenido se expresó en función de los mm lineales reales de dermis. El recuento se realizó mediante el objetivo 20x.

- Orceína-Shikata: observación de fibras elásticas en las muestras de piel de los ratones del estudio de irradiación aguda. Los cortes histológicos fueron codificados

Métodos

y valorados por dos observadores con el fin de estimar la capacidad de discriminar entre las muestras que habían sido tratadas con EPL de las que no lo habían sido.

- Giemsa: conteo de los mastocitos infiltrados en la dermis de las muestras procedentes de los animales del estudio de irradiación crónica. El recuento se llevó a cabo bajo el objetivo 40x gracias a una escala de medida colocada en el ocular contándose 10 campos/muestra.

5.2.2. Citoquímica

Células de Langerhans

Método: la tinción de las células de Langerhans se realizó siguiendo el método de citoquímica de Mackenzie (Mackenzie y Squier, 1975), el cual se basa en la precipitación de plomo (Pb) asociada a la presencia de ATPasa en la membrana plasmática estas células.

Muestras: debido a que las células de Langerhans se encuentran en la epidermis, para facilitar la técnica de tinción y el recuento, se ha de retirar la dermis, lo cual se realizó siguiendo el método descrito por Scaletta (Scaletta y MacCallum, 1972), en porciones de piel de 0,5cm de lado, que se incubaron 1 hora y 10min en un baño a 37°C en una dilución 20mM de EDTA-Na₄ en PBS, con un 5% de CO₂; pasado este tiempo, con ayuda de unas pinzas, se separó la epidermis; las láminas separadas se colocaron en placas de Petri en las que se llevaría a cabo todo el proceso hasta el montaje de las mismas, una vez teñidas, en los portaobjetos. Antes de pasar al siguiente punto, las láminas de epidermis se lavaron tres veces con tampón tris-maleico 0,2 M pH 7,3 con un 6.84% de sacarosa (tampón de lavado).

Fijación: se incubaron las secciones de epidermis con formaldehído frío al 4% durante 20' y posteriormente se lavo tres veces con el mismo tampón de lavado que antes.

Incubación: se realizó una incubación de 1 hora a 37°C en un tampón tris-maleico pH 7,3 con un 7,18% de sacarosa, 0,5% de MgSO₄, 0,12% de Pb(NO₃)₂ y 0,1g/l de ATP. Tras lo cual se realizaron cuatro lavados más.

Contraste: se reveló la tinción de la ATP-asa con una solución de S(NH₄)₂ al 2,1% y se lavó cuatro veces más.

Montaje: se extendieron las muestras sobre un portaobjetos de vidrio con glicerol; se cubrieron las muestras con un cubreobjetos y se sellaron los bordes con esmalte.

Recuento: El recuento se llevó a cabo mediante microscopía óptica a 20x, contándose 24 campos por muestra.

Expresión de resultados: el nº de CL se expresó por unidad de superficie (CL/mm²).

5.2.3. Inmunohistoquímica

El equipo del Dr. Cuevas del Servicio de Patología Molecular del Hospital de Guadalajara realizó las tinciones de inmunohistoquímica frente a los antígenos p53 y Ki67 en las muestras de piel de los animales del estudio de irradiación crónica (estudio 3). Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

- Frente a la p53: anticuerpo primario: CM5 – anticuerpo policlonal de conejo (NCL-p53-CM5p) (Novocastra) diluido 1:100; siendo el anticuerpo secundario Goat antirabbit HRP-.
- Frente a la Ki67: se utilizó un anticuerpo de Matres diagnóstica prediluido monoclonal de conejo en citrato sódico pH 6.5; siendo el anticuerpo secundario Goat antirabbit HRP-.

Los recuentos de estas muestras se llevaron a cabo en nuestro laboratorio mediante microscopía óptica y bajo el objetivo 40x, observándose 10 campos/muestra y siendo cada campo de una superficie cuadrada de 60µm de lado (0,0036mm²). Los resultados se expresaron como células de positivas/mm² de epidermis.

Las muestras de los ratones del estudio de irradiación aguda (estudio 4) fueron teñidas por el equipo de la Dra. Ángeles Juarranz del Área de Biología Celular del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid, realizándose tinción inmunohistoquímica frente a los antígenos p53 y PCNA.

- Frente a la p53: Kit DAKO.
- Frente a la PCNA: se utilizó un anticuerpo monoclonal de conejo de Matres diagnóstica prediluido en citrato sódico pH 6.5; siendo el anticuerpo secundario Goat antirabbit HRP-.

Métodos

Los recuentos se realizaron mediante microscopía óptica y bajo el objetivo 40x, observándose 10campos/muestra en un microscópio Provis AX70 (Olympus). En cada campo se contaron las células positivas presentes en una sección de epidermis de 100µm de longitud. Los resultados se expresaron como células de positivas/mm de longitud de epidermis.

6. CÁLCULOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los cálculos no estadísticos se realizaron en la hoja de cálculo excel y, posteriormente se importaron a SPSS en forma de matriz de datos para su análisis estadístico. Se manejaron distintas versiones del paquete estadístico SPSS desde la 13.0 hasta la 15.0.

En función de los estudios que se pretendían realizar y de las características de las muestras, se sometieron los datos a distintos análisis y tests estadísticos; en todos los casos la significación estadística se estableció para un valor de p menor 0,05.

Las variables estudiadas en los estudio con modelos animales, a excepción de la supervivencia y los datos de anatomía patológica del estudio realizado en ratones sometido a RUV aguda, se hicieron dos tipos de análisis, el primero para determinar si alguno de los factores de estudio (tratamiento o radiación) influía sobre los valores de la variable para lo cual se compararon los tratados con los no tratados y los irradiados con los no irradiados; el segundo análisis se realizó para los grupos de estudio y se llevó a cabo por comparaciones por parejas. Sin embargo, el tipo de test utilizado no fue igual para todas las variables de ambos tipos de análisis, sino que se vio condicionado por la distribución de los datos y, en algunos casos, por la homogeneidad de las varianzas. A continuación explicamos cómo se llevaron a cabo estos dos tipos de estudios:

- Análisis de variables por factores de estudio: para poder comparar los grupos de estudio se analizó primero su distribución. Así, se comprobó si eran normales mediante el test de Shapiro-Wills; en función de la distribución se compararon dos a dos los grupos mediante un test t de Student en caso de normalidad y mediante el test U de Mann-Whitney en caso contrario.
- Análisis de variables según los grupos de estudio: se analizó la influencia de los dos factores de estudio (tratamiento y radiación) sobre las variables estudiadas; para lo cual, previamente se analizó la distribución de los valores de cada variable en los de contraste mediante el test de Shapiro-Wills. Si los grupos de contraste seguían una distribución normal, los grupos se compararon siguiendo el test t de Student. Para grupos no normales, las comparaciones por parejas se realizaron cuando se detectaron diferencias significativas al aplicar el test de Kruskal-Wallis, mediante el test U de Mann-Whitney realizando la corrección de Bonferroni.

Métodos

El estudio de la supervivencia se realizó comparando únicamente los grupos irradiados. Inicialmente se pretendía realizar el análisis por el test de Kaplan-Meier según los estadísticos Log Rank, Breslow y Tarone-Ware; pero debido a la influencia de un artefacto que tergiversaba las observaciones, en una modificación del estudio, se aplicó el test exacto de Fisher para comparar la influencia de dicho artefacto sobre ambos grupos de estudio y, posteriormente, se aplicó el test t de Student para comparar ambos grupos irradiados excluyendo algunos casos según se explicará más adelante en la exposición de los resultados.

Uno de los objetivos del estudio realizado en ratones sometidos a irradiación aguda fue valorar si algunas diferencias que se apreciaban entre las preparaciones de piel eran debidas a alguno de los factores de estudio (radiación y tratamiento). Lo cual se llevó a cabo mediante la discriminación de las muestras *de visu* y a ciegas, asignando a cada muestra a un grupo: irradiado o no irradiado, en las muestras teñidas mediante hematosilina-eosina, y tratado con EPL o no tratado con EPL, en las muestras teñidas con Orceína de Shikata. Como indicadores de la calidad de las observaciones y de la capacidad de discriminar entre las muestras se emplearon los valores predictivos positivo y negativo y el índice κ de concordancia de Cohen.

Por último, el estudio realizado en humanos se analizó comparando las muestras procedentes de los mismos pacientes antes y después del tratamiento. En primer lugar se comprobó si las distribuciones de las muestras se ajustaban a una normal mediante el test de Shapiro-Wills. La comparación entre muestras se llevó a cabo mediante el test t de Student para muestras relacionadas entre muestras normales y mediante el test de Wilcoxon cuando la distribución de alguna de las muestras no se ajustaba a una normal.

RESULTADOS

En este apartado se exponen y comentan los resultados obtenidos en cada uno de los estudios incluidos en esta memoria, con su correspondiente discusión. La visión conjunta de todos los estudios se encuentra en el apartado siguiente junto con otros comentarios generales.

Antes de presentar los resultados de los distintos estudios se ha de explicar la leyenda de las gráficas de los resultados de los estudios realizados en modelos animales de experimentación. En ellas se representarán mediante diagramas de barras los valores obtenidos y las diferencias estadísticamente significativas halladas en los análisis realizados mediante letras; en la figura 8 se esquematiza esta leyenda.

Cada grupo de estudio está codificado por una letra:

- | | |
|--------------------------------------|-----------------------------------|
| A: No tratado con EPL y no irradiado | C: Tratado con EPL y no irradiado |
| B: No tratado con EPL e irradiado | D: Tratado con EPL e irradiado |

En las gráficas en las que se muestran los cuatro grupos de estudio, las barras azules representan aquellos grupos de estudio que no han sido sometidos a tratamiento con *P. leucotomos* y las verdes a los que sí se ha administrado el extracto. Las barras lisas corresponden a los grupos no irradiados y las rayadas a los grupos irradiados.

En las gráficas que muestran los análisis realizados en función del factor irradiación las barras son moradas; una de ellas, la lisa, representa a todos los animales que no han sido irradiados; y la otra, la rayada, representa a todos los animales que han sido sometidos a la radiación; en ambos casos, independientemente del tratamiento con alguno de los fármacos.

Las gráficas en las que se presentan los valores en función del factor tratamiento, el azul representan a los animales no tratados y el verde los tratados, en estos casos ambas barras son lisas a pesar de que en cada una de ellas se agrupan un grupo no irradiado y otro irradiado.

En la representación de las variables de anatomía patológica del estudio de ratones sometidos a RUV crónica (estudio 3) se trabaja con dos grupos más, ambos irradiados. En este caso las letras de identificación de cada grupo son:

- | | |
|---------------------------------------|------------------------------------|
| A: No irradiado y no tratado | D: No irradiado y tratado |
| B: Irradiado y no tratado – zona sana | E: Irradiado y tratado – zona sana |

C: Irradiado y no tratado - zona tumoral F: Irradiado y tratado – zona tumoral

En estos resultados, para diferenciar ambas zonas irradiadas, se representan por barras rayadas en negro los valores de las determinaciones realizadas en las zonas sanas y con barras rayadas en blanco los valores de las determinaciones de las zonas tumorales.

La significación estadística en los diagramas de barras de los estudios por grupos se representa colocando encima de la barra que simboliza a un grupo las letras de los grupos con los que éste muestra diferencias significativas. En el caso de los estudios por factores, todas las gráficas incluidas en las figuras, representan dos grupos que muestran diferencias estadísticas entre sí.

En el estudio realizado en humanos, en los diagramas se representan sólo dos barras: una azul lisa y una verde lisa, que representan, respectivamente, los valores de las determinaciones antes y después de tratamiento.

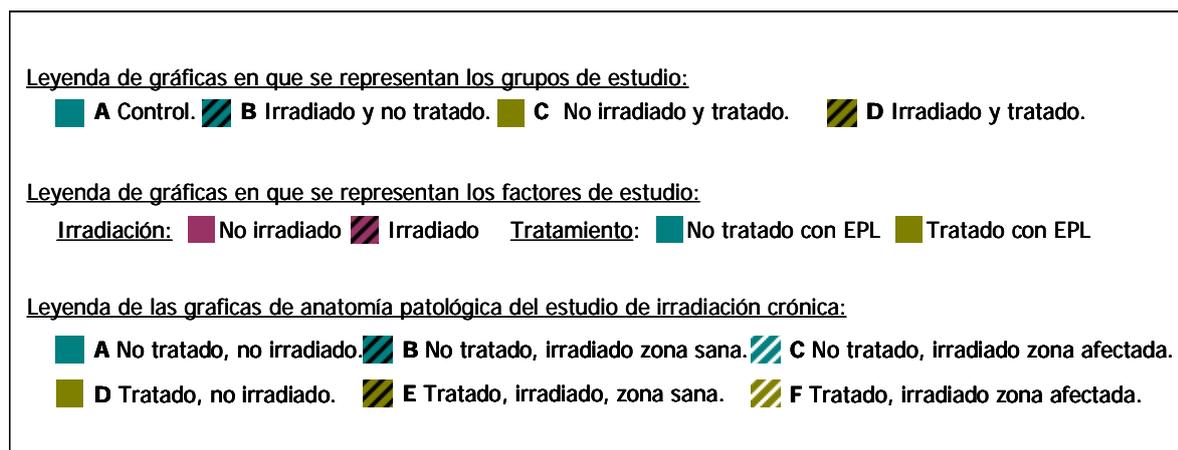


Figura 8: leyenda de los grupos representados en los diagramas de barras.

1. ESTUDIO 1: DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EPL

1.1 Resultados del estudio 1

En este estudio se valoró la capacidad del EPL de inhibir la producción de radicales peroxilo, inducida por la presencia de AAPH, mediante el método ORAC y, también, la capacidad de reducir el FeIII a FeII, por el método FRAP. Los resultados de ambas determinaciones se expresaron en función del comportamiento del antioxidante estándar, en este caso el trolox (análogo artificial y soluble de la vitamina E).

Capacidad del EPL de inhibir la formación de peroxilos (método ORAC)

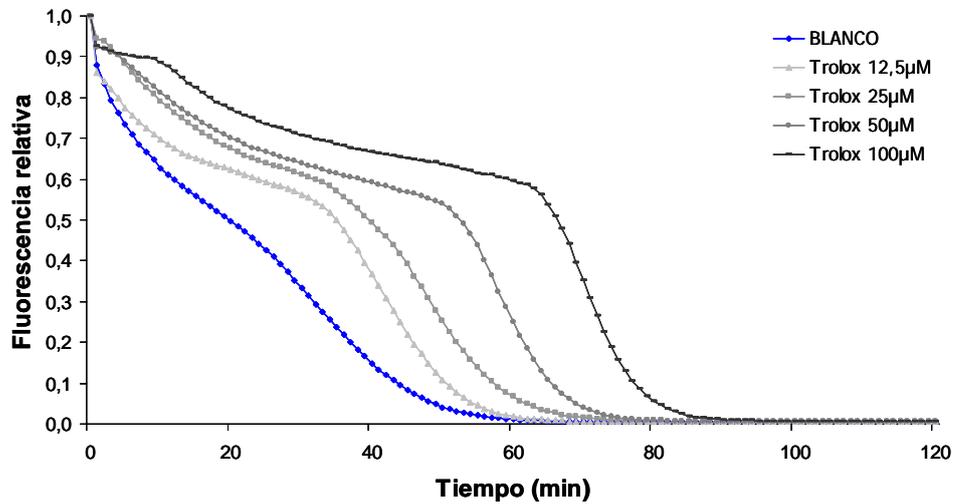
En la figura 9 se muestran las gráficas de los resultados de la prueba ORAC a distintas concentraciones de EPL. Se observó que en el blanco de la reacción, que no contiene antioxidantes, la fluorescencia disminuía con el tiempo debido a la generación de los radicales peroxilo por acción del AAPH.

En cambio, en las muestras con el antioxidante estándar (trolox), el efecto antirradicalar de este se demostró por el mantenimiento de la fluorescencia durante más tiempo. La función del área bajo la curva de las distintas concentraciones de trolox se tomó como referencia para expresar la capacidad ORAC del compuesto problema.

Finalmente, se observó que las muestras que contienen distintas concentraciones de EPL presentaron curvas de fluorescencia cuyas áreas fueron proporcionales a la cantidad de EPL añadido. Así, cuanto mayor es la concentración de EPL, mayor es el área bajo la curva, es decir, mayor es la capacidad antioxidante de la muestra.

Estudio 1

a)



b)

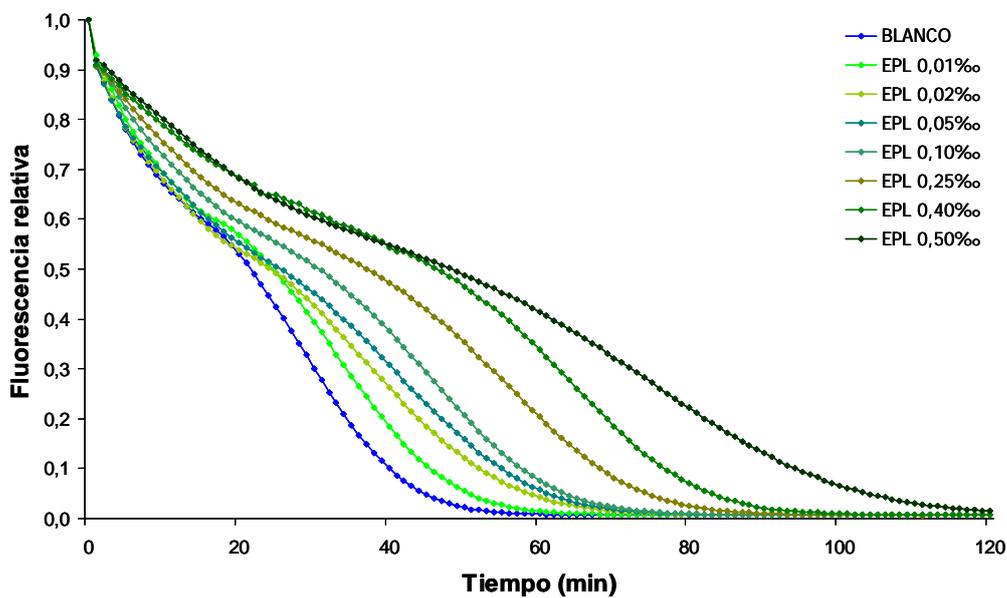


Figura 9: extinción de la fluorescencia en función del tiempo; a) en azul se representa el blanco de la reacción y a distintos tonos de gris las diferentes concentraciones del estándar (trolox); **b)** en azul se representa el blanco de la reacción y a distintos tonos de verde las diferentes diluciones del EPL.

Se calculó el área bajo la curva de cada una de las concentraciones del estándar y de cada una de las diluciones del EPL (figura 10). A partir de la relación entre las concentraciones y las áreas bajo la curva se determinó la capacidad del EPL de inhibir la formación de aniones peroxilo. Dicha actividad fue de 174,4 μ moles TE/ml EPL; lo que equivale a 117mmoles equivalentes de trolox (TE) por kg de hojas de *P. leucotomos*.

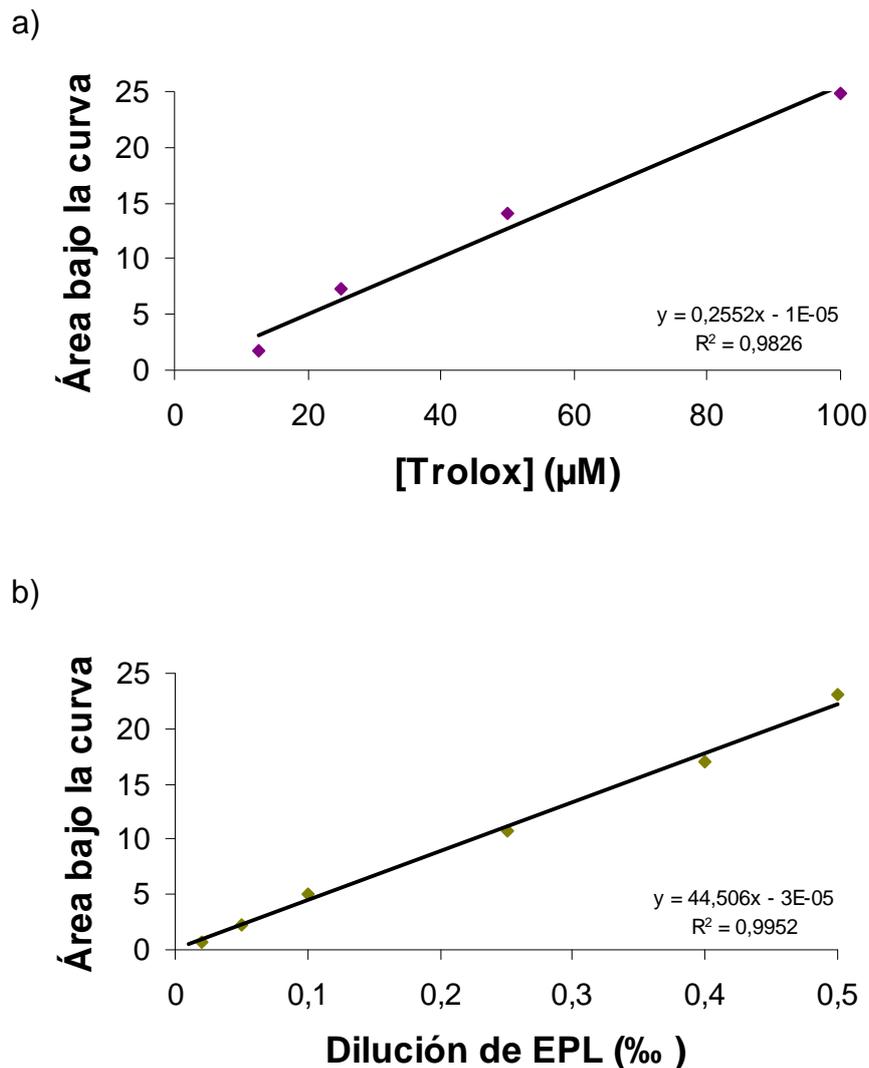


Figura 10: capacidad de inhibir la formación de peroxilos (área bajo la curva) en función de la presencia de antioxidante: a) función del área bajo la curva de distintas concentraciones de Trolox; b) función del área bajo la curva de las diluciones de EPL.

Estudio 1

Capacidad del EPL para reducir el FeIII a FeII (método FRAP)

El ensayo FRAP permitió medir la capacidad del EPL para reducir el FeIII a FeII respecto al estándar (trolox). En la figura 11 se representan los valores de absorbancia de las diluciones de trolox y EPL evaluadas. A partir de los valores obtenidos se calculó la capacidad del EPL de reducir el FeIII, la cual fue de 118,7µmoles TE/ml EPL; lo que equivale a 78,9mmoles TE/kg de hojas de *P. leucotomos*.

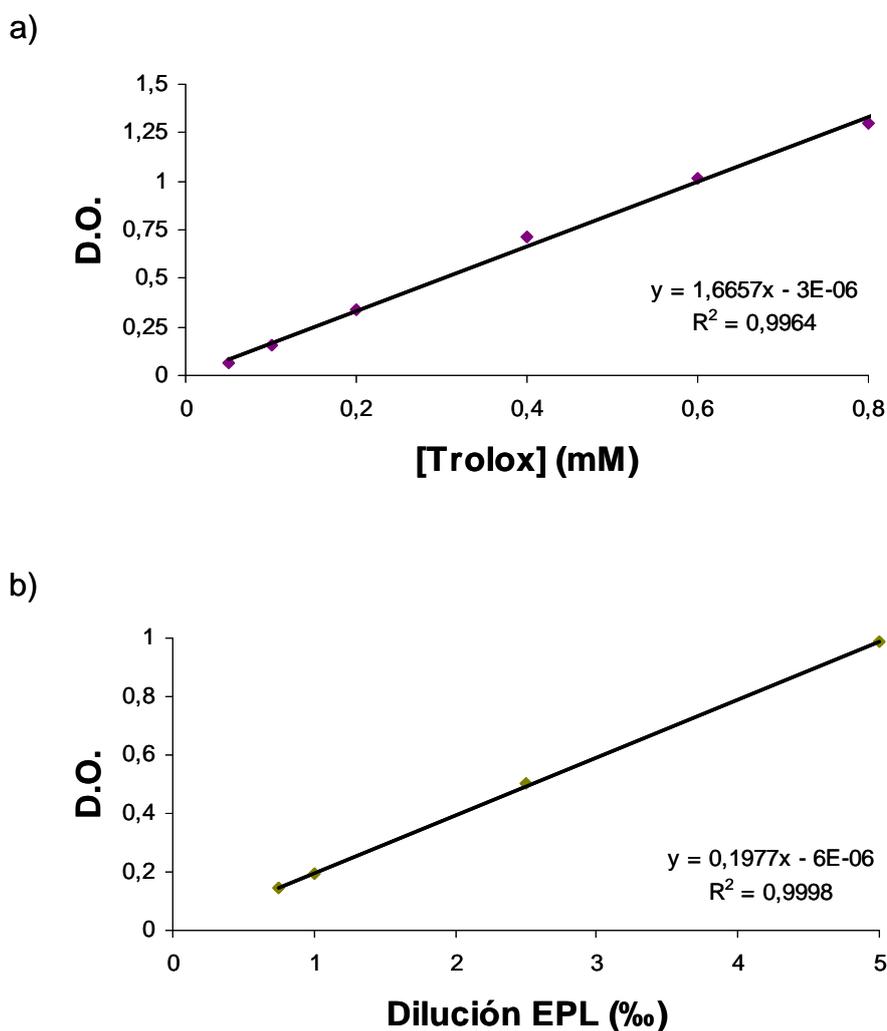


Figura 11: capacidad de reducción del FeIII a FeII (D.O.) en función de la presencia de antioxidante: a) representación de los valores de absorbancia de cada una de las concentraciones de trolox; **b)** representación de los valores de absorbancia de las distintas diluciones de EPL.

1.2. Discusión del estudio 1

Como se ha comentado en la introducción, la capacidad antioxidante del EPL y de sus componentes ha sido demostrada en estudios *in vitro* ((González y col., 1997), (Gombau y col., 2006) y (García y col., 2006)). En este estudio, se ha determinado la capacidad antioxidante *in vitro* del EPL que se administró en los posteriores estudios *in vivo* incluidos en esta memoria.

La capacidad antioxidante del *P. leucotomos* ha sido demostrada en varias ocasiones; en concreto la capacidad de eliminación de aniones O_2^- , OH^- y 1O_2 (González y Pathak, 1996; Gomes y col., 2001). También se valoró mediante monitorización por quimioluminiscencia dependiente de luminol (LDC) (Gombau y col., 2006) la capacidad de varios componentes del *P. leucotomos* (ácidos cumárico, cafeico, vanillico, ferúlico y clorogénico) de prevenir la oxidación del luminol inducida por el H_2O_2 .

Los resultados de los estudios *in vitro* indican que el EPL presenta una capacidad de inhibir la formación de iones peroxilo de 174,4 μ moles TE/ml de EPL y de reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} de 118,7 μ moles TE/ml de EPL.

Para poder comparar la actividad antioxidante del *P. leucotomos* con la de otros compuestos antioxidantes, hemos de transformar los valores anteriores en función del peso seco del helecho, siendo estos de 117 y 79,6 μ moles de TE/g de peso seco para las actividades ORAC y FRAP, respectivamente. En comparación con otros vegetales de reconocida capacidad antioxidante, el *P. leucotomos* presenta un valor medio-alto de actividad ORAC y un alto valor de actividad FRAP. Así por ejemplo, el tomate presenta valores inferiores en ambos ensayos (67 y 56 μ moles TE/g peso seco, ORAC y FRAP). El brócoli, la cebolla morada y las espinacas presentan una mayor actividad ORAC (123, 143 y 152 μ moles TE/g peso seco) pero menor actividad FRAP (41, 31 y 64 μ moles TE/g peso seco). El pimiento verde presenta mayor actividad ORAC y el rojo menor actividad ORAC que el *P. leucotomos* (154 y 97 μ moles TE/g peso seco), pero ambos tipos de pimiento presentan mayor actividad FRAP (157 y 185 μ moles TE/g peso seco). La remolacha presenta unas actividades ORAC y FRAP similares a la del helecho (115 y 86 μ moles TE/g peso seco) (Ou y col., 2002).

2. ESTUDIO 2: EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE EPL EN RATAS *HAIRLESS* SOMETIDAS A RUV AGUDA

2.1. Resultados del estudio 2

Como se comentó en la explicación del diseño experimental, cada grupo de estudio estuvo formado por 5 animales y en todos ellos se realizaron las mismas determinaciones, por lo que en los análisis estadísticos se trabajó con un tamaño muestral de 5 animales/grupo.

2.1.1. Resultados de parámetros evaluados en sangre

Hemoglobina, hematocrito y hemólisis

	A	B	C	D
Hemoglobina (g/100ml sangre)	12,9±1,4	12,9±1,9	13,9±1,3	14,1±0,8
Hematocrito (%)	43,83±1,68	42,54±1,32	41,66±1,15	42,74±1,30
Hemólisis inducida (%) ^T	50,7±10,8	45,8±4,7	41,9±19,9	40,1±12,6

Tabla 1: valores de la hemoglobina y el hematocrito sanguíneos y de la hemólisis inducida por H₂O₂ en los distintos grupos de estudio (media ± desviación típica, N=5). T Diferencias debidas al tratamiento. Diferencias significativas según Mann-Whitney (p<0,05).

En la tabla 1 se exponen los valores de hemoglobina, hematocrito y hemólisis inducida por H₂O₂ de los cuatro grupos de estudio. Ninguna de estas tres determinaciones mostró diferencias significativas entre los cuatro grupos de estudio, ni por el efecto de la radiación. Por el contrario, se observó que el tratamiento (T) redujo significativamente los niveles de hemólisis inducida por H₂O₂ (U-Man-Whitney; p=0,029), mostrando los grupos tratados con el EPL unos valores de este parámetro un 18% menor que los grupos no

tratados. Este resultado se atribuyó a un efecto protector del producto sobre las membranas eritrocitarias probablemente mediante la inhibición de la peroxidación de las mismas.

Actividades enzimáticas

En la tabla 2 se muestran los valores de las actividades enzimáticas eritrocitarias de los cuatro grupos de estudio.

	A	B	C	D
SOD (U/g Hb)	2997±719	2363±364	2647±975	2348±698
CAT (kU/g Hb) ^R	132,3±25,8	156,3±26,7	118,3±19,0 _D	157,1±12,6 _C
GST (mU/g Hb) ^R	608,1±32,4	694,6±112,8	556,4±88,6	633,4±35,0
GST termoestable (mU/g Hb) ^T	96,8±11,1 _C	98,0±13,0 _D	36,2±22,8 _{AD}	80,4±8,5 _{BC}
GST residual (%) ^T	15,9 ±1,5 _C	14,4±3,0	6,7±4,1 _{AD}	12,7±1,1 _C
GR (U/g Hb)	0,93±0,15 _C	0,81±0,44	0,56±0,29 _A	0,62±0,42
GPx (U/g Hb) ^T	181,9±14,4	182,9±30,5	168,4±36,5	153,0±8,3

Tabla 2: valores de actividades enzimáticas eritrocitarias de los grupos de estudio (media ± desviación típica, N=5); **R** variables que presentan diferencias significativas debidas a la radiación y **T** diferencias debidas al tratamiento (t-Student o U-Mann-Whitney); las letras en subíndice (A-D) indican los grupos que presentan diferencias significativas entre sí (t-Student o U-Mann-Whitney); En todos los casos $p < 0,05$.

La actividad superóxido dismutasa no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio, aunque se apreciaron unos niveles ligeramente menores de la actividad de este enzima en los grupos sometidos a la irradiación.

El análisis por grupos de la actividad catalasa mostró significación en la diferencia entre el grupo tratado con EPL y no irradiado, respecto al grupo que recibió el mismo tratamiento y que, además, fue irradiado (U-Mann-Whitney; figura 12a). El análisis por factores de la misma variable reveló diferencias debidas a la radiación (t-Student, $p=0,004$), elevando ésta en un 24% los niveles de actividad del enzima (figura 12b).

Estudio 2

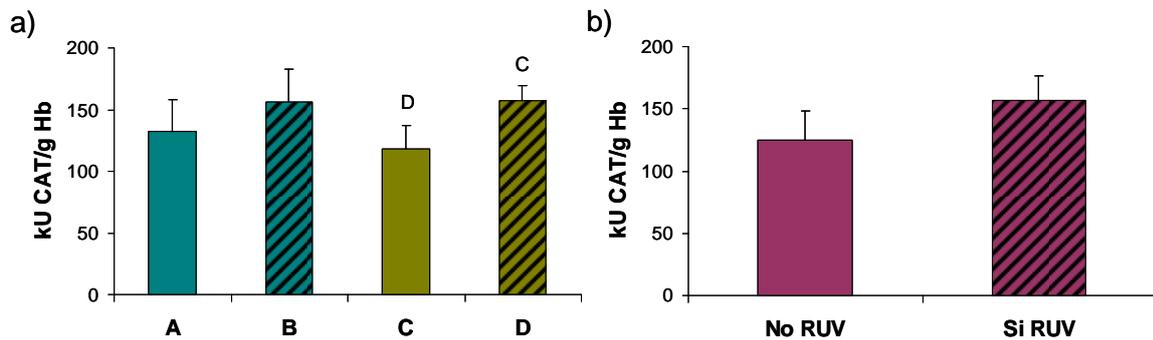


Figura 12: niveles de actividad CAT eritrocitaria a) entre los distintos grupos de estudio (U-Mann-Whitney); **b)** según la radiación, diferencia significativa (t-Student) ($p < 0,05$).

Los valores de actividad glutatión-S-transferasa presentaron diferentes tendencias en función de la fracción de la actividad GST medida. Así, la actividad GST total no mostró diferencias significativas entre los cuatro grupos (t-Student; figura 13a). Sin embargo, el estudio por factores demostró una influencia de la radiación, aumentando la actividad GST en un 14% (U-Mann-Whitney, $p = 0,023$; figura 13b).

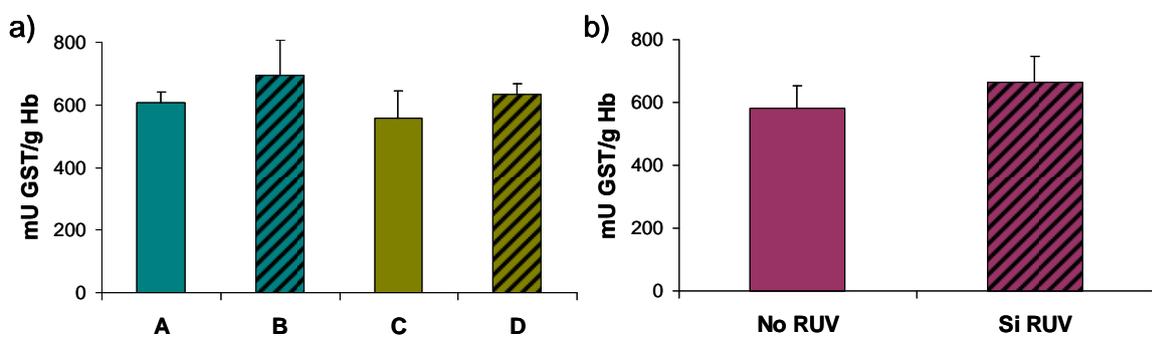


Figura 13: niveles de actividad GST eritrocitaria total a) según los grupos de estudio **b)** según la radiación, en este caso la diferencia es significativa (U-Mann-Whitney).

En cuanto a la actividad GST eritrocitaria termoestable se observó que el grupo tratado con EPL y no irradiado mostraba valores significativamente menores que los de su control no tratado y los de su control irradiado y, además, ambos grupos irradiados presentaron diferencias entre sí (t-Student; figura 14a). Estos valores afectaron al estudio por factores, en el cual, se observó un efecto del tratamiento reduciendo la actividad GST termoestable (t-Student, $p = 0,002$; figura 14b).

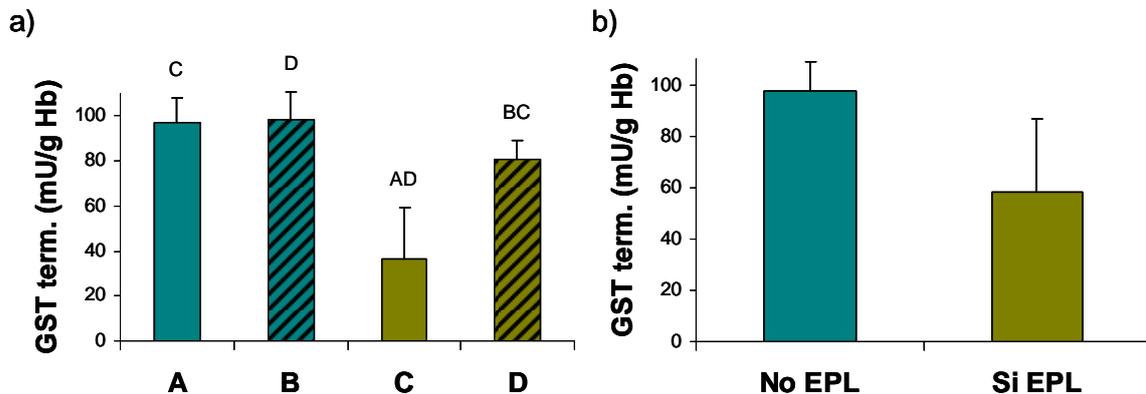


Figura 14: niveles de actividad GST eritrocitaria termoestable a) según los grupos de estudio (t-Student) b) según la radiación, en este caso la diferencia es significativa (t-Student); ($p < 0,05$).

Los valores de actividad GST eritrocitaria residual reflejan los valores que presenta la GST termoestable en el grupo irradiado no tratado, que presenta, en este caso, diferencias significativas con su grupo control no tratado y con su grupo control irradiado (t-Student; figura 15a). El estudio por factores presenta, al igual que la variable anterior, la influencia del tratamiento, que reduce los valores de la actividad GST residual (U-Mann-Whitney, $p < 0,001$; figura 15b).

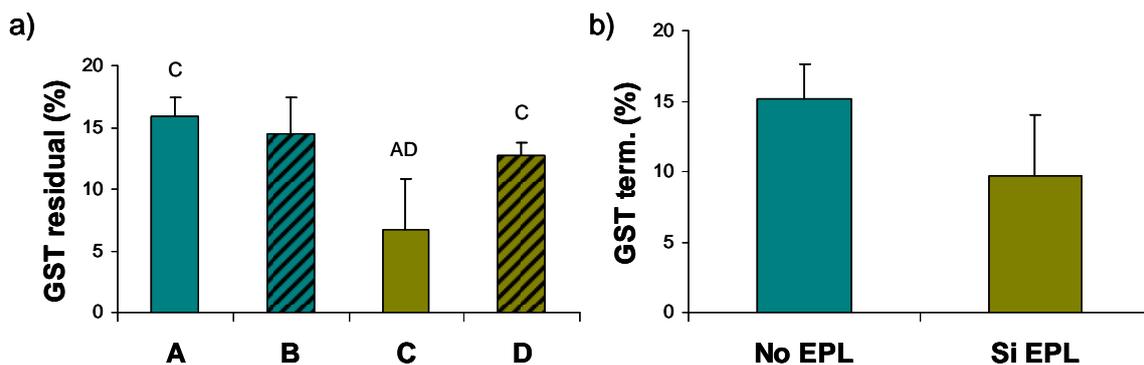


Figura 15: niveles de actividad GST eritrocitaria residual a) según los grupos de estudio (t-Student) b) según la radiación, en este caso la diferencia es significativa (U-Mann-Whitney); ($p < 0,05$).

En cuanto a los valores de actividad glutatión reductasa eritrocitaria, se observó una tendencia del tratamiento con EPL a disminuirlos, siendo la diferencia de un 47%. A pesar de

Estudio 2

esto, no se observaron diferencias significativas en el análisis por factores, probablemente debido a la gran desviación de los resultados, sobre todo en los grupos irradiados.

La actividad glutatión peroxidasa eritrocitaria mostró la influencia del tratamiento, el cual redujo los niveles de actividad del enzima (U-Mann-Whitney, $p=0,019$; figura 16b), siendo la diferencia entre grupos tratados y no tratados de un 14%. Sin embargo en el estudio por grupos esta variable no mostró diferencias significativas (t-Student; figura 16a).

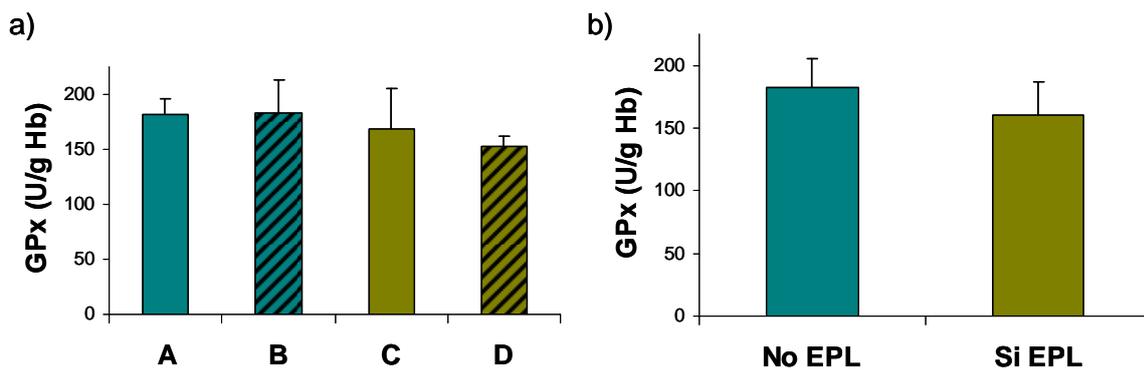


Figura 16: niveles de actividad de las actividad enzimática GPx eritrocitarias a) en los distintos grupos de estudio; b) según el factor tratamiento diferencia significativa (U-Mann-Whitney).

Niveles de glutaciones sanguíneos

- Glutaciones eritrocitarios: en la tabla 3 se muestran los valores de los niveles de glutaciones eritrocitarios de los cuatro grupos de estudio.

	A	B	C	D
GSH ($\mu\text{moles/g Hb}$)	5,93 \pm 0,78	5,82 \pm 1,51	5,39 \pm 0,58	5,60 \pm 0,86
GSSG ($\mu\text{moles/g Hb}$) ^T	1,02 \pm 0,23 _C	0,90 \pm 0,22 _D	0,29 \pm 0,22 _A	0,24 \pm 0,14 _B
GSH/GSSG ^T	6,15 \pm 2,12 _C	6,83 \pm 2,33 _D	27,92 \pm 15,35 _A	29,83 \pm 14,76 _B

Tabla 3: valores de glutaciones eritrocitarios (media \pm desviación típica, N=5). T variable que muestra diferencias estadísticas debidas al tratamiento (t-Student); las letras en subíndice (A-D) indican los grupos que presentan diferencias significativas entre sí (t-Student); ($p<0,05$).

No se observaron diferencias significativas entre los niveles de GSH eritrocitarios presentes en cada grupo, ni se observó ningún efecto de los factores de estudio en este parámetro. Por otra parte, los niveles de GSSG eritrocitario se vieron disminuidos un 73% por la administración de EPL, lo que se observó tanto en el estudio por grupo (t-Student; figura 17a) como en el estudio por factores (t-Student, $P < 0,001$; figura 17b).

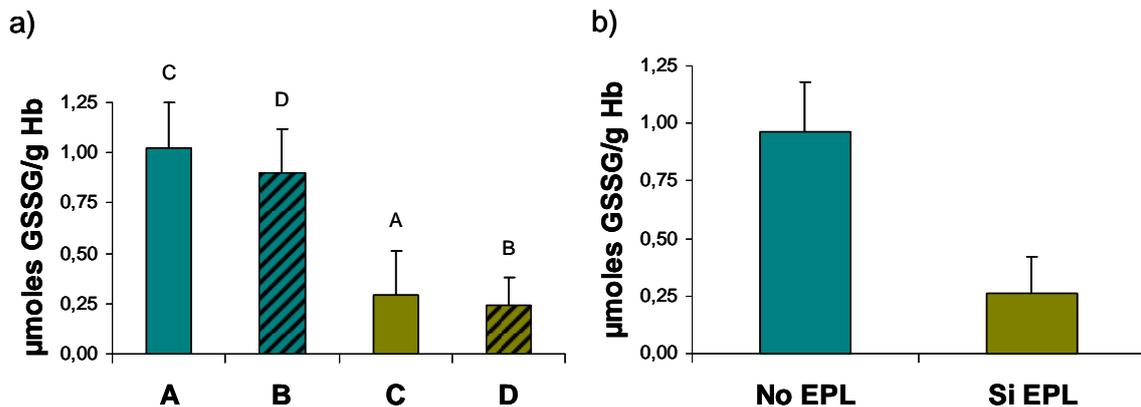


Figura 17: niveles de GSSG eritrocitario a) según los grupos de estudio (t-Student); b) En función del tratamiento (t-Student); ($p < 0,05$).

La influencia del tratamiento en los niveles de GSSG y el mantenimiento de los niveles de GSH, condujeron a un aumento significativo de la razón GSH/GSSG eritrocitaria en los grupos tratados con el extracto, lo que se hizo patente tanto en las comparaciones por grupos (t-Student, figura 18a) como por el factor tratamiento (t-Student, $p < 0,001$; figura 18b).

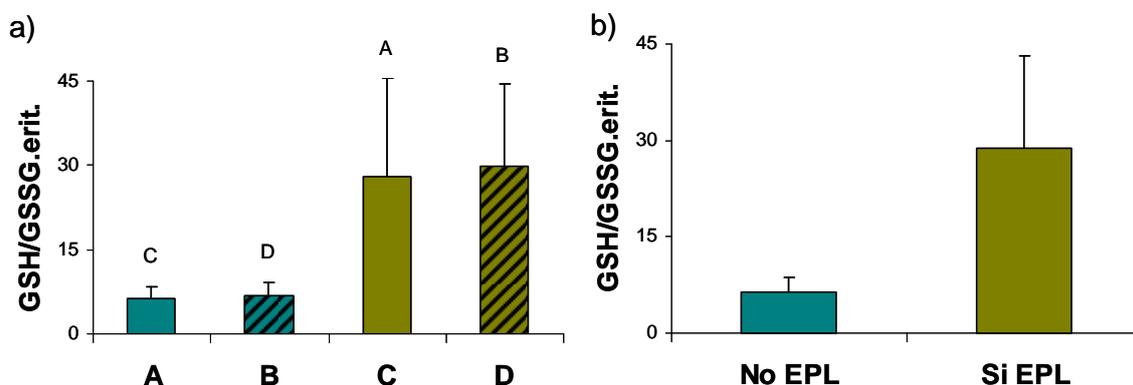


Figura 18: niveles de balance GSH/GSSG eritrocitario a) según los grupos de estudio (t-Student); b) En función del tratamiento (t-Student); ($p < 0,05$).

Estudio 2

- Glutaciones plasmáticos: en la tabla 4 se muestran los valores de los niveles de glutaciones plasmáticos de los cuatro grupos de estudio.

	A	B	C	D
GSH-P (nmoles/g Hb) ^{RT}	15,57±4,28	13,94±1,87	20,83±3,41 _D	15,01±1,64 _C
GSSG-P (nmoles/g Hb) ^T	25,57±5,13 _C	26,44±2,27 _D	15,24±3,21 _A	15,29±0,84 _B
GSH/GSSG-P ^{RT}	0,61±0,10 _C	0,53±0,09 _D	1,40±0,25 _{AD}	0,98±0,11 _{BC}

Tabla 4: valores de glutaciones plasmáticos en cada grupo de estudio (media ± desviación típica, N=5). **R** variables que muestran diferencias estadísticas debidas a la radiación (t-Student o U-Mann-Whitney); **T** variables que muestran diferencias estadísticas debidas al tratamiento (t-Student o U-Mann-Whitney); las letras en subíndice (A-D) indican los grupos que presentan diferencias significativas entre sí (t-Student o U-Mann-Whitney); (p<0,05).

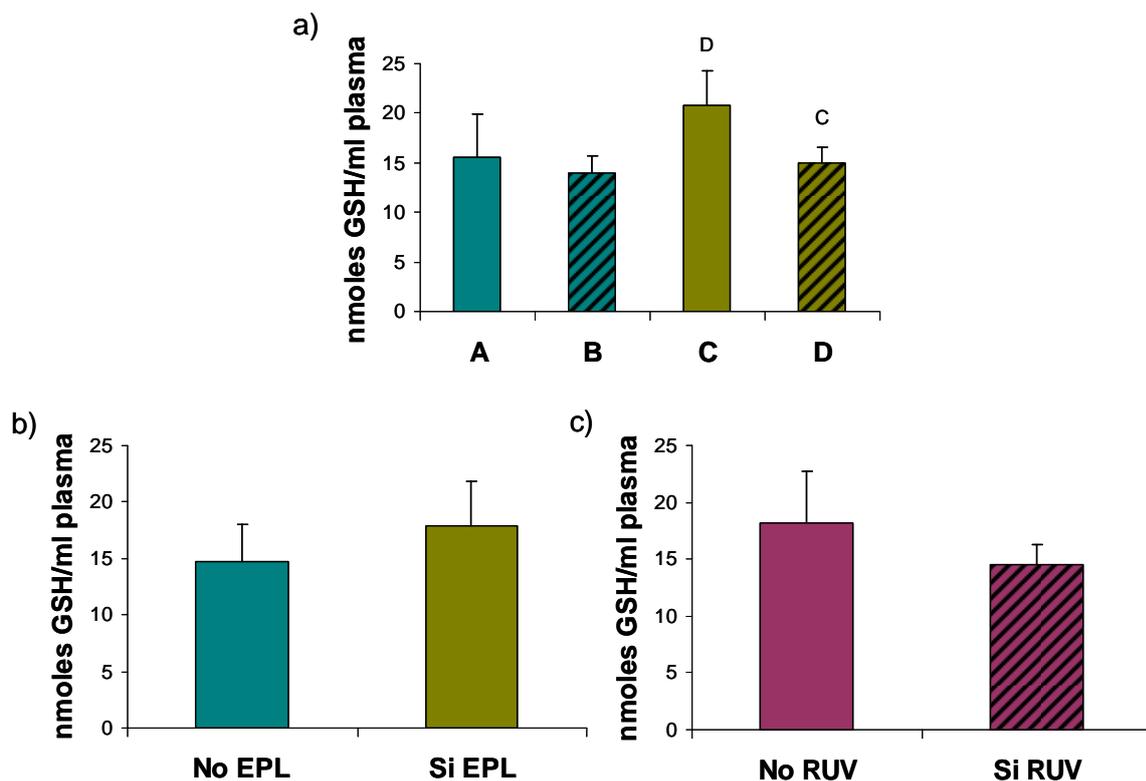


Figura 19: niveles de GSH plasmático a) según los grupos de estudio (U-Mann-Whitney); b) en función del tratamiento, diferencia significativa (t-Student); c) en función de la irradiación, diferencia significativa (U-Mann-Whitney); (p<0,05).

Los niveles de GSH plasmáticos se vieron afectados tanto por la irradiación, que los redujo en un 20% (t-Student, $p=0,034$; figura 19c), como por el tratamiento con EPL que los aumentó en un 21% (U-Mann-Whitney, $p=0,023$; figura 19b). Por tanto, el grupo tratado no irradiado fue el que presentó unos mayores niveles de GSH. Sin embargo, en las comparaciones por grupos, sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con EPL (U-Mann-Whitney; figura 19a).

Se observó que el tratamiento con EPL afectó a los niveles de GSSG plasmático reduciéndolos en un 22%, esta diferencia se apreció tanto en el análisis conjunto (t-Student, $p<0,001$; figura 20b), como en las comparaciones entre los grupos de estudio (t-Student; figura 20a).

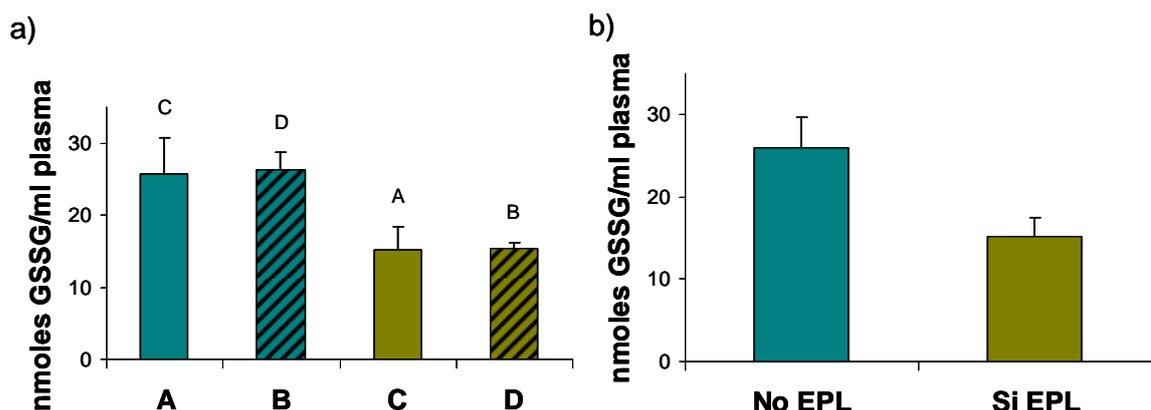


Figura 20: niveles de GSSG plasmático **a)** según los grupos de estudio (t-Student); **b)** en función del tratamiento, diferencia significativa (t-Student); ($p<0,05$).

El ligero aumento del GSH plasmático en los grupos tratados con EPL y la disminución de los niveles de GSSG en los mismos condujeron a un aumento significativo de la razón GSH/GSSG plasmática de los grupos tratados con el extracto, lo que se observó en el análisis por grupos (U-Mann-Whitney; figura 21a) y en el análisis conjunto (U-Mann-Whitney, $p<0,001$; figura 21b).

Estudio 2

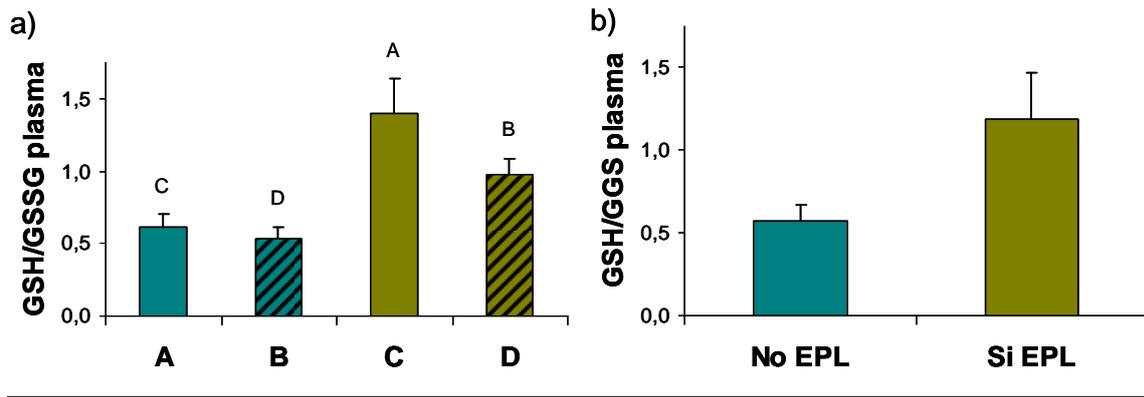


Figura 21: balance de glutaciones plasmáticos: a) según los grupos de estudio (U-Mann-Whitney); **b)** en función del tratamiento, diferencia significativa (U-Mann-Whitney); ($p < 0,05$).

2.1.2. Resultados de parámetros evaluados en fracción soluble de epidermis

Proteína

	A	B	C	D
Proteína (mg/g tejido)	38,25±4,41	38,37±4,46	36,54±4,10	34,60±3,38

Tabla 5: valores de la proteína presente en la piel en los distintos grupos de estudio (media ± desviación típica, N=5).

Como se muestra en la tabla 5, los grupos tratados con EPL presentaron unos niveles de proteína por tejido ligeramente inferiores a los grupos no tratados, sin embargo no se observaron diferencias significativas debidas al tratamiento. Tampoco se detectaron diferencias debidas a la irradiación ni en las comparaciones entre grupos.

Actividades enzimáticas

En la tabla 6 se recogen los valores de las actividades enzimáticas de la fracción soluble de epidermis de los cuatro grupos de estudio.

	A	B	C	D
SOD (U/mg prot)	11,18±3,15	11,71±0,94	11,82±1,27	11,47±2,14
CAT (U/mg prot)^T	47,10±19,36	33,15±5,11 _D	65,29±10,44	58,58±9,27 _B
GST (mU/mg prot)	10,46±1,73	10,70±2,15	9,62±3,09	13,71±3,08
GR (mU/mg prot)	8,94±1,74	10,96±1,00	11,11±1,85	9,80±2,34
GPx (U/mg prot)^T	41,54±3,57 _C	38,40±4,19 _D	56,64±7,24 _A	51,36±3,38 _B

Tabla 6: valores de actividades enzimáticas de la fracción soluble de epidermis de los distintos grupos de estudio (media ± desviación típica, N=5). **T** variables que muestran diferencias estadísticas debidas al tratamiento (t-Student); las letras en subíndice (A-D) indican los grupos que presentan diferencias significativas entre sí (t-Student); (p<0,05).

Estudio 2

La expresión de las actividades enzimáticas se ha expresado en función de la proteína y en función del tejido correspondiente a cada muestra. Como se ha visto anteriormente, a pesar de que los grupos tratados mostraron unos niveles ligeramente inferiores de proteína, dicha variable no mostró diferencias estadísticamente significativas ni entre los grupos de estudio, ni debidas a alguno de los dos factores. Por lo que consideramos que la expresión de las variables estudiadas en la epidermis ha de expresarse en función de la proteína presente.

La actividad superóxido dismutasa no mostró diferencias debidas a los factores de estudio ni se observaron diferencias entre los grupos.

El tratamiento con EPL aumentó un 54% los niveles de actividad catalasa epidérmica (t-Student, $p=0,001$; figura 22b); en las comparaciones por grupos, esta observación sólo se apreció entre los grupos irradiados (figura 22a); probablemente debido a la gran dispersión de los valores del grupo control (t-Student).

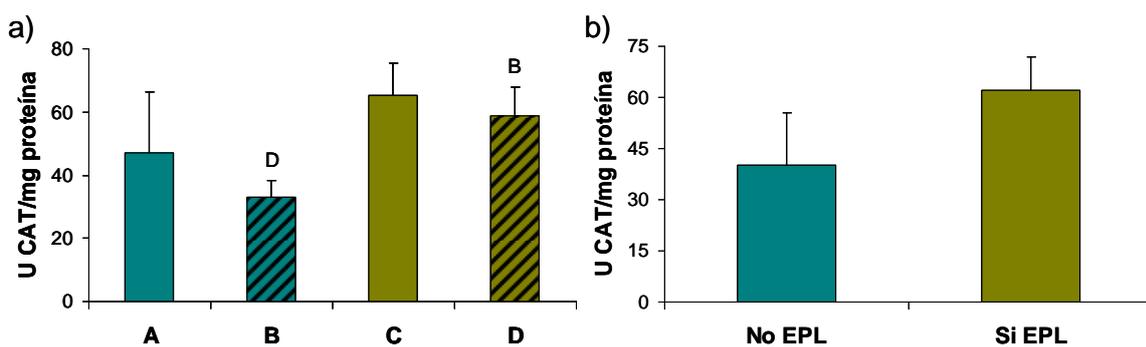


Figura 22: niveles de actividad catalasa de la fracción soluble de epidermis, **a)** según los grupos de estudio (significación estadística según t-Student), **b)** en función del tratamiento con EPL; (t-Student, $p=0,001$).

Los niveles de actividad glutatión S-transferasa epidérmica no se vieron afectados por ninguno de los dos factores de estudio, ni se observaron diferencias significativas entre los cuatro grupos de animales a pesar de que el grupo tratado con EPL e irradiado mostró niveles un 33% más elevados que los demás grupos.

La actividad glutatión reductasa epidérmica de los animales no tratados e irradiados fue superior que la de sus controles no irradiados. El tratamiento con EPL también aumentó los niveles de actividad GR en el grupo tratado y no irradiado respecto a su control no tratado, aunque esta diferencia no alcanzó la significación estadística.

El tratamiento con EPL aumentó los niveles de actividad de la glutatión peroxidasa epidérmica, siendo, en conjunto, dicho aumento de un 35% (t-Student, $p < 0,001$; figura 23b). Este efecto del EPL también mostró diferencias significativas en las comparaciones entre grupos, tanto entre los irradiados como entre los no irradiados (t-Student; figura 23a).

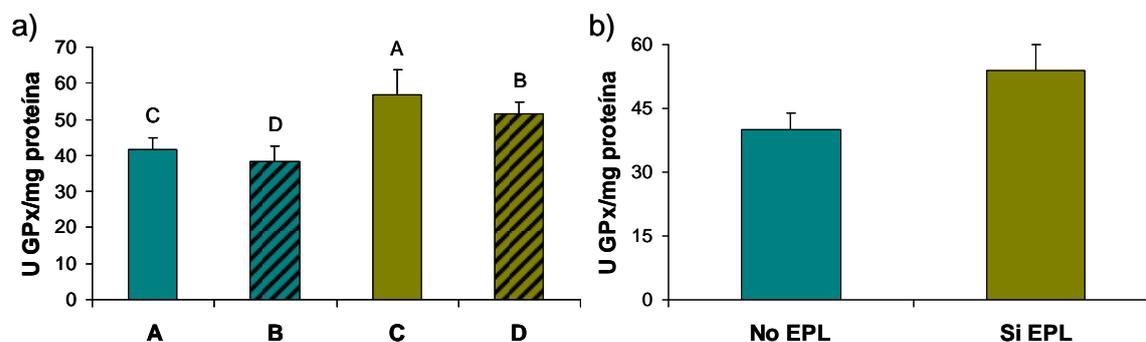


Figura 23: niveles de actividad GPx de la fracción soluble de epidermis: a) según los distintos grupos de estudio (t-Student); b) en función del tratamiento (t-Student); ($p < 0,05$).

Niveles de glutaciones en fracción soluble de epidermis

En la tabla 7 se muestran los valores de los niveles de glutaciones de la fracción soluble de epidermis de los cuatro grupos de estudio.

	A	B	C	D
GSH (nmoles/mg prot) ^R	20,55±0,75 _{BC}	15,98±2,73 _A	23,17±5,06 _{AD}	16,81±1,11 _C
GSSG (nmoles/mg prot) ^{RT}	20,82±1,85 _{BC}	14,91±2,12 _{AD}	10,58±0,74 _A	8,93±2,36 _B
GSH/GSSG ^T	0,99±0,12 _C	1,08±0,19 _D	2,41±0,25 _A	2,04±0,77 _B

Tabla 7: valores del contenido de glutaciones en fracción soluble de epidermis (media ± desviación típica, N=5). **R** variables que muestran diferencias estadísticas debidas a la irradiación (t-Student o U-Mann-Whitney); **T** variables que muestran diferencias estadísticas debidas al tratamiento (t-Student o U-Mann-Whitney); las letras en subíndice (A-D) indican los grupos que presentan diferencias significativas entre sí (t-Student o U-Mann-Whitney): ($p < 0,05$).

La RUV redujo los niveles de GSH en la fracción soluble de epidermis de ambos grupos irradiados respecto a sus controles no irradiados (t-Student; figura 24a), siendo también significativa la diferencia en el análisis conjunto en función de la radiación (t-Student, $P = 0,001$) que alcanzó un valor un 25% menor en los grupos irradiados.

Estudio 2

El tratamiento con EPL redujo los niveles les de GSSG en fracción soluble de epidermis, lo que se observó tanto en el estudio por grupos (t-Student; figura 24b) como en el análisis por factores (U-Mann-Whitney, $p < 0,001$), siendo dicha reducción de un 45%.

Ponderando estos resultados se llegó a una relación GSH/GSSG significativamente mayor en los animales tratados con EPL (figura 24c). El grupo que más baja relación GSH/GSSG presentó fue el control, pudiendo explicarse por presentar una menor tasa de actividad GR que los demás grupos.

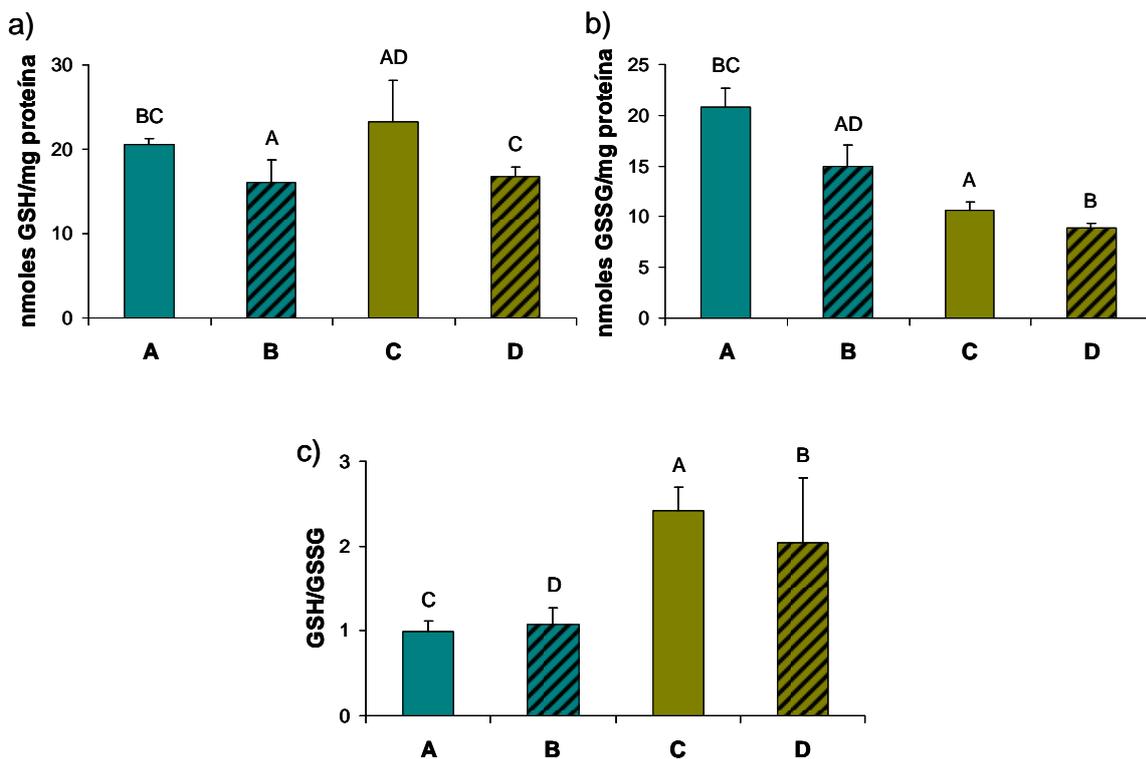


Figura 24: niveles de glutaciones en epidermis según los grupos de estudio; **a)** contenido de GSH; **b)** contenido de GSSG y **c)** relación entre ambos glutaciones (GSH/GSSG); (t-Student o U-Mann-Whitney; $p < 0,05$).

2.1.3. Recuento del número de células de Langerhans

En la tabla 8 se recogen los resultados del recuento del número de células de Langerhans en la epidermis de los cuatro grupos de estudio.

	A	B	C	D
CL (CL/mm²)^T	348,0±45,6 _B	276,6±39,4 _{AD}	403,5±114,7	402,3±45,3 _B

Tabla 8: Valores de células de Langerhans (media ± desviación típica, N=5). por unidad de superficie de epidermis que presentan los distintos grupos de estudio. ^T variables que muestran diferencias estadísticas debidas al tratamiento (t-Student); letras en subíndice (A-D) indican los grupos que presentan diferencias significativas entre sí (test t-Student); (p<0,05).

El grupo irradiado no tratado mostró un 21% menos células de Langerhans que el grupo control (t-Student, p=0,029), lo que demostró que la RUV reduce el número de estas células presentes en la epidermis. En cambio, en los grupos tratados con el EPL no se observó diferencias entre el irradiado y el no irradiado; además, el grupo tratado con EPL e irradiado mostró diferencias significativas respecto al irradiado no tratado (t-Student, p=0,010; figura 25). Este hecho demostró el efecto protector del EPL al prevenir la reducción del número de células de Langerhans inducido por la radiación.

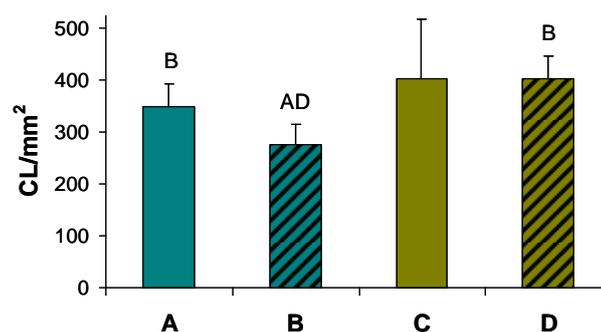


Figura 25: células de Langerhans presentes en la epidermis de los distintos grupos de estudio (t-Student; p<0,05).

Estudio 2

2.2. Discusión del estudio 2

Se han analizado respuestas antioxidantes diferentes frente a la exposición a la RUV y el efecto del EPL en dichas respuestas. La irradiación provocó el aumento de las actividades eritrocitarias de la GST (aproximadamente un 14%) y la CAT (aproximadamente un 25%) y una reducción del contenido de GSH plasmático de aproximadamente un 25%. Estos cambios probablemente reflejen la activación de sistemas de defensa antioxidantes y el incremento del consumo del GSH para neutralizar el aumento de la producción de EROs provocada por la RUV. Se descarta la síntesis proteica *de novo* en eritrocitos, ya que éstos son células anucleadas, por lo que los efectos observados son más probablemente debidos a cambios en la actividad catalítica de los enzimas implicados como se ha observado en otras situaciones (Cervelló y col., 1994; Giralt y col., 1996). Por el contrario, el efecto más obvio de la exposición de la epidermis a la RUV fue la clara reducción del número de células de Langerhans, la cual es la causa principal de la inmunosupresión dependiente de la RUV (Aubin, 2003). La irradiación también indujo un descenso de los niveles de GSH y GSSG (Mulero y col., 2006).

Como hecho interesante, la administración de EPL durante los 7 días previos a la irradiación moduló algunos de los efectos sistémicos de la RUV. Por ejemplo, los eritrocitos de los animales tratados con el extracto mostraron una mayor resistencia frente a la hemólisis inducida por H₂O₂, lo cual se debería a la capacidad del *P. leucotomos* de evitar la peroxidación lipídica (González y Pathak, 1996; Philips y col., 2003), preservando la integridad de la membrana plasmática. Además, el tratamiento con EPL redujo la actividad de la GPx en un 12%, lo que conllevó un marcado descenso en los niveles de GSSG y, por tanto, aumentó la razón GSH/GSSG tanto en plasma como en eritrocitos. Esto fue también evidente en los animales tratados no irradiados, concordando con el efecto fotoprotector del EPL frente al proceso de oxidativo, independientemente de la RUV.

En eritrocitos, la actividad GR fue modificada por el tratamiento en los animales no irradiados. Una posible explicación es que el EPL puede inducir cambios enzimáticos alostéricos conduciendo a un estadio menos activo. Esto se observó en la valoración de la actividad GR en el grupo tratado con el extracto e irradiado, a pesar de que en este caso, la reducción de la actividad del enzima pudo ser favorecido por el acusado descenso del GSSG, substrato natural de la GR.

En epidermis, el tratamiento con EPL indujo un aumento significativo de las actividades CAT y GPx tanto en los animales irradiados como en los no irradiados (aproximadamente de un 54% y un 35%, respectivamente, al analizarse en función del factor tratamiento). Estos incrementos pueden ser indicadores de un efecto inductor del EPL sobre la síntesis de enzimática, lo cual debería confirmarse en estudios posteriores.

En conjunto, el pretratamiento oral con EPL demostró un efecto protector frente a los fenómenos dependientes de EROs mediados por la RUV, tanto en epidermis como en sangre. Estudios previos habían revelado la eficacia del EPL al contrarrestar los efectos deletéreos de la RUV en sistemas *in vitro* de cultivos celulares (Alonso-Lebrero y col., 2003; Janczyk y col., 2007) y tras aplicación tópica en modelos *in vivo* (González y col., 1997; Alcaraz y col., 1999). Lo más interesante es que la administración oral de *P. leucotomos* en humanos reduce la formación de eritema, el número de *sunburn cells* y la formación de dímeros de pirimidinas tras la exposición a la RUV (Middelkamp-Hup y col., 2004b). Otro estudio mostró que el pretratamiento con *P. leucotomos* redujo la reacción fototóxica inducida por la terapia PUVA, esto es, se redujo la infiltración mastocitaria y la vasodilatación (Middelkamp-Hup y col., 2004a). Concordando con ese estudio, el EPL impidió totalmente la reducción del número de células de Langerhans en nuestro sistema. Estos experimentos en los que las ratas *hairless* fueron irradiadas con 5J/cm² de RUV demostraron que el *P. leucotomos* no solo previene de la reducción del número de células de Langerhans, sino que también impide los cambios morfológicos inducidos por la RUV como es la pérdida de dendritas (Mallol y col., 2004). Entre las razones por las cuales el *P. leucotomos* es inmunoprotector cabe destacar la inhibición de la fotoisomerización del ácido trans-urocánico a su forma cis (Capote y col., 2006), responsable del efecto inmunosupresor. Además, el *P. leucotomos* previene la fragmentación del ADN, la condensación de la cromatina y la fijación de la anexina V debidas a la RUV en células dendríticas humanas derivadas de los monocitos, muy similares a las células de Langerhans (Norval, 2001).

En resumen, estos resultados ponen de relieve las propiedades antioxidantes y fotoimmunoprotectoras del EPL administrado oralmente en un modelo *in vivo*. Los animales tratados con EPL son menos afectados por la RUV, lo que se manifestó principalmente en la reducción de los niveles de GSSG, en una relación de GSH/GSSG más favorable y en la inhibición de la reducción del número de células de Langerhans inducida por la RUV. Actualmente, el criterio utilizado para evaluar la eficacia de los fotoprotectores se reduce a la protección frente al eritema. Nuestros resultados y los de otros autores sugieren la necesidad de extender el concepto de fotoprotección teniendo en cuenta que el daño celular

Estudio 2

aparece con dosis de RUV inferiores a las necesarias para producir eritema. La administración oral de sustancias fotoprotectoras antioxidantes proveería un excelente y sencillo complemento al recomendado uso de filtros solares tópicos.

3. ESTUDIO 3: EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE EPL EN RATONES *HAIRLESS* SOMETIDOS A RUV CRÓNICA

3.1. Resultados del estudio 3

No todos los parámetros valorados en este estudio pudieron determinarse en todos los animales de cada grupo, por lo que según se vayan exponiendo los resultados se especificará el tamaño muestral de cada experimento.

3.1.1. Observación de tumores y análisis de la supervivencia y peso de los animales del estudio de irradiación crónica:

Estudio de los tumores

Se estudiaron muestras procedentes de 7 animales de cada grupo. De los animales no irradiados se obtuvo una muestra de una región de la zona dorsal. En el caso de los animales irradiados se dispuso de dos tipos de muestras: las de las zonas periféricas que, habiendo sido irradiadas, mostraban menor daño y las de la zona central del dorso, donde se observó un mayor efecto de la RUV (figura 26). El estudio de los tumores se llevó a cabo en los cortes histológicos de la piel teñidos con hematoxilina-eosina.



Figura 26: detalle del dorso de uno de los animales irradiados, a pesar de que todo el dorso ha sido sometido a la irradiación crónica, se puede observar que en la zona central el daño es mayor que en la periferia.

Estudio 3

Histológicamente en las muestras de animales no irradiados se pudo observar claramente la estructura típica de la piel sana, diferenciándose con claridad las tres capas de la piel. La epidermis descansaba sobre una membrana basal claramente definida que la separaba de la dermis y en ella se distinguía una zona basal de células en división con núcleo picnótico, una zona superior de células más basófilas con actividad metabólica pero no mitótica y la zona escamosa formada principalmente por células queratinizadas que habían perdido el núcleo. En la figura 27 (A y D) se pueden observar dos fotos de cortes histológicos de la piel, una de cada uno de los grupos no irradiados.

Como ya se ha comentado, se diferenciaron muestras procedentes de dos zonas de la piel dorsal de animales irradiados: la línea media y la periferia. La zona central fue la que sufrió más el efecto de la RUV y en la que se desarrollaron la mayoría de los tumores. En cambio la zona periférica fue irradiada pero no mostró un desarrollo de tumores tan patente como la línea central. La histología de estas zonas periféricas menos afectadas mostró características del efecto de la radiación, principalmente hiperproliferación de la epidermis y engrosamiento de la capa córnea. Se pudieron encontrar signos aislados de transformación celular, pero en general no se pudo determinar que se tratase de tejido tumoral sino de transición a tumor o queratosis actínica. Ésta se detectó en seis de los siete animales estudiados no tratados con EPL, siendo una de ellas difusa y cinco focales. De los siete animales tratados con el extracto se presentaba claramente en dos de ellos y se observaron signos iniciales de lesión actínica en otros cuatro. Esto nos indica que el extracto de EPL retrasó la aparición de queratosis actínica. En la figura 27 (B y E) se pueden observar la epidermis en cortes histológicos teñidos mediante la técnica de hematoxilina eosina de las zonas periféricas del dorso de un animal de cada grupo irradiado.

En la zona de la línea media del dorso de los animales irradiados, más afectada por la RUV, además de la hiperproliferación epidérmica y de la hiperqueratosis, se observaron características propias de tejido tumoral. La piel perdió la arquitectura de epitelio plano pluriestratificado quedando la membrana basal indefinida. La presencia de células con capacidad de división no se limitó exclusivamente a las capas más basales, sino que pudieron observar figuras mitóticas en todo el grosor epidérmico. También se observaron células que habían perdido la relación núcleo/citoplasma, lo que indica transformación celular. En algunas zonas de la epidermis las células habían perdido la cohesión entre ellas observándose espacios vacíos.

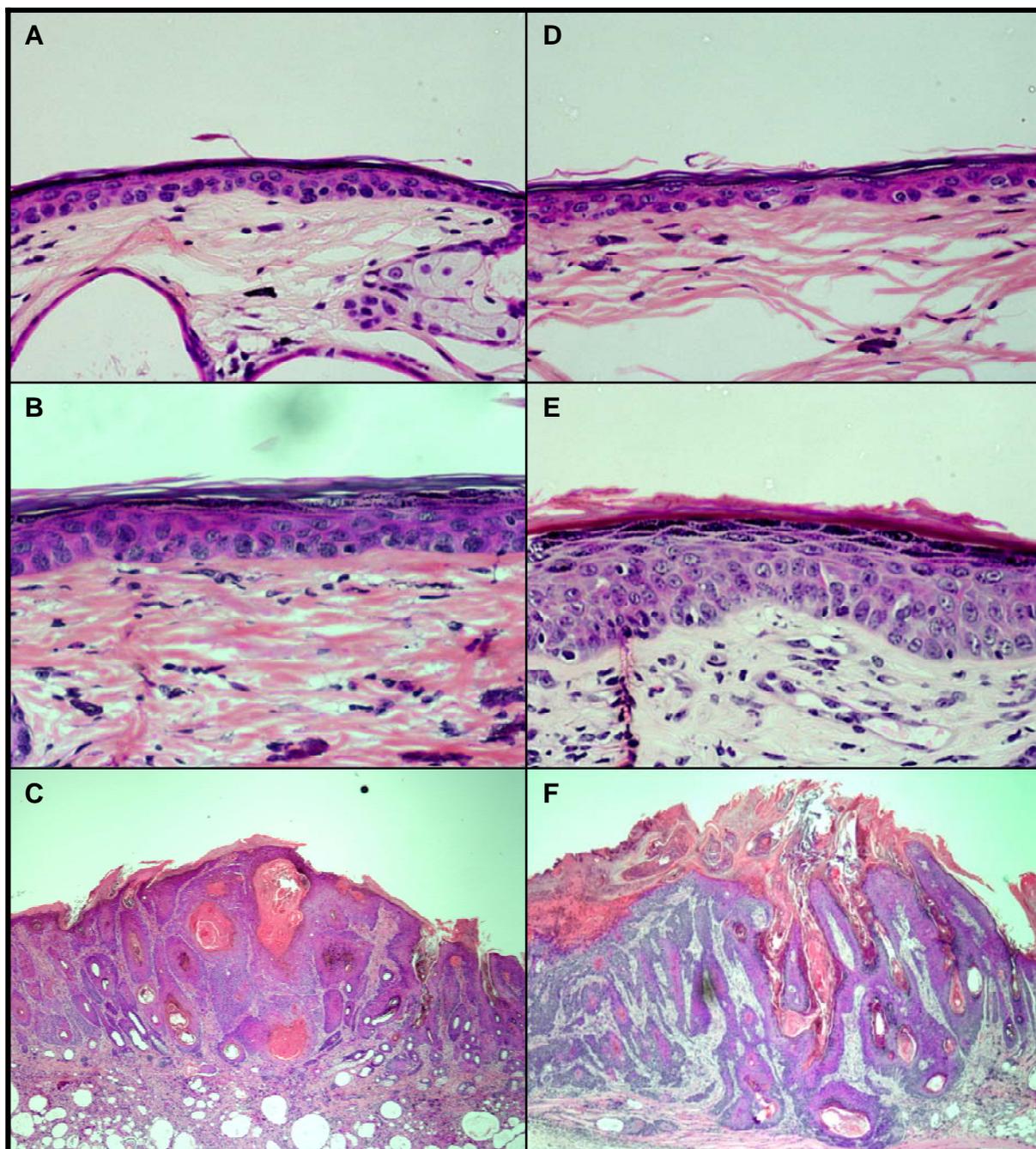


Figura 27: cortes histológicos de la piel de los animales del estudio crónico bajo la tinción de hematoxilina-eosina; se puede observar una muestra de cada grupo de estudio: A-no irradiado y no tratado con EPL; B-zona menos afectada del irradiado y no tratado con EPL; C-zona más afectada del irradiado y no tratado con EPL, D-no irradiado y tratado con EPL; E-zona menos afectada del irradiado y tratado con EPL; F-zona más afectada del irradiado y tratado con EPL.

Estudio 3

Estos animales desarrollaron carcinomas epidermoides, es decir, carcinomas de células escamosas. En algunas zonas tumorales se observaron queratinocitos en la dermis, indicando una infiltración del tejido epidérmico a la capa subyacente. En la figura 27 (C y F) se pueden observar el corte histológico teñido con hematoxilina-eosina de dos tumores epidermoides, cada uno correspondiente a cada grupo irradiado de animales.

En las zonas más afectadas por la irradiación aparecieron heridas causadas por los propios animales al rascarse. La persistencia de este comportamiento y la acción, tanto directa como indirecta, de la RUV agravaron las heridas dando lugar a úlceras. Histológicamente, se evidenciaron signos de inflamación (presencia de polimorfonucleares y eritrocitos) y de necrosis (detritus celular) en la superficie de la zona tumoral. En algunos casos la presencia de estas úlceras no permitió la valoración *de visu* de los tumores y en base a la gravedad de las mismas se estableció el sacrificio de algunos de los animales sin seguir el criterio preestablecido, por el cual el sacrificio se determinaba por la presencia de al menos un tumor de 4mm de diámetro.

Estudio de supervivencia

Para la evaluación de la influencia del tratamiento con EPL sobre la supervivencia se evaluó la edad a la que se decidió el sacrificio de cada uno de los animales irradiados, por lo tanto, el tamaño muestral de estos análisis es de 30 individuos en el grupo irradiado y tratado con EPL y de 29 individuos en el grupo irradiado no tratado con el extracto.

Inicialmente, este estudio se realizó mediante el análisis de supervivencia de Kaplan Meier, mediante el cual se comparan los animales de ambos grupos irradiados que han sido sacrificados siguiendo el criterio preestablecido (tumor de al menos 4mm de diámetro), pero considerando todos los animales que forman ambos grupos a comparar. El estadístico de Breslow asociado a este análisis indicó que las diferencias entre ambos grupos irradiados no eran estadísticamente significativas ($p=0,157$).

En la figura 28 se representa la evolución de la supervivencia de los animales de cada uno de los grupos irradiados sacrificados por el criterio preestablecido, teniendo en cuenta el total de los animales de cada uno de esos grupos, a lo largo del tiempo. Entre ambos grupos de animales se observa una tendencia de los irradiados y tratados con EPL a presentar una mayor supervivencia que los irradiados y no tratados con EPL. Sin embargo,

como se vio por el test de Breslow del análisis de Kaplan-Meier, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

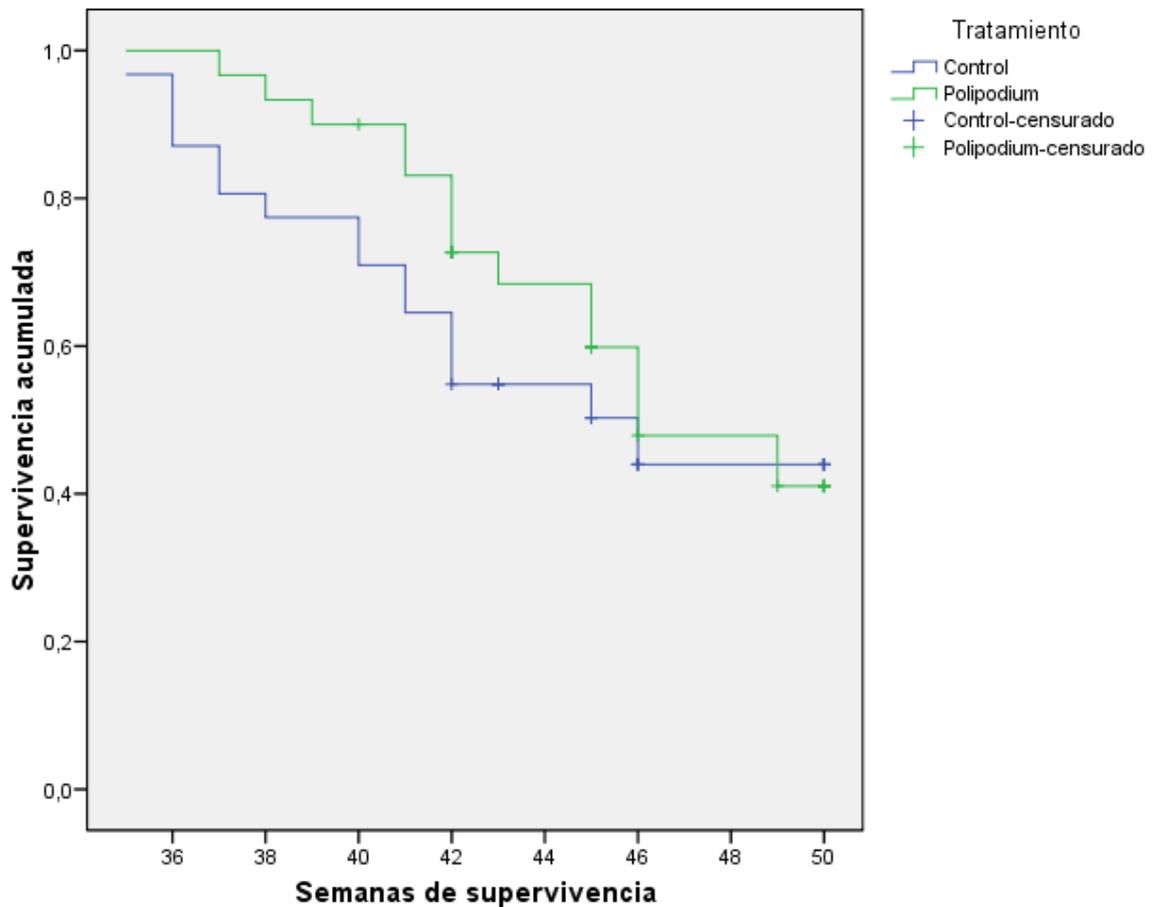


Figura 28: función de la supervivencia de los animales sacrificados en base al criterio de sacrificio respecto al total en función del tiempo.

Como se puede observar en la misma figura 28, alrededor de un 40% de los animales de ambos grupos fueron sacrificados por un criterio distinto al previamente establecido (presencia de un tumor de al menos 4mm de diámetro). Sin duda, estos altos niveles de casos censurados afectaron a la sensibilidad del análisis estadístico.

Con el fin de evitar el efecto del elevado número de animales censurados, se realizó un segundo análisis de los datos de supervivencia en el cual se tuviesen sólo en cuenta los animales sacrificados en base al criterio preestablecido, sin la interferencia de los animales sacrificados por otros criterios. Sin embargo, la realización de este análisis era sólo justificable si la causa de la distorsión afectaba a ambos grupos irradiados por igual. Para valorar esto, se sometieron todos los datos de supervivencia de ambos grupos irradiados a la

Estudio 3

prueba exacta de Fisher, para lo cual se formaron subgrupos en función de la causa de sacrificio. Las comparaciones realizadas por esta prueba indicaron la ausencia de diferencias significativas entre los cuatro subgrupos, siendo $p=0,7997$ y el riesgo relativo de 1,106. Por lo tanto, el factor de distorsión afectaba a ambos grupos por igual, pudiendo compararse los conjuntos de animales sacrificados en base al criterio preestablecido de ambos grupos irradiados.

Los nuevos grupos de estudio, formados por los animales irradiados y sacrificados conforme al criterio preestablecido de presentar al menos un tumor de 4mm de diámetro, presentaron unos tamaños muestrales de 16 individuos en el grupo no tratado con EPL y 14 individuos en el grupo tratado con el extracto.

Dado que ambos grupos siguen una distribución normal para la variable tiempo de supervivencia, se realizó la comparación mediante la prueba t-Student, que demostró la existencia de diferencias significativas entre ambos grupos, con un valor de $p=0,023$ a favor de una mayor supervivencia de los animales tratados con EPL. Concretamente, el valor medio de supervivencia de los animales tratados con EPL fue de $42,6\pm 3,4$ semanas (rango de 37 a 49), mientras que la supervivencia del grupo no tratado con EPL fue de $39,6\pm 3,3$ (rango de 35 a 46).

En la figura 29 se puede observar la evolución de la supervivencia a lo largo del tiempo de los animales irradiados sacrificados en base al criterio de presentar al menos un tumor de 4mm de diámetro.

En la figura 30 se representan los percentiles de supervivencia de los animales sacrificados en base al criterio preestablecido, es decir, la edad media medida en semanas en la que cada uno de los grupos irradiados alcanzó el 75, 50 y 25% de supervivencia. Los resultados fueron los siguientes (tratado/no tratado): para un 75% 41/36 semanas, para un 50% 42/40 semanas y para un 25% y 45/42 semanas.

En los tres valores de los percentiles anteriores se puede observar que el grupo irradiado y tratado con EPL alcanza cada uno de los valores a una edad más tardía. Así pues, quedó demostrado que el EPL retrasa en tres semanas la evolución de los tumores debidos a la RUV.

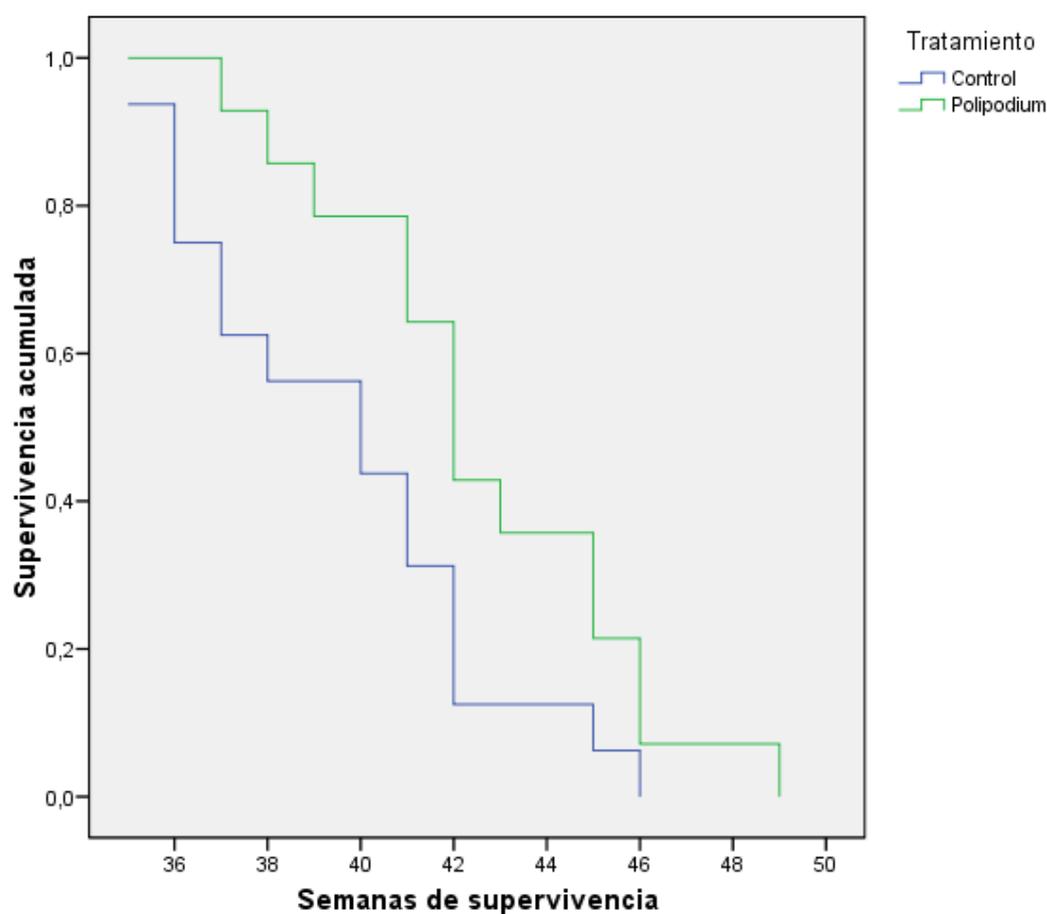


Figura 29: función de la supervivencia de los animales sacrificados en base al criterio de sacrificio preestablecido en función del tiempo.

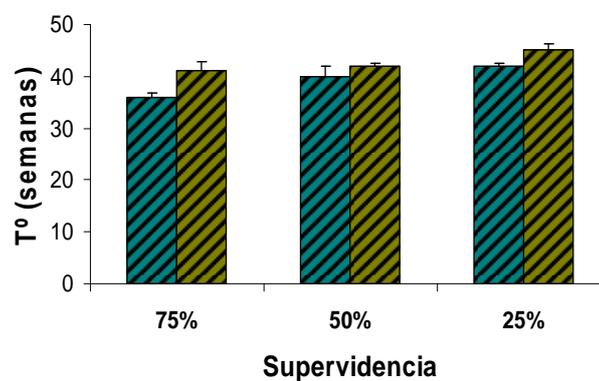


Figura 30: Percentiles de supervivencia de los animales irradiados sacrificados conforme al criterio preestablecido.

Estudio 3

Peso de los animales

El peso corporal es una variable de control rutinario en el trabajo con animales de experimentación, ya que cambios bruscos o mantenidos en el tiempo nos pueden indicar estrés sufrido por los animales. En nuestro estudio, los animales no mostraron cambios bruscos del peso corporal a lo largo del estudio.

	A	B	C	D
Peso (g)^R	26,9±2,9 _B	24,6±2,3 _{AD}	26,7±2,4	25,8±2,2 _B

Tabla 9: valores del peso de los cuatro grupos de animales el día de sacrificio (media ± desviación típica; N=29, excepto grupo C de N=30); **R** indica que la variable está influenciada por la radiación (t-Student); las letras en subíndice indica los grupos que muestran diferencias significativas entre sí (t-Student, p<0,05).

Sin embargo, el análisis de los pesos que presentaron los animales el día de sacrificio (tabla 9) mostró diferencias significativas tanto en las comparaciones entre grupos como en el estudio por factores (t-Student, p=0,001), concretamente por la irradiación. Los animales del grupo irradiado y no tratado con EPL mostraron diferencias significativas respecto a los pesos de los animales del grupo no irradiado y no tratado con EPL, siendo la RUV la responsable del menor peso corporal de los animales irradiados. Los pesos de los animales irradiados y tratados con EPL no mostraron diferencias significativas con los grupos no irradiados y, en cambio, sí las mostraron con el grupo irradiado no tratado con EPL, por lo que se pudo concluir que el tratamiento con EPL previno de esta disminución del peso inducida por la irradiación (ver figura 31). El tamaño muestral de este análisis fue de 30 individuos en el grupo de animales irradiados y tratados con EPL y de 29 individuos en los otros tres grupos.

Resultados

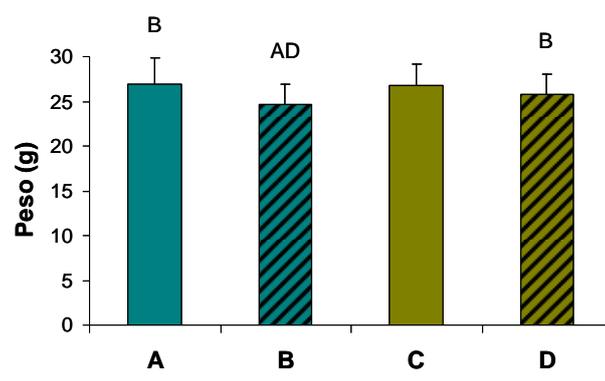


Figura 31: valores del peso de los animales el día de sacrificio (t-Student; $p < 0,05$).

Estudio 3

3.1.2. Parámetros relacionados con el estrés oxidativo en sangre de los animales del estudio de irradiación crónica

	A	B	C	D
Hemoglobina (g/100ml sangre) ^R	12,2±1,3 (29)	11,5±1,2 (29)	12,3±1,1 (27)	11,4±2,0 (29)
Hematocrito (%)	38,3±2,4 (29)	37,4±2,4 (28)	38,3±2,8 (27)	37,2±3,3 (29)
Hemólisis inducida (%)	83,1±22,2 (29)	83,7±14,0 (28)	63,4±32,6 (28)	82,5±23,4 (29)

Tabla 10: valores de las determinaciones bioquímicas de parámetros sanguíneos generales (media ± desviación típica, los valores entre paréntesis indican el número de casos). **R** indica la existencia de diferencias debidas a la radiación (t-Student; p<0,05).

Hemoglobina y hematocrito

En la tabla 10 se muestran los resultados de las determinaciones de la hemoglobina, el hematocrito y la hemólisis inducida por H₂O₂ en cada uno de los grupos de estudio. Se observó una tendencia de los grupos irradiados a mostrar menores niveles de hemoglobina y hematocrito. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas en el estudio por grupos. El estudio por factores reveló la influencia de la radiación sobre los valores de

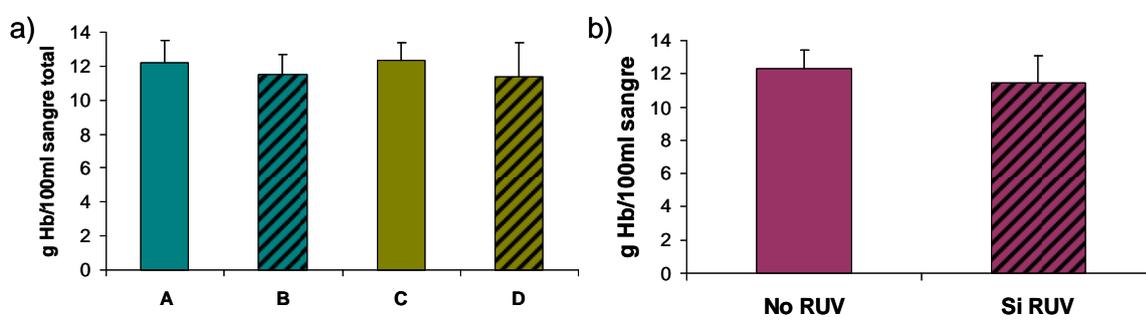


Figura 32: niveles de hemoglobina (media ± desviación típica) **a)** en los grupos de estudio; **b)** agrupados según la irradiación, diferencia estadística según t-Student (p=0,006).

hemoglobina presente en sangre (t-Student, p=0,006; figura 32a), siendo dicha reducción de un 8% en los grupos irradiados en conjunto, respecto a los no irradiados (figura 32b).

Una posible explicación a este fenómeno sería que la RUV aumentase la fragilidad de la membrana eritrocitaria facilitando la pérdida de hemoglobina.

Resistencia a la hemólisis inducida por H₂O₂

En el análisis del porcentaje de hemólisis inducida por el peróxido de hidrógeno (N=12) no se observaron diferencias significativas entre los cuatro grupos, considerados por separado. No obstante, destacó el hecho de que el grupo tratado con EPL y no irradiado presentó un porcentaje de hemólisis más bajo que los otros tres grupos, aunque sin alcanzar la significación estadística. Esta falta de significación estadística pudo ser debida al elevado valor de la desviación estándar en dicho grupo, como consecuencia de algunos valores individuales de hemólisis mucho más bajos que en los otros grupos. Este resultado se podría explicar por el efecto antioxidante del EPL que protegería a la membrana eritrocitaria del efecto inducido por el peróxido de hidrógeno. En el grupo tratado con EPL e irradiado también se presentaron valores bajos de hemólisis, aunque en un menor número de animales. Puesto que la radiación ultravioleta pudo facilitar la hemólisis inducida por el peróxido de hidrógeno, en el grupo irradiado y tratado con EPL, el valor medio del porcentaje de hemólisis no fue distinto del observado en los dos grupos no tratados con EPL (figura 33).

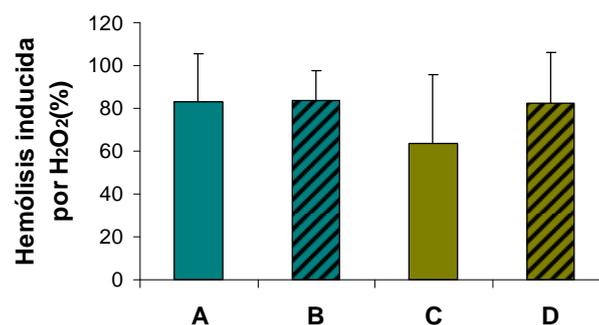


Figura 33: niveles de hemólisis inducida por H₂O₂ en los cuatro grupos de estudio (media ± desviación típica).

Estudio 3

Actividades enzimáticas

La tabla 11 recoge los valores de las actividades enzimáticas eritrocitarias de los cuatro grupos de estudio.

	A	B	C	D
SOD (kU/g Hb)	2,01±0,41 (10)	1,71±0,54 (9)	1,58±0,64 (11)	1,67±0,66 (11)
CAT (kU/g Hb)	66,3±17,6 (10)	65,3±25,1 (10)	62,9±14,9 (11)	60,7±17,4 (11)
GST (U/g Hb) ^R	3,38±1,21 (12)	4,53±1,88 (12)	3,18±0,78 (12)	4,79±2,54 (12)
GR (U/g Hb)	8,80±2,71 (10)	8,55±1,04 (10)	7,46±1,53 (11)	8,39±2,06 (11)
GPx (U /g Hb) ^T	179,8±33,1 (10)	177,8±28,8 (10)	150,9±33,2 (11)	160,5±36,0 (11)

Tabla 11: valores de las actividades enzimáticas eritrocitarias de los cuatro grupos de estudio (media ± desviación típica, los valores entre paréntesis indican el número de casos); **T** indica que la variable muestra diferencias estadísticamente significativas al debidas tratamiento; **R** indica la existencia de diferencias debidas a la radiación (t-Student o U-Mann-Whitney; p<0,05).

Las actividades enzimáticas eritrocitarias superóxido dismutasa y catalasa no mostraron diferencias significativas ni en el análisis por grupos ni por factores. Sin embargo, en ambos casos el grupo control presentó unos niveles de actividad de ambos enzimas más elevados que los demás grupos y se observó una tendencia de los grupos tratados a presentar una menor actividad que los no tratados.

La actividad glutatión S-transferasa eritrocitaria, no mostró diferencias significativas en las comparaciones por grupos (figura 34a). En cambio, el estudio por factores indicó que la radiación influyó significativamente en la variable aumentando su valor. Así, los dos grupos de animales irradiados en conjunto presentaron valores de actividad GST un 42% superiores a los de los dos grupos de animales no irradiados (U-Mann-Whitney, p=0,026; figura 34b).

La actividad glutatión reductasa eritrocitaria no mostró diferencias significativas entre grupos, ni debidas a ninguno de los dos factores.

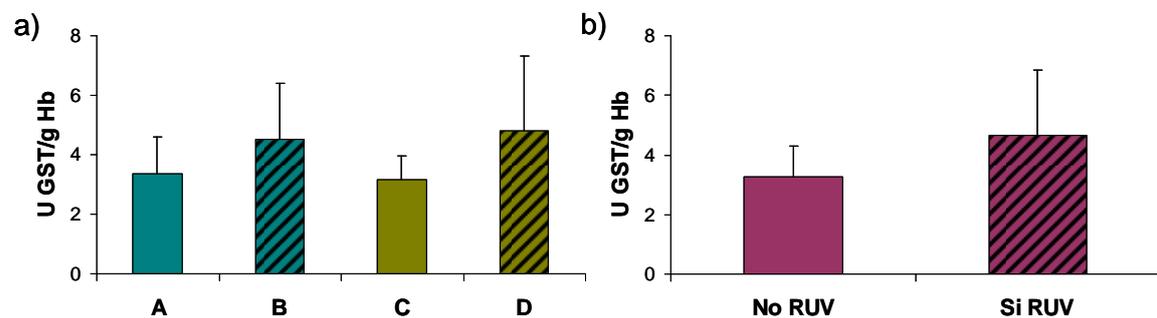


Figura 34: valores de actividad GST (media \pm desviación típica); **a)** de los grupos de estudio; **b)** agrupados en función de la radiación (U-Mann-Whitney, $p=0,026$).

La actividad glutatión peroxidasa eritrocitaria no mostró diferencias significativas en las comparaciones iniciales entre los cuatro grupos individualmente (t-Student; figura 35a), pero se observó una tendencia de los grupos tratados con EPL a mostrar unos niveles de actividad GPx menores que los de los grupo no tratados. Esto se corroboró con el análisis por factores, observándose diferencias significativas en función del tratamiento (t-Student, $p=0,026$; figura 35b) siendo en los grupos tratados un 13% menor que en los no tratados, debiéndose probablemente a que el extracto indujo un estado de reposo oxidativo.

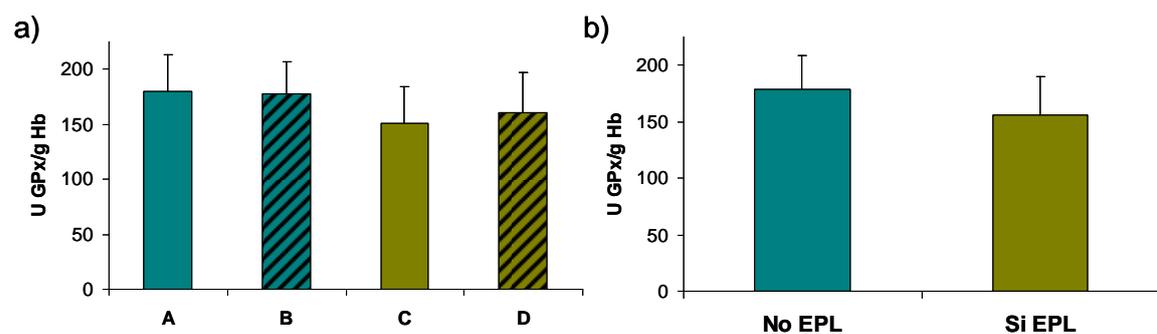


Figura 35: niveles de actividad GPx eritrocitarias (media \pm desviación típica); **a)** según los grupos de estudio; **b)** según el tratamiento (T-Student, $p=0,026$).

Estudio 3

Niveles de glutaciones sanguíneos

- Glutaciones eritrocitarios: en la tabla 12 se muestran los niveles glutaciones eritrocitarios de los cuatro grupos de estudio.

	A	B	C	D
GSH (µmoles/g Hb)	0,73±0,65 (14)	0,87±0,75 (14)	0,67±0,68 (15)	0,83±0,70(15)
GSSG (µmoles/g Hb) ^T	1,85±0,60 (14)	1,94±0,89 (14)	1,38±0,65 (15)	1,74±1,12 (15)
GSH/GSSG	0,51±0,55(14)	0,61±0,69 (14)	0,69±0,79 (15)	0,55±0,53 (15)

Tabla 12: Valores de los glutaciones eritrocitarios en los cuatro grupos de estudio (media ± desviación típica, los valores entre paréntesis indican el número de casos); **T** indica que la variable muestra diferencias estadísticamente significativas debidas al tratamiento (U-Mann-Whitney; p<0,05).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio en los niveles de GSH ni de GSSG eritrocitarios (figura 36a), como tampoco en la relación entre ambas formas del glutatión. El grupo tratado con EPL no irradiado fue el que presentó menores niveles de GSH y de GSSG de todos los grupos. Esto pudo deberse a la capacidad antioxidante del extracto en cuya presencia no se necesitaría grandes niveles de GSH, por lo que se requeriría menos síntesis y menos reciclaje de esta molécula y, al no requerirse tanto el GSH, se acumuló menos GSSG. Además, los bajos niveles de actividad glutatión peroxidasa en los grupos tratados redujeron la generación de GSSG. Por la misma razón se explicaría que los valores de GSH y GSSG del grupo tratado con EPL e irradiado, fuesen ligeramente algo más bajos que los de su control no tratado con EPL e irradiado.

En el estudio por factores, se demostró la influencia del tratamiento con EPL en la reducción de los niveles de GSSG eritrocitario, al mostrar diferencias estadísticamente significativas (U-Mann-Whitney, p=0,037, figura 36b).

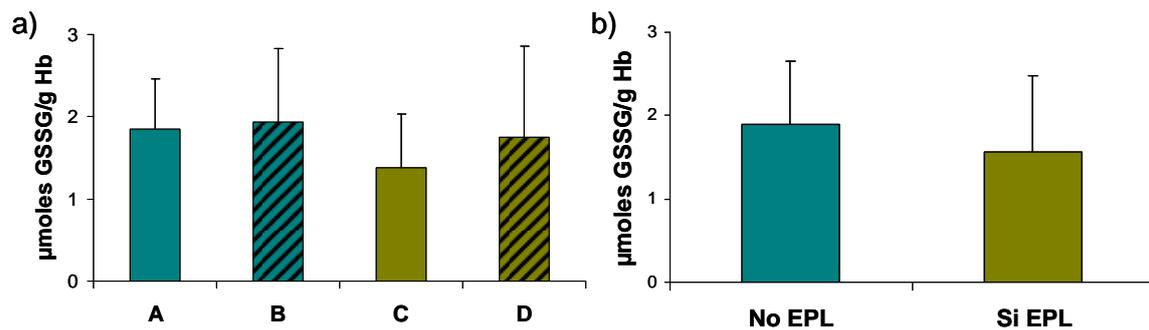


Figura 36: niveles de glutatión oxidado eritrocitario (media \pm desviación típica); **a)** según los grupos de estudio; **b)** agrupados según el tratamiento (U-Mann-Whitney, $p=0,037$).

- Glutationes plasmáticos: en la tabla 13 se muestran los niveles glutaciones plasmáticos de los cuatro grupos de estudio.

	A	B	C	D
GSH (nmoles/ml plasma)	10,1 \pm 4,5 (14)	14,8 \pm 9,2 (14)	13,7 \pm 5,6 (15)	13,2 \pm 8,8 (15)
GSSG (nmoles/ml plasma)	24,4 \pm 5,3 (14)	24,5 \pm 5,7 (14)	26,1 \pm 8,9 (15)	26,5 \pm 10,5 (15)
GSH/GSSG	0,42 \pm 0,19 (14)	0,61 \pm 0,35 (14)	0,59 \pm 0,29 (15)	0,53 \pm 0,29 (15)

Tabla 13: Valores de los glutaciones plasmáticos en los cuatro grupos de estudio (media \pm desviación típica, los valores entre paréntesis indican el número de casos); no se observaron diferencias significativas entre grupo, ni debidas al efecto de ninguno de los factores.

Los niveles de glutaciones plasmáticos no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio, ni debidas a los factores de estudio. Se observó una tendencia de los grupos tratados al aumento de los niveles de GSSG plasmático, pero dicha diferencia no alcanzó la significación estadística.

Estudio 3

Valoración de la capacidad antioxidante del plasma por el método ORAC

	A	B	C	D
ORAC (µmoles TE/ml plasma total) ^T	4,31±2,37 (10)	4,52±2,90 (10)	5,69±2,88 (11)	6,51±2,55 (11)
ORAC (µmoles TE/ml plasma libre de proteínas)	0,30±0,14 (10)	0,34±0,17 (10)	0,36±0,10 (11)	0,35±0,09 (11)

Tabla 14: valores de capacidad de inhibición de los radicales peroxilo del plasma nativo y libre de proteínas de cada grupo de estudio (media ± desviación estándar, los valores entre paréntesis indican el número de casos); T indica que la variable muestra diferencias estadísticamente significativas debidas al tratamiento (t-Student; p<0,05).

En cuanto a la capacidad antioxidante del plasma determinada por el método ORAC, cuyos valores se recogen en la tabla 14, no se observaron diferencias significativas entre los cuatro grupos de animales, tanto en la valoración del plasma nativo como en el plasma libre de proteínas. Esta ausencia de significación en el estudio por grupos pudo deberse a la gran dispersión de las muestras.

Al analizar los datos en función de los factores, se observó una tendencia del plasma total de los grupos tratados con EPL a mostrar una mayor capacidad antioxidante respecto a los no tratados. Esta observación se hizo significativa en el estudio por factores (t-Student, p=0,045; figura 37b).

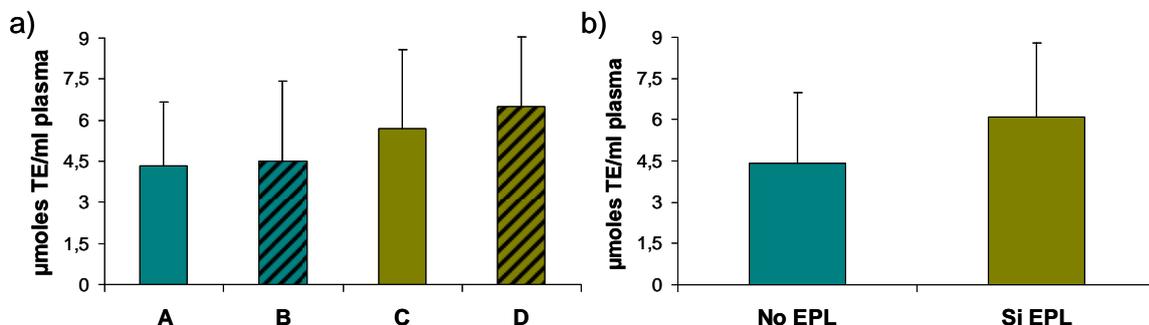


Figura 37: representación de los valores de la capacidad antioxidante plasmática por el método ORAC; a) según los grupos de estudio; b) según el factor tratamiento (t-Student, p<0,05).

Resultados

En la valoración de la capacidad antioxidante del plasma libre de proteínas se observó una tendencia en los grupos tratados con EPL a presentar una mayor actividad ORAC que en sus respectivos controles no tratados, las diferencias mostradas no alcanzaron la significación estadística. Esto pudo explicarse por dos mecanismos: por un lado, que los componentes funcionales del EPL hubieran precipitado con el TCA junto con las proteínas. Por otro lado, que la capacidad antioxidante aumentada del plasma total en los animales tratados con EPL se debiese a un aumento de la expresión o actividad de proteínas y, por tanto, los valores de capacidad antioxidante del plasma tratado con TCA no mostrasen diferencias.

Estudio 3

3.1.3. Parámetros relacionados con el estrés oxidativo en fracción soluble de piel de los animales del estudio de irradiación crónica

El tamaño muestral de las determinaciones bioquímicas realizadas en la fracción soluble de piel de los animales del estudio crónico es de 12 individuos por grupo.

Proteína

	A	B	C	D
Proteína (mg/g tejido)^{RT}	13,24±2,19 (12)	13,24±2,43 _D (12)	13,56±1,12 _D (12)	18,61±3,63 _{B,C} (12)

Tabla 15: valores de la determinación de proteína en piel (media ± desviación típica, los valores entre paréntesis indican el número de casos). **R** variable que muestra diferencias estadísticas debidas a la radiación (t-Student); **T** variable que muestra diferencias estadísticas debidas al tratamiento (U-Mann-Whitney); las letras en subíndice (A-D) indican los grupos que presentan diferencias significativas entre sí (U-Mann-Whitney); (p<0,05).

En la tabla 15 se muestran los valores de proteína presente en la piel de cada grupo de estudio. Se observó que el grupo irradiado y tratado con EPL presentó unos niveles significativamente superiores a los demás grupos, siendo la diferencia de un 40%. Esto demostró la influencia simultánea de los dos factores de estudio (U-Mann-Whitney), como se puede ver en la figura 38. Se desconoce la causa de este aumento de los niveles de proteína soluble en este grupo, pero debido a la magnitud del mismo se supuso que podía tratarse de proteínas estructurales de la dermis (colágeno y elastina). Este hecho provocó que ambos análisis estadísticos realizados en función de los factores de estudio mostrasen diferencias significativas siendo p=0,010 según la radiación (t-Student) y p=0,011 según el tratamiento (U-Mann-Whitney).

El hecho de que la proteína presente en el grupo irradiado y tratado con EPL fuese superior al de los demás grupos, condicionó los resultados de las determinaciones expresados en función de la cantidad de proteína presente en la muestra, disminuyéndolos relativamente respecto a los valores de los demás grupos; esta interferencia no ocurría al expresar los mismos resultados en función de la masa de tejido.

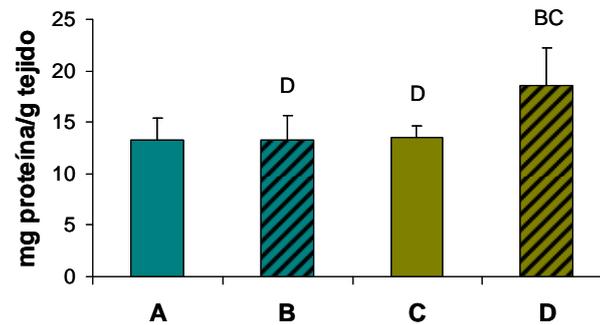


Figura 38: valores de proteína por masa de tejido en los cuatro grupos de estudio (U-Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Actividades enzimáticas

La tabla 16 recoge los valores de las actividades enzimáticas de los cuatro grupos de estudio.

La actividad superóxido dismutasa no mostró diferencias significativas ni entre los cuatro grupos de animales, ni agrupándolos por factores de estudio.

Un ejemplo de la distorsión creada por los niveles de proteína en la expresión de los resultados fueron los niveles de actividad catalasa (figura 39) y glutatión S-transferasa (figura 40). Los niveles de estos enzimas en el grupo tratado con EPL e irradiado, expresados por mg de proteína, fueron significativamente menores que en los otros grupos, mientras que por g de tejido no se encontraron diferencias significativas. En el estudio por factores se observó que la radiación redujo la actividad CAT expresada por mg de proteína (U-Mann-Whitney, $p = 0,023$) y el tratamiento con EPL redujo a la actividad GST expresada también por mg de proteína (t-Student, $P = 0,007$).

Estudio 3

	A	B	C	D
SOD (U/mg proteína)	24,74±6,36 (12)	25,47±7,33 (12)	23,70±7,11 (12)	21,49±6,69 (11)
SOD (U/g tejido)	319,80±65,64 (12)	336,95±117,50 (12)	320,45±93,62 (12)	394,50±117,16 (11)
CAT (U/mg proteína)^R	50,30±9,73 (12)	50,69±17,51 (12)	49,50±9,35 _D (12)	37,74±9,64 _C (12)
CAT (U/g tejido)	242±81 (12)	216±30 (12)	227±45 (12)	233±56 (12)
GST (U/mg proteína)^T	0,36±0,05 (12)	0,36±0,07 _D (12)	0,34±0,08 _D (12)	0,26±0,06 _{B,C} (11)
GST (U/g tejido)	4,71±0,66 (12)	4,60±0,81 (12)	4,57±1,25 (12)	4,83 ±1,13 (11)
GR (mU/mg proteína)	86,93±68,62 _B (8)	181,27±55,21 _{A,D} (7)	109,53±80,04 (11)	98,49±64,83 _B (10)
GR (U/g tejido)^R	1,07±0,82 _B (8)	2,52±0,77 _A (7)	1,48±1,10 (11)	1,71±1,05 (10)
GPx (mU/mg proteína)^R	121,05±32,31 _B (12)	168,68±37,38 _A (12)	120,01±29,80 (12)	138,85±36,44 (12)
GPx (U/g tejido)^R	1,56±0,32 _B (12)	2,17±0,41 _A (12)	1,63±0,45 _D (12)	2,60±0,87 _C (12)

Tabla 16: niveles de actividad enzimática en la fracción soluble de piel de los distintos grupos de estudio (media ± desviación típica, los valores entre paréntesis indican el número de casos). **R** variables que muestran diferencias estadísticas debidas a la irradiación (t-Student/U-Mann-Whitney); **T** variables que muestran diferencias estadísticas debidas al tratamiento (t-Student/U-Mann-Whitney); las letras en subíndice (A-D) indican los grupos que presentan diferencias significativas entre sí (t-Student); (p<0,05).

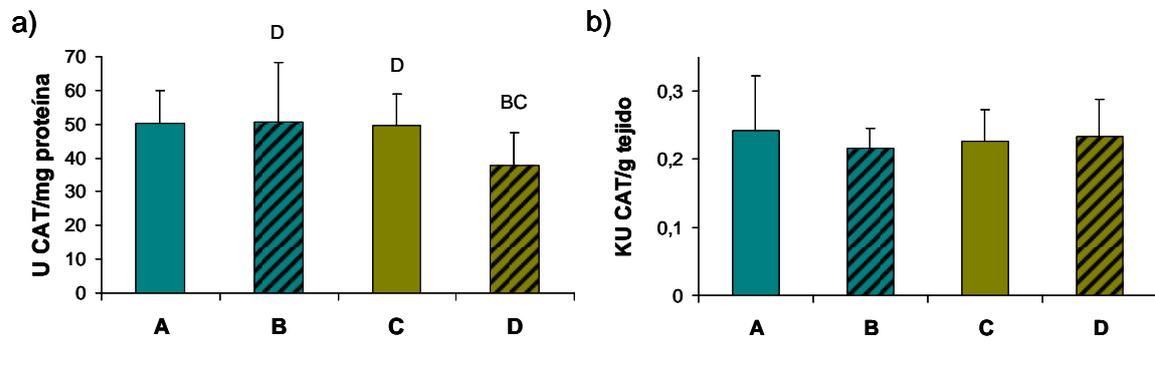


Figura 39: niveles de actividad catalasa que presentan los cuatro grupos de estudio; a) expresados por volumen de fracción soluble (U-Mann-Whitney, $p < 0,05$); **b)** expresados por masa de tejido (no se observaron diferencias significativas).

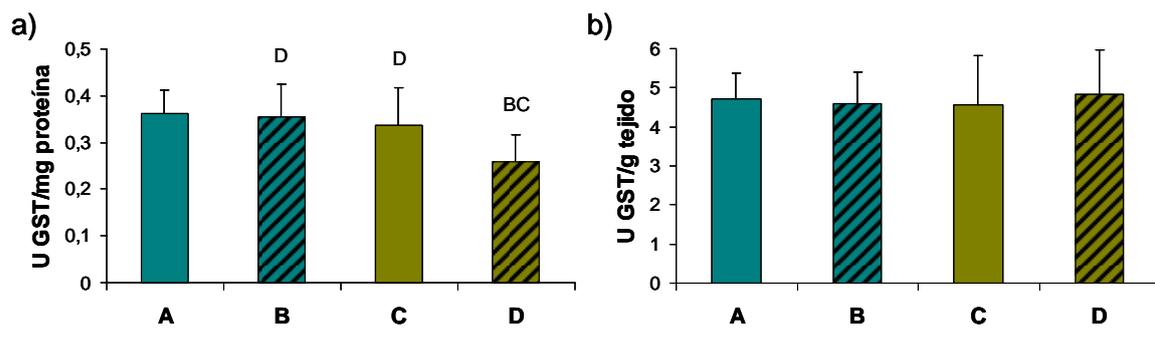


Figura 40: niveles de actividad GST que presentan los cuatro grupos de estudio; a) expresados por volumen de fracción soluble (t-Student, $p < 0,05$); **b)** expresada por masa de tejido (no se observaron diferencias significativas).

La actividad glutatión reductasa fue significativamente superior en el grupo irradiado y no tratado con EPL que en el grupo control, tanto si lo expresamos por mg de proteína como por g de tejido (figura 41). Este aumento no se observó entre los dos grupos de animales tratados con EPL. A pesar de ello, la actividad glutatión reductasa, expresada por g de tejido, del grupo tratado con EPL e irradiado fue ligeramente superior a la del grupo no irradiado y tratado con EPL, pero la diferencia no alcanzó significación estadística. La actividad GR de los dos grupos juntos de animales irradiados fue significativamente superior (t-Student, $p = 0,034$) a la de los dos grupos juntos de animales no irradiados, al expresarla por g de tejido. En general, pues, se vio que la RUV indujo un aumento de la actividad GR de

Estudio 3

forma muy clara en los animales no tratados con EPL y que el tratamiento con EPL anuló prácticamente este efecto.

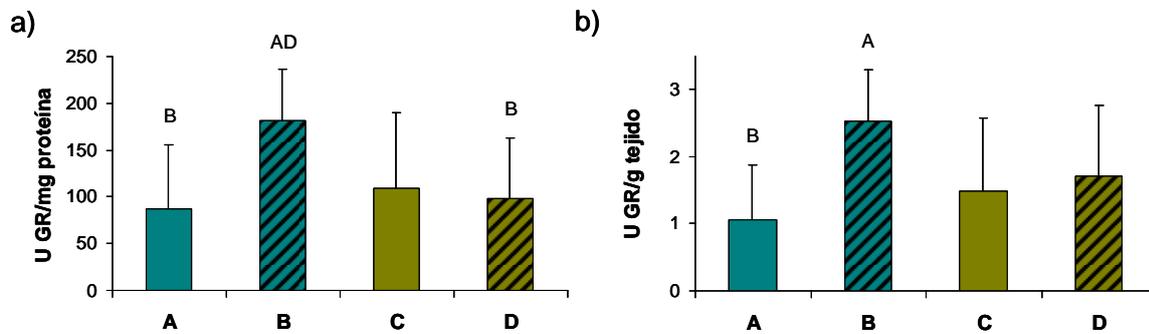


Figura 41: niveles de actividad GR que presentan los cuatro grupos de estudio; a) expresados por volumen de fracción soluble (t-Student); b) expresados por masa de tejido (t-Student); ($p < 0,05$).

La actividad glutatión peroxidasa por mg de proteína mostró un aumento significativo en los animales irradiados y no tratados con EPL, respecto a los controles no irradiados y no tratados (figura 42a). La misma actividad expresada por g de tejido mostró, no sólo la misma diferencia significativa antes comentada entre el grupo irradiado y no tratado con EPL y el grupo control, sino también diferencias significativas entre los dos grupos tratados con EPL (figura 42b). Es más, la actividad GPx de los dos grupos irradiados juntos fue significativamente superior a la actividad del enzima de los dos grupos no irradiados juntos, tanto al ser expresada por mg de proteína (t-Student, $p = 0,002$) como por g de tejido (t-Student, $p < 0,001$). Estos resultados indicaron claramente un efecto de la RUV en la inducción de la actividad o la expresión, o ambas cosas, de la GPx, que se comentará más adelante.

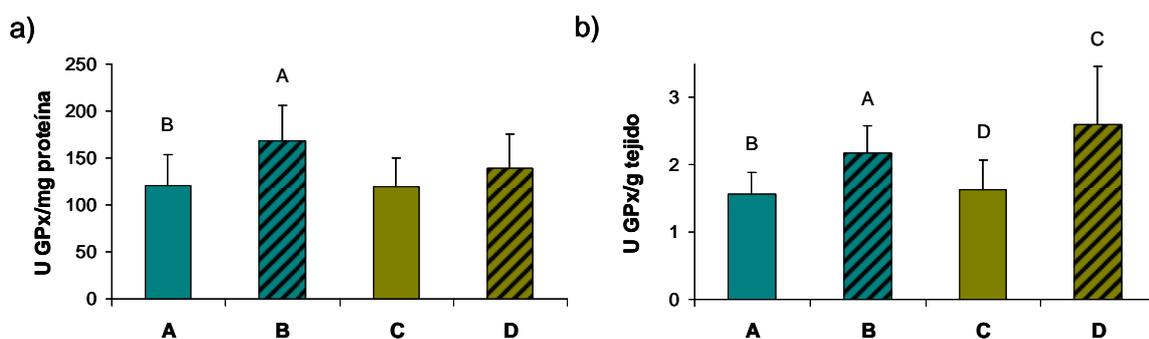


Figura 42: niveles de actividad GPx que presentan los cuatro grupos de estudio; a) expresados por volumen de fracción soluble (t-Student); b) expresados por masa de tejido (t-Student); ($p < 0,05$).

Niveles de glutaciones

La tabla 17 recoge los niveles de glutaciones de la fracción soluble de piel de los cuatro grupos de estudio.

	A	B	C	D
GSH (nmol/mg proteína)^T	18,44±2,75 (12)	21,80±5,73 (12)	18,53±3,71 (12)	14,99±3,51 (12)
GSH (nmol/g tejido) *	241,62±38,65 _B (12)	278,99±47,79 _A (12)	251,38±55,90 (12)	273,75±63,62 (12)
GSSG (nmol/mg proteína)^T	37,49±7,12 _C (12)	33,76±6,61 _D (12)	26,63±3,03 _A (11)	24,14±4,61 _B (12)
GSSG (nmol/g tejido)^T	486,57±64,76 _C (12)	436,11±76,45 (12)	357,66±49,24 _{A,D} (11)	439,67±75,12 _C (12)
GSH/GSSG^T	0,50±0,09 _{B,C} (12)	0,65±0,14 _A (12)	0,72±0,14 _A (11)	0,63±0,12 (12)

Tabla 17: resumen de los valores de glutaciones de la fracción soluble de piel (media ± desviación estándar, los valores entre paréntesis indican el número de casos) **T** variables que muestran diferencias estadísticas debidas al tratamiento; las letras en subíndice (A-D) indican los grupos que presentan diferencias significativas entre sí (p<0,05). * variable que en el estudio por factores, según la radiación, se presenta en el límite de la significación estadística (p=0,05).

En estas muestras se observó que la RUV aumentaba la actividad de los enzimas glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, probablemente como respuesta al estrés oxidativo derivado de la misma. Este aumento de actividad debería traducirse en cambios significativos en las concentraciones de GSH y GSSG de forma consecuente. En este sentido, convenía diferenciar los resultados expresados en función de la proteína de la muestra o de la masa de tejido. En el primer caso, debido a la mayor concentración de proteína soluble en el grupo irradiado y tratado con EPL, que ya comentamos anteriormente, no merecía la pena tomar en consideración las diferencias que pudiesen surgir debidas a esta causa. Por ello, se consideró más adecuado comentar los resultados de los glutaciones y discutir su relación con los resultados de la actividad glutatión reductasa y glutatión peroxidasa en base a los valores expresados por masa de tejido.

Estudio 3

En el conjunto de los dos grupos de animales irradiados, se observó un aumento del GSH/g de tejido en el límite de la significación (t-Student, $p=0,05$; figura 43b) en comparación con el observado en los dos grupos juntos de animales no irradiados. Este ligero incremento se pudo explicar por el aumento de la actividad GR inducida por la radiación.

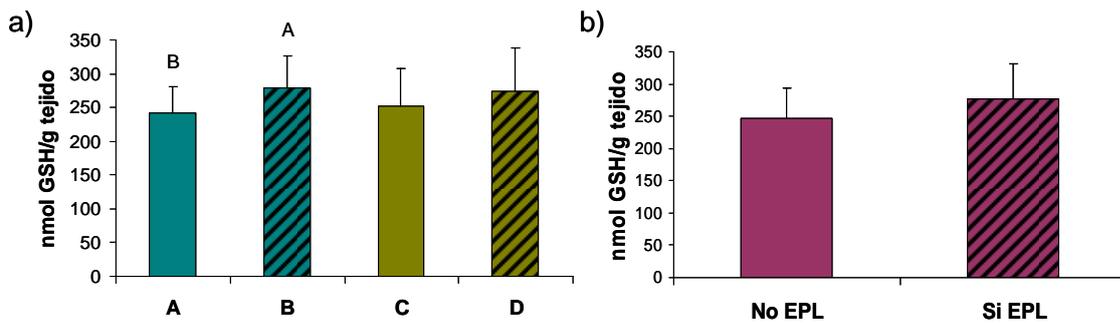


Figura 44: Representación de los valores de glutatión reducido de piel: a) GSH por g de tejido de cada uno de los grupos de estudio (t-Student, $p<0,05$); **b)** GSH por g de tejido en función de la radiación, la diferencia observada está al límite de la significación estadística (t-Student; $p=0,05$).

En los valores de la forma oxidada del glutatión, destacó el bajo nivel que presentó el grupo tratado con EPL y no irradiado (figura 44a), que mostró diferencias significativas con el grupo control y el tratado con EPL e irradiado. Por lo que parecía que, en ausencia de estímulo estresante, el EPL redujo los niveles de GSSG presentes en la muestra, posiblemente, su presencia en la muestra indujera un estado de reposo oxidativo. Además,

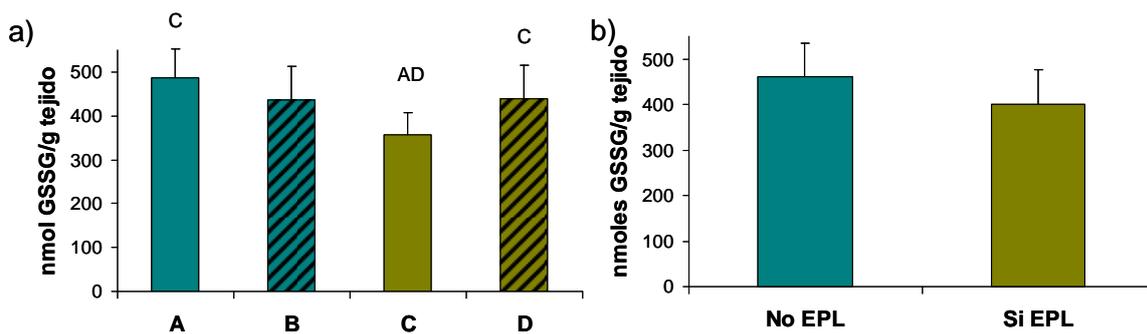


Figura 43 Representación de los valores de glutatión oxidado de piel: a) GSSG por g de tejido de cada uno de los grupos de estudio (t-Student); **b)** GSSG por g de tejido en función de la radiación (t-Student, $p=0,008$).

hay que recordar que este grupo presentaba un bajo nivel de actividad glutatión peroxidasa, lo que contribuía a que los valores de GSSG se mantuviesen bajos. En el análisis por grupos

en función del tratamiento se observaron diferencias estadísticamente significativas (t-Student, $p=0,008$; figura 44b).

En conjunto, los valores del cociente GSH/GSSG fueron significativamente menor en el grupo control que en los restantes tres grupos (t-Student; figura 45a). El estudio por factores reveló que el tratamiento con EPL aumentó significativamente los valores de la relación GSH/GSSG en la piel (t-Student, $p=0,026$; figura 45b).

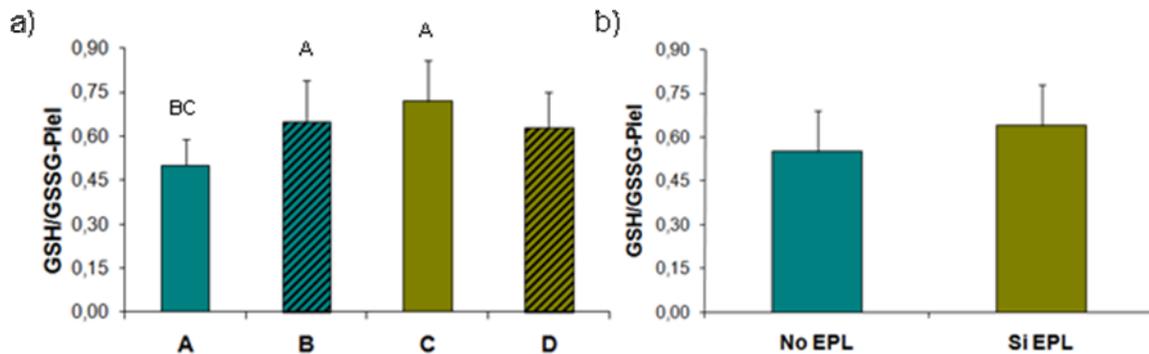


Figura 45: Representación de la relación entre las formas del glutatión (reducido/oxidado) de piel: a) GSH/GSSG por g de tejido de cada uno de los grupos de estudio (T-Student); b) GSH/GSSG por g de tejido en función de la radiación (t-Student, $p=0,026$).

Valoración de la capacidad antioxidante de la fracción soluble de piel por el método ORAC

En la tabla 18 se recogen los valores de actividad antioxidante determinada por el método ORAC de la fracción soluble de piel de los cuatro grupos de estudio.

	A	B	C	D
ORAC ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$) ^T	0,42±0,05	0,43±0,12	0,38±0,03	0,33±0,07
	(12)	(12)	(12)	(12)
ORAC ($\mu\text{mol TE/g tejido}$) ^R	5,42±0,53 _c	5,48±0,43	5,06±0,20 _{A,D}	5,87±0,81 _c
	(12)	(12)	(12)	(12)

Tabla 18: resumen de los valores de actividad antioxidante por el método ORAC, (media \pm desviación típica, los valores entre paréntesis indican el número de casos) **T** variables que muestran diferencias estadísticas debidas al tratamiento (U-Mann-Whitney); **R** variables que muestran diferencias estadísticas debidas a la radiación (U-Mann-Whitney); las letras en subíndice (A-D) indican los grupos que presentan diferencias significativas entre sí (t-Student); ($p<0,05$).

Estudio 3

En la figura 46 se representan los resultados de la valoración de la actividad antioxidante mediante el método ORAC de la fracción soluble de piel. Estos valores expresados por proteína presente en la muestra fueron difícilmente interpretables si tenemos en cuenta el sesgo debido a la mayor cantidad de proteína del grupo irradiado y tratado con EPL. Por lo que se consideró más correcta la expresión de los resultados en función de la masa del tejido correspondiente.

Entre todos los resultados destacaron los valores de los grupos tratados con EPL. En primer lugar, que el grupo tratado con EPL no irradiado mostrase niveles de actividad antioxidante inferiores a los del control no tratado y al del tratado e irradiado. La diferencia observada fue inferior a un 7% pero alcanzó la significación estadística. Es difícil interpretar este resultado y deducir la causa de esa disminución de la actividad inhibidora de la formación de peróxidos en las muestras de animales que habiendo tomado el extracto antioxidante no fueron sometidos al estrés de la irradiación. No obstante, podría explicarse porque los animales tratados con el EPL de forma crónica necesitarían menos defensas antioxidantes propias, en comparación con los controles no tratados y los animales irradiados.

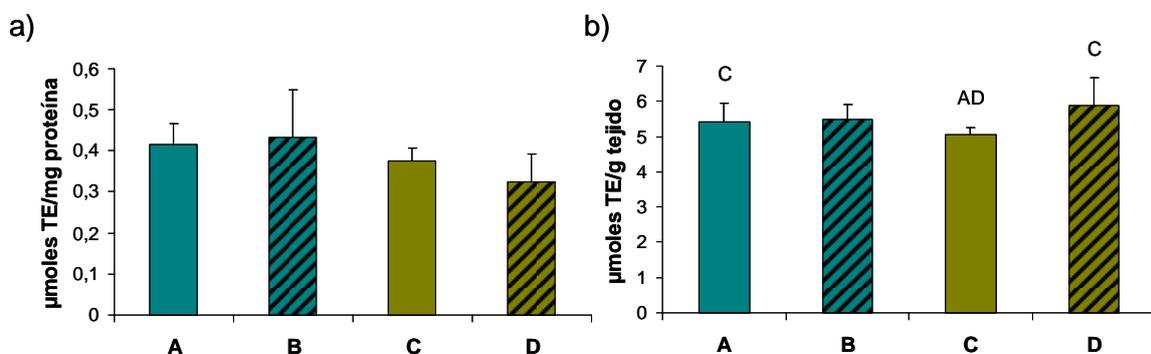


Figura 46: Representación de los valores de actividad antioxidante de la fracción soluble de piel determinada por el método ORAC en los cuatro grupos de estudio: **a)** valores expresados por proteína presente en la muestra; **b)** valores expresados por tejido correspondiente (t-Student, $p < 0,05$).

Por otra parte, que el grupo tratado con EPL e irradiado mostrase los mayores niveles de inhibición de la formación de peróxidos pudo explicarse por la mayor presencia de proteína soluble en la muestra, ya que las proteínas, en general, presentan actividad antirradicalar.

Determinación de la presencia de enzimas en la fracción soluble de piel de los animales del estudio de irradiación crónica mediante western blot

Las determinaciones de western blot de este estudio se han realizado en 4 animales/grupo, por lo que el tamaño muestral de estos parámetros es de 4.

En la figura 47a se puede observar que la intensidad correspondiente a la SOD es similar en los cuatro grupos de animales. En cambio en la figura 47b se ve claramente que la CAT aumenta en los animales tratados con el EPL. En cuanto a la GST (figura 47d) se observa que los animales tratados con EPL y no irradiados presentaban una mayor cantidad de proteína que los controles no irradiados y no tratados con EPL. Por otra parte, los animales irradiados (tratados o no con EPL) también presentaron más proteína. Finalmente, la proteína GR disminuyó en los animales tratados con EPL y no irradiados (figura 47c).

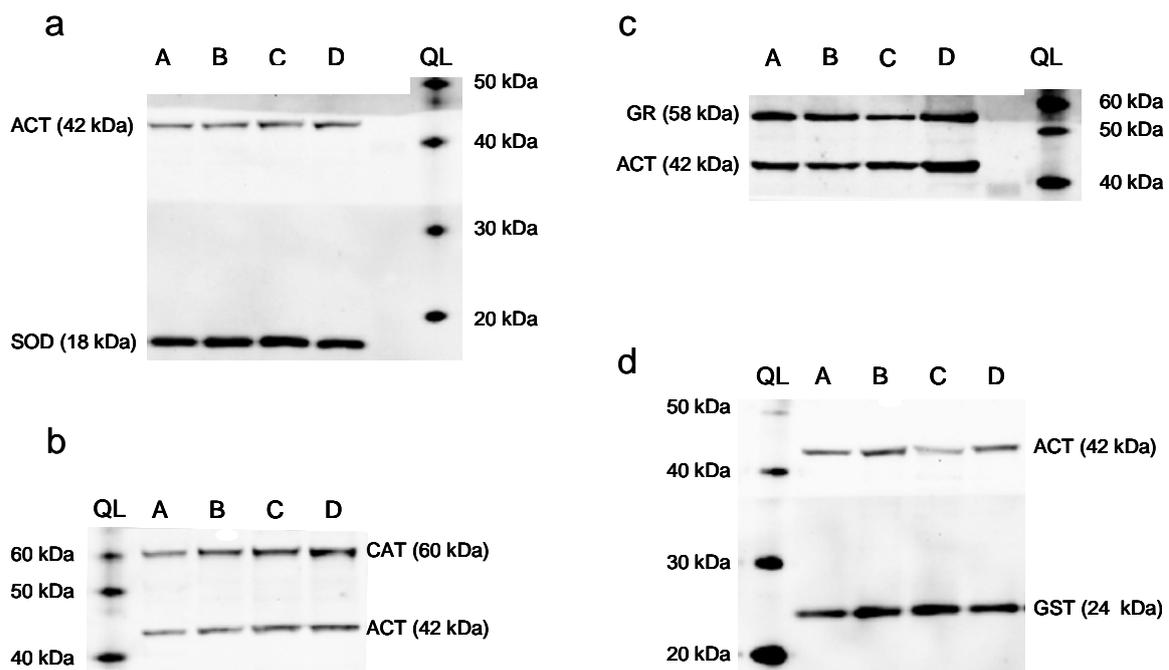


Figura 47: fotografía de las membranas de las determinaciones realizadas por la técnica de western blot en fracción soluble de piel de ratón; QL indica la calle correspondiente al marcador de pesos moleculares quimioluminiscentes; A-D grupos de estudio; a) determinaciones de SOD y ACT; b) determinaciones de CAT y ACT; c) determinaciones de GR y ACT; d) determinaciones de GST y ACT.

Como acabamos de comentar, las imágenes obtenidas por la técnica de western blot permiten apreciar ligeras diferencias en la expresión de alguna de las proteínas de estudio

Estudio 3

en relación con la activa presente en la muestra entre los distintos grupos. Sin embargo, al ser estas comparaciones algo subjetivas, hemos considerado oportuno realizar el análisis estadístico de los resultados densitométricos. En la tabla 19 se resumen los valores de densitometría de cada una de las proteínas estudiadas respecto a la de la actina en cada uno de los grupos de estudio (media \pm desviación típica).

	A	B	C	D
SOD/ACT	3,76 \pm 2,65	3,38 \pm 0,82	3,18 \pm 0,70	3,39 \pm 0,55
CAT/ACT	0,42 \pm 0,17	0,42 \pm 0,18	0,65 \pm 0,19	0,58 \pm 0,44
GST/ACT	3,11 \pm 0,74	5,06 \pm 3,51	6,08 \pm 2,69	4,16 \pm 1,68
GR/ACT	9,21 \pm 5,63	8,20 \pm 2,59	5,50 \pm 3,56	7,10 \pm 2,66

Tabla 19: valores de proteína de cada uno de los cuatro enzimas estudiados por western blot en fracción soluble de piel respecto a los valores de la actina presente en las mismas muestras (media \pm desviación típica, N=4; no se observaron diferencias estadísticamente significativas).

Los cuatro enzimas de piel de ratón que se analizaron por la técnica de western blot (SOD, CAT y GST y GR) no mostraron diferencias estadísticas significativas. Es posible que la gran variabilidad interindividual no permitiera observar diferencias existentes. El análisis por factores tampoco reveló diferencias en ninguna de las variables estudiadas. El tamaño muestral en estos análisis era de 4/animales por lote, probablemente, aumentando el tamaño muestral se pudiesen observar algunas diferencias más claras.

Se pudo observar una tendencia, que no alcanzó en la significación estadística, en los valores de la catalasa respecto a la actina en los animales sometidos a tratamiento con EPL, la cual no se vio acompañada por cambios en la actividad del enzima.

3.1.4. Determinaciones histológicas realizadas en las muestras de piel de los animales del estudio de irradiación crónica

Recordamos que en los estudios de anatomía patológica, se trabajó con seis grupos de estudio debido a que de cada animal irradiado se tomaron dos muestras, una de la zona de la línea media del dorso, más afectada por la RUV, y otra de una zona más periférica, también irradiada, pero menos afectada por dicha radiación. Por lo tanto, el grupo A es el control, B y C son irradiados no tratados con EPL, el B zona menos afectada y el C zona más afectada, el D el grupo tratado con EPL no irradiado y E y F son tratados con EPL e irradiados, E zona más sana y F zona más afectada. Excepciones a esto son las determinaciones del grosor del pliegue de la piel y la determinación del número de CL en los que se tomó una medida de cada animal irradiado, por lo tanto los grupos de estudio coinciden con los de las otras determinaciones.

Los tamaños muestrales de estas determinaciones son de 7 animales por grupo a excepción de las dos siguientes valoraciones: el grosor del pliegue de la piel, que se realizó en 30 animales de cada grupo, y el número de células de Langerhans, que se llevó a cabo el recuento en 5 individuos de cada grupo.

Grosor del pliegue de la piel

	A	B	C	D
Grosor del pliegue de piel (μm)^R	787,0 \pm 59,4 _B	927,4 \pm 108,2 _A	821,3 \pm 27,4 _D	934,7 \pm 79,1 _C

Tabla 20: valores del grosor del pliegue de la piel a las 27 semanas de edad de los cuatro grupos de estudio (media \pm desviación típica, N=30). **R** la variable presenta diferencias significativas debidas a la radiación (U-Mann-Whitney); letras en subíndice (A-D) indican los grupos que presentan diferencias significativas entre sí (U-Mann-Whitney); (p<0,05).

El grosor del pliegue de la piel fue medido en todos los animales cuando estos contaban con 27 semanas de edad (19^a semana de irradiación), por lo que el tamaño muestral de esta determinación es de 30 individuos, valores que se recogen en al tabla 20. Esta medida no se pudo repetir más tarde, debido a la presencia de tumores en algunos animales y de úlceras por rascado.

Estudio 3

El análisis estadístico de los resultados de la medida del grosor del pliegue de la piel mostró diferencias significativas entre los dos grupos irradiados y los dos no irradiados, mostrando los irradiados valores mayores (figura 48b). Este resultado se corrobora en la comparación juntando grupos en función de la irradiación, en la que se demuestra que ambos grupos irradiados muestran un mayor grosor que los no irradiados, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (U-Mann-Whitney, $p < 0,001$). En principio estos resultados demuestran que la administración de EPL no ejerce ningún efecto en la prevención del engrosamiento de la piel; lo cual no indica que pueda haber cambios relativos en las distintas capas de la piel.

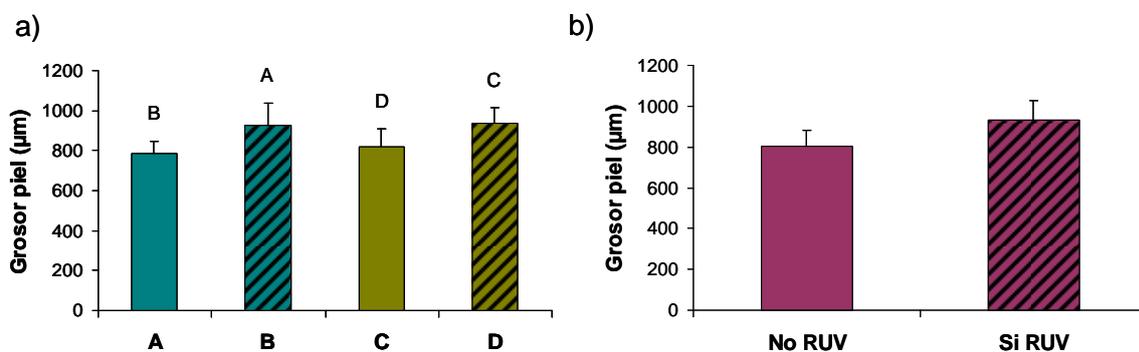


Figura 48. Representación de los grosores del pliegue de piel de los animales del estudio crónico; a) por grupos de estudio (U-Mann-Whitney); b) según la irradiación (U-Mann-Whitney); ($p < 0,05$).

Grosor de las distintas capas de la piel

La tabla 21 recoge los valores del grosor de cada una de las tres capas de piel de los seis grupos de estudio.

Como hemos comentado en la introducción, se espera que las capas más externas de la piel (epidermis y dermis) se engrosen en respuesta a la RUV. Esto se pudo observar claramente en el estudio por factores del grosor de la epidermis y de la dermis (figuras 49a y 49b); así como en el grosor de la hipodermis entre los grupos no irradiados y las zonas menos afectadas de los grupos irradiados (figura 49c).

	A	B	C	D	E	F
Epidermis (μm)^R	22±5 _C	26±4 _{CE}	79±9 _{AB}	22±4 _{EF}	42±22 _{BDF}	74±12 _{DE}
Dermis (μm)^R	129±23 _C	118±17 _C	189±20 _{AB}	110±30 _F	140±14 _F	195±32 _{DE}
Hipodermis (μm)[*]	267±83	309±143	437±198	244±108	326±160	354±155

Tabla 21: valores de los grosores de las distintas capas de la piel en los seis grupos estudiados (media ± desviación típica, N=7). **R** la variable presenta diferencias significativas debidas a la radiación (t-Student, U-Mann-Whitney); * Diferencias debidas a la radiación, pero sólo entre los grupos no irradiados y las zonas más afectada de los irradiados; las letras en subíndice (A-D) indican los grupos que presentan diferencias significativas entre sí (t-Student); (p<0,05).

El análisis estadístico por grupos de estudio mostró resultados algo diferentes. En cuanto al grosor de la epidermis (figura 49a) se observó que este aumentaba con la irradiación; sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales no irradiados no tratados con EPL y las zonas sanas de los animales irradiados no tratados con EPL, aunque este último grupo mostraba un grosor mayor.

Por otra parte, la diferencia entre ambas zonas sanas de animales irradiados fue muy significativa, siendo mayor el grosor de la epidermis de los animales tratados con EPL que los que no recibieron el tratamiento. Como hemos comentado en la introducción, el aumento del grosor de la epidermis es un mecanismo de defensa de la piel frente al efecto nocivo de la RUV. Por lo tanto, este resultado indica que el tratamiento con EPL promueve el engrosamiento de la epidermis, potenciando la reacción defensiva de la piel ante la RUV.

El estudio estadístico del grosor de la dermis (figura 49b) de los animales irradiados mostró diferencias estadísticamente significativas entre las zonas más afectadas por la RUV de los animales irradiados y los otros dos grupos tanto en los animales sometidos a tratamiento con EPL como los no tratados con el extracto. No se observan diferencias estadísticas debidas a la administración del EPL, sin embargo se observa que mientras la zona menos afectada por la RUV del grupo no tratado e irradiado muestra un valor incluso algo menor que su control no irradiado, en los mismos grupos tratados con EPL se observa una tendencia clara al aumento del grosor de la capa dérmica con la irradiación, lo que favorecería el engrosamiento defensivo de la piel frente a la RUV.

Estudio 3

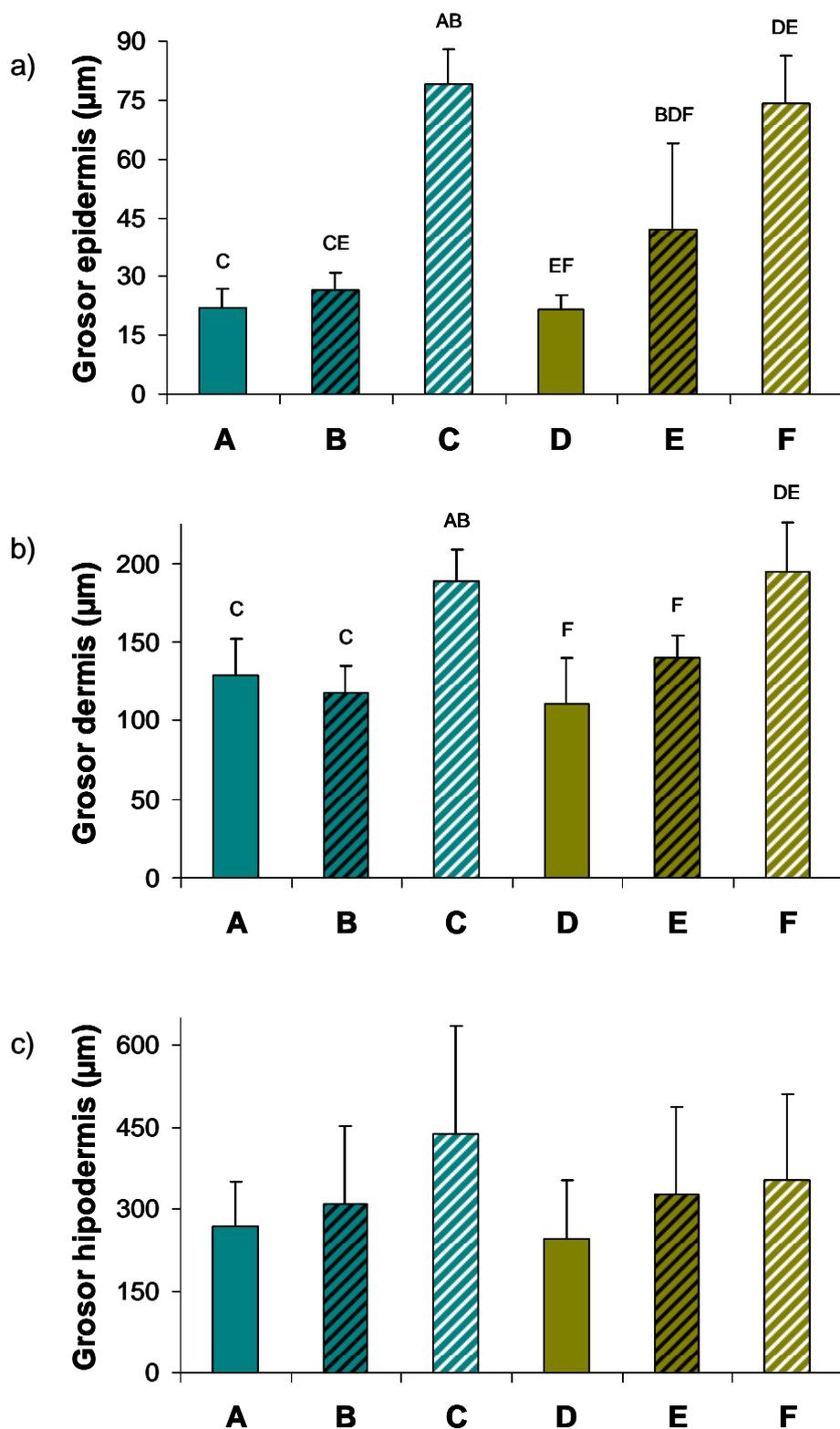


Figura 49: Representación del grosor de las distintas capas de la piel en los seis grupos de estudio: a) epidermis; b) dermis; c) hipodermis.

En cuanto al grosor de la hipodermis (figura 49c), se detectaron diferencias estadísticamente significativas debidas a la radiación entre los grupos no irradiados y las zonas más afectadas de los animales irradiados, mientras que las zonas menos afectas por la irradiación no mostraron diferencias significativas con ninguno de los otros dos grupos. Esto seguramente se debe a la gran dispersión de los resultados; sin embargo, se observa una tendencia al engrosamiento de esta capa en función de la irradiación. No se muestran diferencias significativas debidas al tratamiento; a pesar de esto, las zonas más afectadas por la irradiación en los grupos tratados con el EPL el grosor de la epidermis la tendencia al aumento de la hipodermis es mucho menor que en los grupos no tratados.

Glándulas sebáceas

	A	B	C	D	E	F
Glándulas sebáceas (Glándulas/mm) ^R	3,8±0,6 _C	4,5±0,9 _C	6,5±0,7 _{AB}	3,7±0,7 _F	4,3±1,2 _F	6,5±0,7 _{DE}

Tabla 22: valores de glándulas sebáceas por mm de longitud de piel en los seis grupos de estudio (media ± desviación típica, N=7); **R** la variable presenta diferencias significativas debidas a la radiación (U-Mann-Whitney); las letras en subíndice (A-D) indican los grupos que presentan diferencias significativas entre sí (t-Student); (p<0,05).

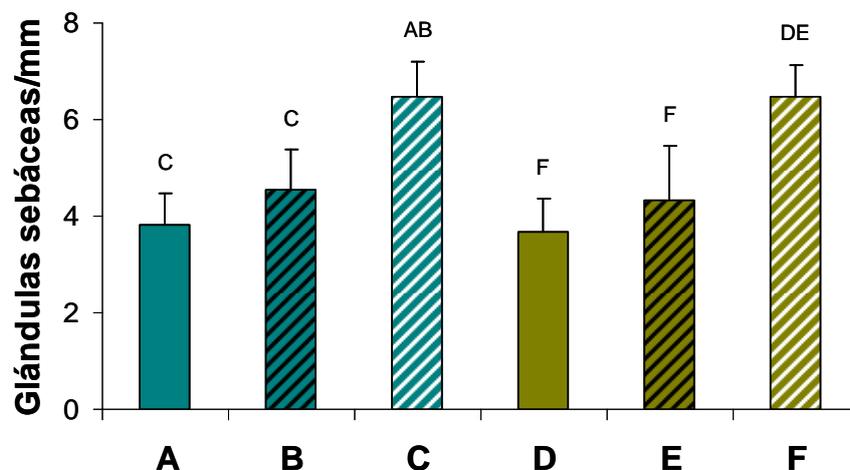


Figura 50: representación del recuento de glándulas sebáceas por grupo de estudio (t-Student).

Estudio 3

La tabla 22 resume los resultados del recuento de las glándulas sebáceas en los seis grupos de estudio.

La irradiación aumenta el número de glándulas sebáceas y no se observa ningún efecto del EPL sobre este parámetro. El estudio estadístico por grupos sólo muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos más afectados por la irradiación y los otros dos (figura 50).

Vasos sanguíneos

	A	B	C	D	E	F
Vasos sanguíneos (secciones vaso/mm) ^R	2,4±1,5 _C	2,9±0,8 _C	5,3±1,3 _{AB}	2,4±1,2 _{EF}	4,1±1,5 _D	5,1±1,9 _D

Tabla 23: número de vasos sanguíneos por mm de longitud de piel en los seis grupos de estudio (media ± desviación típica, N=7); **R** la variable presenta diferencias significativas debidas a la radiación (U-Mann-Whitney); las letras en subíndice (A-D) indican los grupos que presentan diferencias significativas entre sí (t-Student); (p<0,05).

Se midieron las secciones de vaso sanguíneo por longitud de piel, los resultados se muestran en la tabla 23y en la figura 51. Esto nos permite tener una idea del comportamiento de los distintos grupos frente a la generación de vasos sanguíneos en respuesta a la irradiación. El estudio por factores indicó que la RUV indujo la angiogénesis y que la administración de EPL no afectó a esta variable.

En el estudio por grupos se encontraron diferencias debidas a la radiación. Los grupos de animales no tratados con EPL mostraron diferencias significativas entre el grupo más afectado por la irradiación y los otros dos, no observándose diferencias significativas entre estos últimos. El estudio por grupos de los animales tratados con EPL mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo no irradiado y los otros dos. Por lo tanto la diferencia entre el grupo control y el grupo menos afectado de los animales no tratados no es significativa, mientras que en los tratados por EPL sí lo es. Este efecto es debido a que las zonas de dermis del grupo de zonas menos afectadas por la radiación del grupo tratado con EPL e irradiado (E) eran notablemente más gruesas que las del grupo tratado con EPL no irradiado (D), razón por la cual, en la dermis del grupo E había más vasos sanguíneos (ver tabla 23).

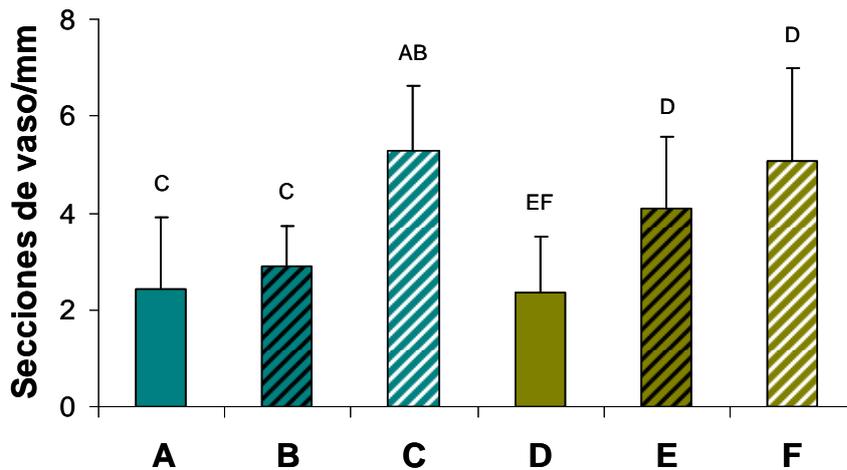


Figura 51: representación del recuento de secciones de vaso sanguíneo por grupo de estudio (t-Student).

Células de Langerhans

	A	B	C	D
CL (CL/mm ²) ^R	1941,6±144,3 _B	1653,4±179,1 _A	1803,4±241,9	1578,4±201,3

Tabla 24: resultados del recuento de CL en los animales del estudio crónico por superficie de epidermis (media ± desviación típica, N=5). ^R la variable presenta diferencias significativas debidas a la radiación (U-Mann-Whitney); las letras en subíndice (A-D) indican los grupos que presentan diferencias significativas entre sí (t-Student); (p<0,05).

El recuento de células de Langerhans, cuyos resultados se resumen en la tabla 24, se llevó a cabo en 5 animales de cada uno de los cuatro grupos de estudio iniciales. Se observó que la RUV induce una disminución del número de células de Langerhans (U-Mann-Whitney, p=0,019; figura 52). Esta disminución es estadísticamente significativa en la comparación de los animales no irradiados y no tratados con los irradiados y no tratados.

El tratamiento con EPL mostró una tendencia a la reducción del número de Langerhans en la epidermis, ya que ambos grupos tratados presentaron un ligero descenso en esta variable respecto a sus controles no tratados. A pesar de que estas diferencias no alcanzaron la significación estadística, se puede intuir que el tratamiento con el extracto reduce la necesidad de que la epidermis presente un alto número de células de Langerhans.

Estudio 3

Lo cual puede deberse a que el EPL mantenga la integridad de las células y mejore la eficacia de la presentación de antígenos gracias a sus propiedades antioxidantes.

Por otra parte, entre ambos grupos tratados con EPL no se observan diferencias estadísticamente significativas, lo que indica que la administración de EPL previene de la reducción del número de células de Langerhans debidas a la radiación.

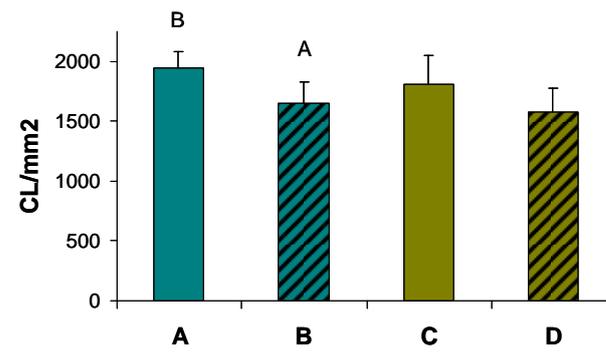


Figura 52: Representación de los valores de células de Langerhans por unidad de superficie en los cuatro grupos de estudio (t-Student).

Mastocitos

	A	B	C	D	E	F
Mastocitos (mastocitos/mm ²) ^R	309±135 _C	500±154	563±177 _A	304±78 _F	435±161	583±96 _D

Tabla 25: resultados del recuento de mastocitos en los animales del estudio crónico por superficie de dermis (media ± desviación típica, N=7). **R** la variable presenta diferencias significativas debidas a la radiación (t-Student); las letras en subíndice (A-D) indican los grupos que presentan diferencias significativas entre sí (U-Mann-Whitney); (p<0,05).

El recuento de mastocitos (tabla 25, figura 53) se realizó en la zona de la dermis superior. En el análisis por grupos de estudio sólo se observaron diferencias significativas las comparaciones de los no irradiados con las zonas irradiadas más afectadas por la radiación (U-Mann-Whitney); la falta de significación de las diferencias de las zonas no irradiadas con las zonas irradiadas más sanas podría deberse a la gran dispersión que mostraron de los datos.

El análisis por factores detectó diferencias, en función de la radiación, entre la zona no irradiada y ambas zonas irradiadas (t-Student) y no se detectaron diferencias entre ambas zonas irradiadas, probablemente debido a la gran dispersión de los datos.

No se encontraron diferencias entre los grupos tratados y los no tratados; a pesar de que en análisis por grupos no se encontraron diferencias entre ambas zonas irradiadas sanas, se observa que el grupo tratado presenta un nivel de mastocitos presentes en la dermis superior un 13% más bajo que el grupo no tratado, lo que muestra una tendencia del extracto de reducir la infiltración de mastocitos.

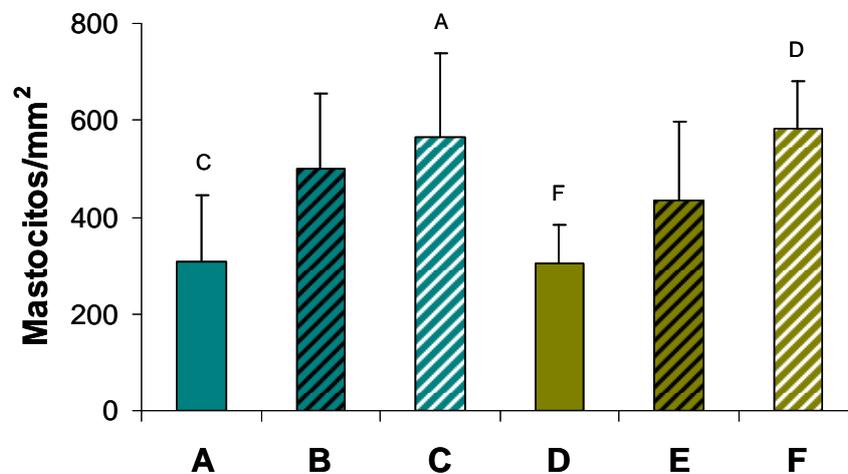


Figura 53: representación de la densidad de mastocitos en los grupos de estudio (U-Mann-Whitney).

Células p53⁺

La tabla 26 resume los resultados del recuento de células p53⁺ en los seis grupos de estudio.

	A	B	C	D	E	F
Células p53⁺ (células p53 ⁺ / mm ²) ^R	4±11 _{BC}	417±393 _{ABE}	3825±286 _{AC}	40±45 _{EF}	2262±885 _{BDF}	4012±622 _{DE}

Tabla 26: resultados del recuento de células p53⁺ en los animales del estudio crónico por superficie de epidermis (media ± desviación típica, N=7). **R** la variable presenta diferencias significativas debidas a la radiación (U-Mann-Whitney); las letras en subíndice (A-D) indican los grupos que presentan diferencias significativas entre sí (U-Mann-Whitney); (p<0,05).

Estudio 3

La irradiación aumenta la presencia de células p53⁺ presentes en la epidermis, esto se confirma en el estudio estadístico por grupos en el que, tanto en los grupos tratados como en los no tratados, se observa un incremento significativo de estas células marcadas. Pero la diferencia significativa más importante se observa entre los dos grupos irradiados menos afectados por la irradiación, que muestra que el EPL favorece la expresión de la proteína p53 en el tejido irradiado. Esto indica un efecto protector del extracto ya que el incremento de la expresión de esta proteína favorece la activación de los mecanismos reparadores del ADN o la apoptosis de las células cuyo ADN ha sido dañado (figura 54).

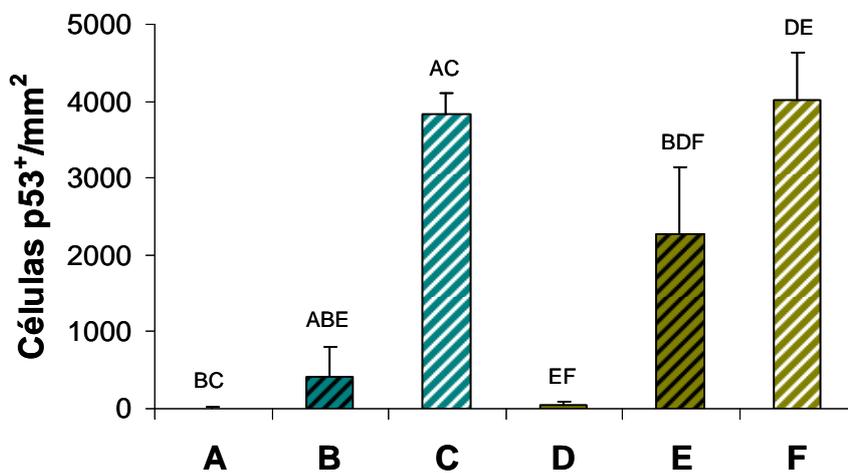


Figura 54: resultados del recuento de células p53⁺ por superficie de epidermis (t-Student, p<0,05).

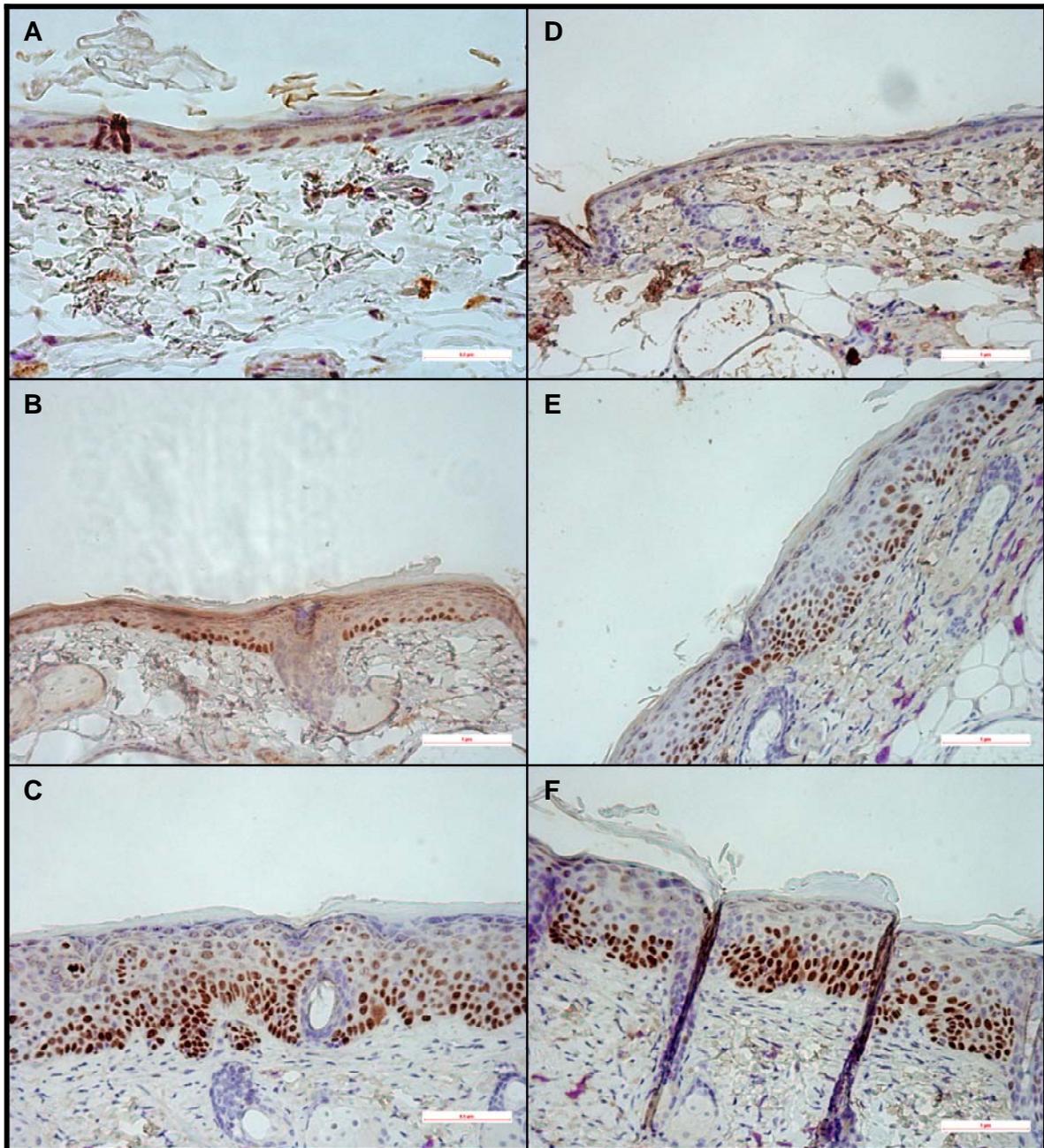


Figura 55: Preparaciones de inmunohistoquímica frente al antígeno p53; se puede observar una muestra de cada grupo de estudio: A-no irradiado y no tratado con EPL; B-zona menos afectada del irradiado y no tratado con EPL; C-zona más afectada del irradiado y no tratado con EPL, D-no irradiado y tratado con EPL; E-zona menos afectada del irradiado y tratado con EPL; F-zona más afectada del irradiado y tratado con EPL.

Estudio 3

Células ki67⁺

La tabla 27 resume los resultados del recuento de células ki67⁺ en los seis grupos de estudio.

	A	B	C	D	E	F
Proliferación (células ki67 ⁺ /mm ²) ^R	1540±416 _{BC}	2241±793 _{AC}	4909±655 _{AB}	1704±446 _F	2179±797 _F	4460±560 _{DE}

Tabla 27: resultados del recuento de células ki67⁺ en los animales del estudio crónico por superficie de epidermis (media ± desviación típica, N=7). **R** la variable presenta diferencias significativas debidas a la radiación (t-Student); las letras en subíndice (A-D) indican los grupos que presentan diferencias significativas entre sí (t-Student); (p<0,05).

El estudio por factores demostró que la irradiación aumenta la proliferación de las células epidérmicas. Por otra parte, en el estudio por factores se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las zonas irradiadas más afectadas por la radiación y las otras dos: las irradiadas menos afectadas y las zonas no irradiadas. Por otra parte, la comparación entre las zonas irradiadas menos afectadas y las zonas no irradiadas sólo mostró diferencias significativas en los grupos no tratados (figura 56).

No se detectaron diferencias significativas debidas al tratamiento con EPL, sin embargo llamó la atención que, de los grupos más afectados por la irradiación, el tratado mostrase unos niveles menores de células proliferantes que el no tratado aunque esta diferencia no alcanzase la significación estadística.

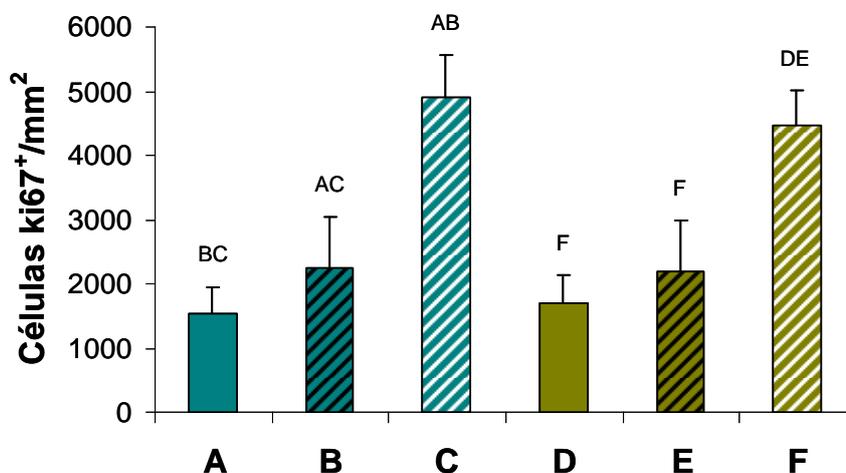


Figura 56: resultados del recuento de células ki67⁺ por superficie de epidermis (t-Student).

Resultados

Como se explicó en el apartado de metodología, el recuento de las células proliferantes se realizó en muestras procedentes de 7 animales de cada grupo y, de cada muestra, se hicieron recuentos en 10 campos, analizándose el valor medio de dichos recuentos.

Para valorar la observación de que los animales irradiados y tratados con EPL no presentaban unos niveles de células proliferantes tan elevados como los animales no tratados con el extracto, se repitió el análisis estadístico considerando cada dato de recuento, siendo por tanto el tamaño muestral de 70. Mediante este análisis se detectó significación en la diferencia de ambos grupos; por lo que podemos considerar que existe una tendencia del EPL a retrasar la proliferación de la epidermis en tejido afectado por la irradiación.

Estudio 3

3.2. Discusión del estudio 3

Una vez determinada la capacidad antioxidante *in vitro* del EPL y sus efectos tras la irradiación aguda, se planteó la posibilidad de que dicho EPL tuviese actividad antitumorogénica. Para dilucidar esta hipótesis se administró EPL a ratones *hairless* sometidos a radiación ultravioleta crónica, en los que se valoraron los tumores desarrollados y la supervivencia en función de la tumorogénesis de los animales irradiados, así como ciertos parámetros histológicos de piel indicadores del daño inducido por la RUV o de la respuesta del tejido ante la radiación. Además, dado que se supone que uno de los principales mecanismos de acción del EPL es su actividad antioxidante, se determinaron parámetros bioquímicos relacionados con el estado oxidativo en fracción soluble de piel y en sangre.

Visión conjunta de tumorogénesis, supervivencia y peso corporal

Antes de presentar los resultados de las determinaciones se han de exponer algunas observaciones sobre el diseño del experimento. En primer lugar, en el protocolo del estudio se decidió usar el Kodacel[®] con el fin de filtrar la posible radiación UVC emitida por las lámparas. Este filtro no sólo absorbe esta radiación, sino también la fracción de UVB con longitudes de onda más corta, reduciéndose así la carga energética que alcanza la piel de los animales.

Con el tiempo y el uso, el filtro de Kodacel[®] se va volviendo opaco y, por tanto, cada vez absorbía más energía de lo esperado en la región UVB, con lo que fue disminuyendo la relación de energías UVB/UVA que recibieron los animales. Al ser menor la energía UV que atraviesa el filtro, hubo que aumentar los tiempos de irradiación de los animales para alcanzar la dosis energética diaria establecida en el protocolo.

Con las energías establecidas en el protocolo se esperaba que los animales irradiados desarrollasen cánceres de piel principalmente de tipo escamoso y basocelular, sin descartar la posibilidad de que se presentase alguno de tipo melanómico (De Fabo, 2006) al cabo de un tiempo relativamente corto.

La tardanza mostrada por ambos grupos irradiados en la aparición de los tumores, muy probablemente se debió a la menor cantidad de energía recibida, fundamentalmente de tipo UVB.

Los resultados obtenidos indican que a las dosis de radiación administradas, los animales irradiados desarrollaron en un primer estadio queratosis actínica que derivó a tumores epidermoides (carcinoma de células escamosas), pudiendo, en los casos más graves infiltrar hacia la dermis. Seis de los siete animales del grupo irradiado no tratados con EPL mostraron lesiones actínicas, siendo una de ellas infiltrante. Mientras que, de los siete animales del grupo irradiado y tratados con el extracto, sólo dos de ellos presentaban daño actínico claro y otros cuatro mostraban signos de lesión incipiente. Esto indica que el tratamiento retrasó el daño actínico.

Por otra parte, el estudio de supervivencia, basándose en un criterio temporal de aparición de tumores, indicó que el tratamiento con EPL, a la dosis de administración de este estudio, retrasó en tres semanas la tumorogénesis. Consideramos este resultado el más evidente de nuestro trabajo. En este sentido, el análisis de U-Mann-Whitney demuestra que la evolución de los tumores fue significativamente ($p=0,025$) más lenta en los animales irradiados y tratados con el EPL que fueron sacrificados por cumplir el criterio de sacrificio preestablecido que en los animales no irradiados y no tratados con el EPL, sacrificados por dicho criterio. Esta mayor lentitud en la producción de tumores en los animales tratados con EPL probablemente se debe a la actividad antioxidante del extracto, que contribuye a minimizar los efectos carcinogénicos de los radicales libres derivados de la radiación UV y, en general, al menor estrés oxidativo de dichos animales tratados con EPL. En este sentido, no hay que olvidar que la carcinogénesis inducida por RUV se debe en gran parte a la generación de radicales libres que afectan al ADN y a los mecanismos de reparación nuclear, facilitando la aparición de mutaciones.

Estas observaciones hicieron suponer que el tratamiento ejercía su efecto protector en las primeras etapas de la radiación, antes de que el daño fuese demasiado grave. Lo que se vio reforzado por el hecho de que la mayor diferencia entre ambos grupos en cuanto a los percentiles de supervivencia se encontró en el percentil 75 en el que la diferencia fue de 5 semanas, mientras que en los percentiles 50 y 25 las diferencias fueron de 2 y 3 semanas respectivamente.

Por otra parte, se observó que la radiación redujo el peso de los animales, lo que fue prevenido por la administración del EPL.

Estudio 3

Por lo tanto el EPL aumentó la calidad de vida de los animales irradiados no sólo retrasando el daño actínico y la aparición de tumor, sino también previniendo la pérdida de peso corporal inducida por el estrés.

Visión conjunta de los resultados obtenidos de las muestras de sangre de los animales del estudio crónico

No se observaron muchas diferencias en los parámetros sanguíneos analizados. Entre todas las actividades enzimáticas eritrocitarias medidas, sólo la glutatión S-transferasa y la glutatión peroxidasa mostraron diferencias estadísticas.

El hecho de que la actividad GST aumente con la radiación constituiría una respuesta defensiva ante el estrés inducido por la RUV y al aumento de RLO derivados de la misma. La actividad de este enzima depende de la disponibilidad de GSH en el eritrocito. En otros trabajos de nuestro grupo (Mulero y col., 2006) se ha podido observar que un aumento excesivo de la actividad GST puede llegar a consumir las reservas de GSH, superando la actividad de los enzimas implicados en la biosíntesis del glutatión. Este no es el caso de los resultados de este trabajo, ya que no parecen agotarse las concentraciones de GSH sino más bien todo lo contrario, observándose una tendencia al aumento de los valores de GSH en los dos grupos de animales irradiados, que podría considerarse como la expresión de una reacción concomitante al incremento de la actividad glutatión S-transferasa, para mantener la eficacia de dicho enzima. Esta situación sería compatible con un proceso de inducción de la actividad glutatión S-transferasa derivado de la RUV, que no llegase a agotar la disponibilidad de GSH.

Al no haber observado cambios significativos en la actividad GR en ninguno de los cuatro grupos de animales, ese mantenimiento al alza del GSH podría explicarse por un incremento de la actividad γ -glutamyl-cistein sintetasa, tal vez mediado por la acción de factores de transcripción inducidos por el daño oxidativo, en este caso derivado de la acción de la RUV (Moinova y Mulcahy, 1999; Wild y col., 1999a). Conviene recordar que las moléculas de GSH utilizadas en la reacción de conjugación de la GST no se recuperan, ya que el tioéter formado se elimina por orina. En este sentido, la utilización de GSH en las reacciones de detoxificación y neutralización de radicales libres difiere de lo que sucede en las reacciones mediadas por la GPx y la GR, en las cuales el GSH es transformado en GSSG y reducido nuevamente a GSH para ser reutilizado.

En el estudio de los glutaciones eritrocitarios se observó que el tratamiento redujo el GSSG, lo que puede explicarse por la reducción de la actividad glutatión peroxidasa que muestran estos mismos grupos. Por otra parte, tanto el GSH como el GSSG eritrocitarios mostraron una tendencia a aumentar por acción de la RUV, sin embargo en ninguno de los dos casos alcanzó la significación estadística.

Por último, el estudio por factores revela que el tratamiento aumentó la capacidad antioxidante del plasma total. Este resultado concordaría con la reconocida capacidad antioxidante del EPL (Gombau y col., 2006).

En resumen, se observó que la radiación redujo, ligera pero significativamente, la hemoglobina en sangre y aumentó la actividad glutatión S-transferasa. El tratamiento con EPL, por su parte, redujo la actividad glutatión peroxidasa y los niveles de GSSG eritrocitarios y aumentó la capacidad antioxidante del plasma total.

Visión conjunta de los resultados de las determinaciones bioquímicas de piel de los animales del estudio cronico

La acción conjunta de ambos factores de estudio, radiación y tratamiento con EPL, indujeron un aumento de las proteínas solubles en la piel. Así, los animales irradiados y tratados con EPL mostraron un valor de proteínas en la fracción soluble de piel un 40% más elevado que el resto de grupos de animales. Se desconoce la naturaleza de la o las proteínas aumentadas, pero dada la magnitud del aumento sospechamos que puede tratarse de proteínas estructurales de la dermis, como el colágeno y la elastina. Como hipótesis, podemos especular que se trata de una reacción defensiva desencadenada por la radiación UV que sólo se manifiesta si se acompaña del efecto cooperante del EPL. Quizás esta reacción defensiva contribuya decisivamente a ralentizar el desarrollo de los tumores inducidos por la radiación UV. Más adelante se explica la posible razón del incremento de proteína soluble de estos animales.

Como se ha comentado, el aumento de este valor en un grupo concreto no sólo condicionó la expresión de los resultados de las demás variables en función de la proteína presente, sino que además afectó al estudio estadístico de los resultados. Generalmente, como en el estudio 2, se prefiere la expresión de cada variable en función de la proteína de la muestra, sin embargo, debido a este artefacto, se considera más correcto interpretar los

Estudio 3

resultados de las variables de los estudios en piel en función de la masa de tejido correspondiente.

La RUV indujo las actividades enzimáticas de la glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa y aumentó los niveles de GSH, aunque esta última variable no llegó a presentar diferencias estadísticas claras ($p=0,05$). Estos incrementos de actividad concuerdan con el trabajo publicado por nuestro grupo en el que se estudió el efecto de la irradiación con RUV a varias energías en el modelo experimental de ratas *hairless* (Mulero y col., 2006), en el que se observaron que las actividades de los enzimas GR y GPx epidérmicas mostraron un aumento significativo de actividad inducida por la irradiación. Por su parte, el tratamiento con EPL modificó los efectos de la RUV sobre estos enzimas, inhibiendo la inducción de la glutatión reductasa y potenciando la inducción de la glutatión peroxidasa. Esto explicó el aumento del GSSG en el grupo irradiado y tratado con EPL, respecto a su control no irradiado. Todos estos resultados indicaron que el sistema defensivo GPx-GR-GSH-GSSG se mantuvo dentro de unos límites compatibles con una situación de equilibrio, ya que no se observó un aumento significativo de los valores del GSSG, sino más bien todo lo contrario.

En contra de lo esperado, el grupo tratado y no irradiado fue el que presentó el menor valor de actividad antioxidante total (ORAC), una posible explicación podría ser que el EPL, debido a su propia actividad antioxidante, disminuyese las necesidades de algunos antioxidantes endógenos y, por tanto, disminuyera ligeramente la actividad ORAC total de la fracción soluble de piel. No obstante, no se dispone de ninguna evidencia para apoyar esta hipótesis.

Los resultados obtenidos en los estudios de western blot presentan coincidencias y discrepancias con los obtenidos midiendo la actividad enzimática *in vitro*. Así, la expresión de SOD es similar a lo observado midiendo su actividad enzimática, siendo muy parecida en los cuatro grupos de animales. En relación con la CAT, se observó una expresión aumentada en los grupos tratados con EPL, que no se correspondió con un incremento significativo de la actividad enzimática de esos mismos grupos. En cuanto a la GST, la expresión de su forma π valorada en el western blot, aumentó en los dos grupos tratados con EPL y en el irradiado no tratado. Estos cambios no se observaron en las medidas de actividad enzimática. En el caso de este enzima las discrepancias pueden explicarse por el hecho de que la valoración de la actividad enzimática *in vitro* incluye todas las isoformas de GST conjuntamente, mientras que con el western blot sólo se analizó la forma π . Finalmente, la expresión de la GR disminuyó en el grupo tratado con EPL y no irradiado, hecho que no se reflejó en los estudios de actividad enzimática.

Resumiendo los resultados obtenidos en bioquímica de piel, la acción conjunta de la RUV y el EPL indujeron un aumento de la proteína presente en la muestra. La radiación aumentó la actividad GR y GPx y se podría decir que los grupos irradiados presentaron un valor de GSH superior (recordamos, $p=0,05$). Asimismo, los grupos irradiados fueron los que presentaron una mayor capacidad ORAC. Por su parte el tratamiento con EPL redujo los niveles de GSSG, lo que en el estudio por grupos sólo se observó en el grupo tratado y no irradiado, por lo tanto la irradiación inhibió esta reducción de los niveles de GSSG. Los grupos irradiados presentaron un ligero aumento de proteína GST- π . Además el tratamiento con EPL redujo el incremento de GPx inducido por la RUV y, en contra de lo esperado, también redujo la capacidad antioxidante del plasma, en ausencia de estímulo estresante. El tratamiento con EPL mostró una tendencia a aumentar la expresión de las proteínas CAT y GST- π , así como a reducir la expresión de GR en ausencia de estímulo nocivo.

Visión conjunta de los resultados obtenidos de las preparaciones histológicas del estudio de irradiación crónica

El efecto de la RUV sobre los parámetros valorados fue el esperado. La RUV aumentó el grosor del pliegue de la piel y el grosor de la epidermis y de la dermis; en cuanto al grosor de la hipodermis sólo se observaron diferencias significativas entre los grupos no irradiados y los irradiados en la zona más afectada por la RUV, pero no entre las zonas menos afectadas por dicha radiación y los otros dos tipos de muestras estudiadas. La administración del EPL incrementó el aumento del grosor de la epidermis inducido por la RUV, potenciando la reacción defensiva de la piel frente a la RUV. Esto concuerda con la hipótesis planteada por otros autores en la que se considera el engrosamiento de la piel un mecanismo protector frente al daño ejercido por la RUV e inducido por la misma (Podda y col., 1998).

La RUV redujo el número de células de Langerhans presentes en la epidermis en un 15%. Las propiedades inmunoprotectoras del EPL se pusieron de manifiesto, ya que el descenso del número de células de Langerhans en los animales irradiados y tratados con EPL no alcanzó la significación estadística en relación con su control no irradiado.

No se observó ningún efecto del EPL sobre las glándulas sebáceas, que aumentaron por acción de la radiación.

La irradiación aumentó la migración de mastocitos a la zona irradiada. Las zonas irradiadas menos afectadas de los animales tratados con EPL presentaron una menor

Estudio 3

infiltración de mastocitos que las zonas equivalentes de los animales irradiados y no tratados con EPL. Este resultado indicaría un efecto antiinflamatorio favorable del EPL. No obstante, esta diferencia no alcanzó la significación estadística, probablemente por el escaso número de animales y la gran dispersión que presentaron las muestras.

Se observó que el EPL favorece la reacción defensiva de la piel frente al daño inducido por la RUV potenciando la expresión del p53, lo que induciría la reparación del ADN de las células dañadas y, si el daño es muy elevado, la apoptosis de dichas células, salvaguardando la homeostasis tisular. Por otro lado, la irradiación aumentó la proliferación de los queratinocitos (células ki67⁺) y se observó una tendencia del EPL a frenar esta proliferación. Esta observación, junto con el aumento de la expresión de la p53, señalan las posibles vías por las que el EPL puede ejercer su acción en el retraso de la formación de tumor.

Las zonas irradiadas menos afectadas de los animales tratados con EPL presentaron un mayor número de vasos sanguíneos que los animales no irradiados y tratados con EPL. Este resultado simplemente se debe al hecho de que la dermis de los animales tratados con EPL e irradiados es notablemente más gruesa que la de los animales irradiados y no tratados con EPL. En este sentido, recordemos que la expresión del número de vasos/mm no se refiere exactamente a una línea de dermis, sino a la porción de dermis incluida en un mm de longitud del corte. Este aumento del grosor de la dermis por sí sólo explicaría el mayor contenido de proteína soluble en los animales irradiados y tratados con EPL.

Comentarios generales

El hecho de que hayamos demostrado relativamente pocos cambios en los parámetros relacionados con el estrés oxidativo, tanto en función de la irradiación, como en función del tratamiento con el EPL, puede deberse a que la cantidad de RUV administrada ha sido relativamente baja y compensada crónicamente con un engrosamiento de la epidermis, aumento de proteínas, etc.

Al contrario que en las valoraciones realizadas en los estudios de irradiación aguda en modelos animales, los cambios observados en la actividad eritrocitaria no han de deberse exclusivamente a modificaciones alostéricas de la actividad enzimática, puesto que el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento con EPL y/o la irradiación permitió la renovación de los eritrocitos.

La reconocida actividad antioxidante del EPL proporcionaría a los animales tratados una mayor defensa antirradicalar. Por esta razón, cabría suponer que los animales tratados con EPL necesitaran sintetizar menos moléculas antioxidantes endógenas, aunque estuvieran sometidos a los efectos de los rayos UV. De esta manera se explicaría que ambos grupos de animales tratados con EPL presenten una disminución del 13% de la actividad GPx eritrocitaria, en comparación con los ratones no tratados con el extracto. Otra prueba del efecto protector antioxidante del EPL sería la menor concentración de GSSG y los valores más bajos del cociente GSSG/GSH de los animales tratados con EPL, en relación con los no tratados con el EPL, especialmente en los animales no irradiados (disminuciones del 26% y del 30% respectivamente).

Teniendo en cuenta el esquema general de producción de radicales libres (figura 1), se puede suponer que el EPL previene la producción del anión superóxido o lo neutraliza, y conviene recordar que es el primero que se produce en las oxidaciones de la cadena respiratoria mitocondrial. Ello significaría que, consecuentemente, se evita la generación subsiguiente del anión hidroxilo y de derivados peróxidos y explicaría la menor necesidad de la GPx y la menor producción de GSSG, junto con una menor inducción de la actividad SOD.

Otra prueba de la actividad protectora del EPL se manifiesta en el aumento actividad antioxidante total del plasma según el test ORAC, ya que en los animales tratados con EPL fue un 40% superior en relación a los animales no tratados. Como se ha comentado en la exposición de los resultados, los valores de actividad antioxidante del plasma tratado con TCA (proteínas precipitadas) no muestran diferencias entre grupos. Esto podría deberse a la precipitación de compuestos funcionales del EPL o a que este actúa aumentando ciertas proteínas plasmáticas. Esta última hipótesis podría explicar los resultados obtenidos en piel. Así, la mayor capacidad antioxidante observada en el grupo de animales irradiados y tratados con EPL, al expresarla por g de tejido, se debería a la presencia en la fracción soluble de las muestras de estos animales de una mayor cantidad de proteínas con actividad antioxidante.

En un experimento realizado en cultivos celulares, se valoraron algunos de los compuestos funcionales del EPL, observándose que a las 24h habían sido prácticamente catabolizados (Gombau y col., 2006). Hay que recordar que en este experimento se retiró el EPL la víspera del sacrificio. Con lo que, en nuestro estudio, el efecto propio del EPL en los tejidos puede no manifestarse ya que, desde la última toma hasta la recogida de muestras, parte del EPL puede haberse catabolizado.

Estudio 3

La demostración de que el EPL retrasa la aparición de tumores debidos a la radiación UV, probablemente por a sus efectos anti-radicales, sugiere su utilidad en la prevención del cáncer de piel secundarias a la exposición a la radiación UV. Asimismo, la capacidad antirradicalar del EPL podría explicar también el efecto protector sobre la pérdida de peso observado en el grupo de animales irradiados y tratados con EPL.

4. ESTUDIO 4: EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE EPL EN RATONES *HAIRLESS* SOMETIDOS A RUV AGUDA

4.1. Resultados del estudio 4

Los parámetros bioquímicos de sangre y los estudios de western blot de epidermis se realizaron en los 7 animales/grupo del lote de irradiación aguda a 600mJ/cm². Las observaciones de anatomía patológica se llevaron a cabo en los 7 animales/grupo del lote de irradiación aguda a 400mJ/cm². Así el tamaño muestral de todos los parámetros determinados en este estudio es de 7, excepto la valoración de la proliferación celular mediante el recuento de células PCNA⁺ que en el grupo D sólo pudo llevarse a cabo el recuento en 6 animales.

4.1.1. Parámetros relacionados con el estrés oxidativo en sangre de los animales del estudio de irradiación aguda en ratones

Hemoglobina y hematocrito

En la tabla 28 se recogen los valores de hemoglobina y hematocrito de los cuatro grupos de estudio.

	A	B	C	D
Hemoglobina (g/100ml sangre)	16,8±1,1	17,1±1,3	16,1±1,5	17,0±0,6
Hemoglobina (g/ml eritrocitos) ^R	0,36±0,02 _B	0,39±0,02 _A	0,36±0,03 _D	0,39±0,01 _C
Hematocrito (%) ^R	46,20±1,15 _B	43,86±1,77 _A	44,95±1,07	43,77±1,78

Tabla 28: valores de la hemoglobina y el hematocrito en los distintos grupos de estudio (media ± desviación típica, N=7); **R** indica diferencias estadísticas debidas a la radiación (t-Student) y las letras en subíndice (A-D) indican los grupos que muestran diferencias significativas entre sí (t-Student); (p<0,05).

Estudio 4

La determinación de la hemoglobina se realizó a partir de una muestra de sangre total. Los valores de hemoglobina de los distintos grupos en función del volumen de sangre no mostraron diferencias significativas, ni en el estudio entre grupos, ni por el efecto de ninguno de los factores de estudio. Por otra parte, se observó que la RUV redujo el hematocrito (t-Student, $p=0,005$; figura 57); una posible explicación a esto sería que la RUV indujese hemólisis.

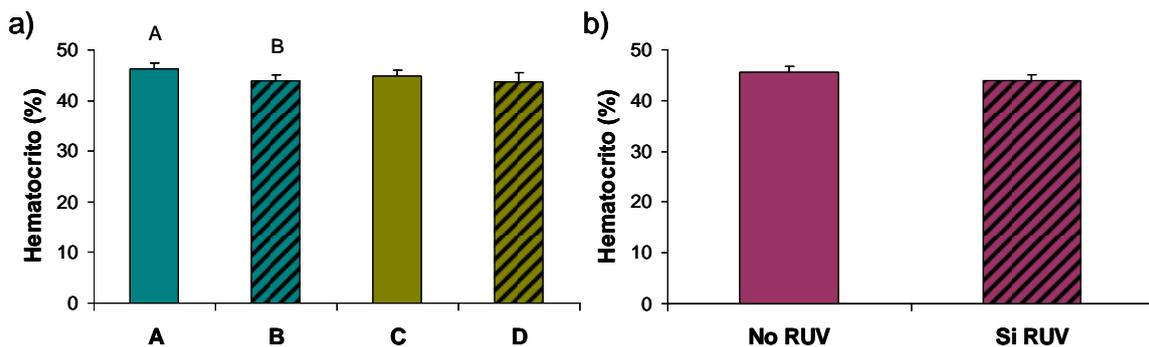


Figura 57: representaciones gráficas de los valores de hematocrito: a) según grupos de estudio (t-Student); b) en función de la irradiación, diferencia significativa (t-Student); ($p<0,05$).

La expresión de la hemoglobina en función del volumen de eritrocitos estaba aumentada en los grupos irradiados (figura 58). Debido a que los eritrocitos son células anucleadas, no tienen capacidad de síntesis de hemoglobina y, al ser su tasa de renovación de 120 días, en 48 horas no es posible que se hayan renovado los eritrocitos de las muestras. Por tanto la hemoglobina determinada en sangre total había de ser la suma de la presente en los eritrocitos y la disuelta en el plasma, reforzando la hipótesis de que la RUV hubiese inducido hemólisis.

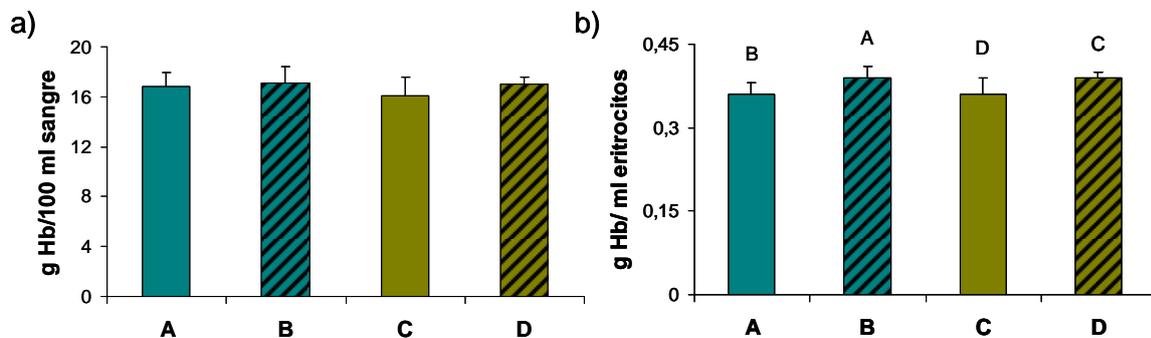


Figura 58 representación de los niveles de hemoglobina en los cuatro grupos de estudio a) expresada por volumen de sangre total; b) expresada por volumen de eritrocitos (t-Student; $p<0,05$).

Actividades enzimáticas

En la tabla 29 se recogen los valores de las actividades enzimáticas eritrocitarias de los cuatro grupos de estudio.

	A	B	C	D
SOD (kU/g Hb) ^T	2,02±0,37 _B	1,46±0,33 _{AD}	2,24±0,20	2,27±0,26 _B
CAT (kU/g Hb)	52,4±8,34 _C	56,98±7,31	70,67±12,31 _A	54,4±17,64
GST (U/g Hb) ^T	1,26±0,25	1,03±0,32 _D	1,65±0,52	1,37±0,20 _B
GR (U/g Hb) ^R	6,88±3,19	4,08±1,89	6,00±1,52 _D	3,31±1,40 _C
GPx (U/g Hb) ^{RT}	121,06±5,80 _C	116,97±17,38	145,29±22,49 _A	127,2±14,65

Tabla 29: Valores de la actividad enzimática eritrocitaria de los cuatro grupos de estudio (media ± desviación típica, N=7). **R** indica diferencias estadísticas debidas a la radiación (t-Student o U-Mann-Whitney); **T** indica diferencias estadísticas debidas al tratamiento (t-Student o U-Mann-Whitney) y las letras en subíndice (A-D) indican los grupos que muestran diferencias significativas entre sí (t-Student o Kruskal-Wallis y U-Mann-Whitney); (p<0,05).

En los grupos no tratados con el EPL se observó que la actividad SOD se redujo con la radiación, el EPL por su parte previno esta pérdida de actividad (figura 59a). En conjunto, ambos grupos tratados mostraron mayores niveles de actividad que los grupos no tratados (t-Student, p=0,001; figura 59b).

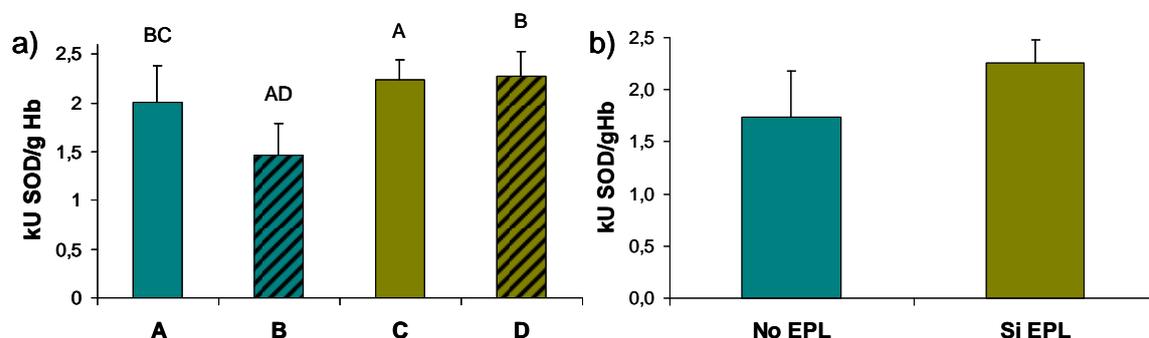


Figura 59: representación de los niveles de actividad SOD eritrocitaria en los cuatro grupos de estudio a) según los grupos de estudio SOD (t-Student); b) en función del tratamiento (t-Student); (p<0,05).

Estudio 4

El grupo tratado y no irradiado mostró unos niveles de actividad CAT significativamente mayores que el grupo control (t-Student), por lo que en ausencia de estímulo estresante (RUV) el tratamiento con EPL aumentó los niveles de actividad de este enzima. Este hecho no se observó en el estudio por factores, en el que ni la irradiación ni el tratamiento mostraron diferencias estadísticamente significativas (figura 60).

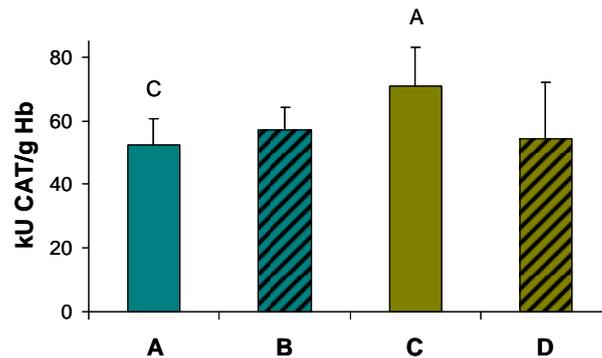


Figura 60: Niveles de actividad CAT eritrocitaria según los grupos de estudio (t-Student, $p < 0,05$).

El estudio por grupos de la actividad GST eritrocitaria sólo mostró diferencias significativas entre ambos grupos irradiados (figura 61a). Probablemente la gran dispersión de los resultados enmascarase diferencias más claras. En el estudio por factores se demostró que el tratamiento aumentó significativamente los niveles de actividad de este enzima (t-Student, $p = 0,012$; figura 61b). Por otra parte se observó una tendencia de la RUV a reducir los niveles de actividad GST, pero no se alcanzó significación estadística.

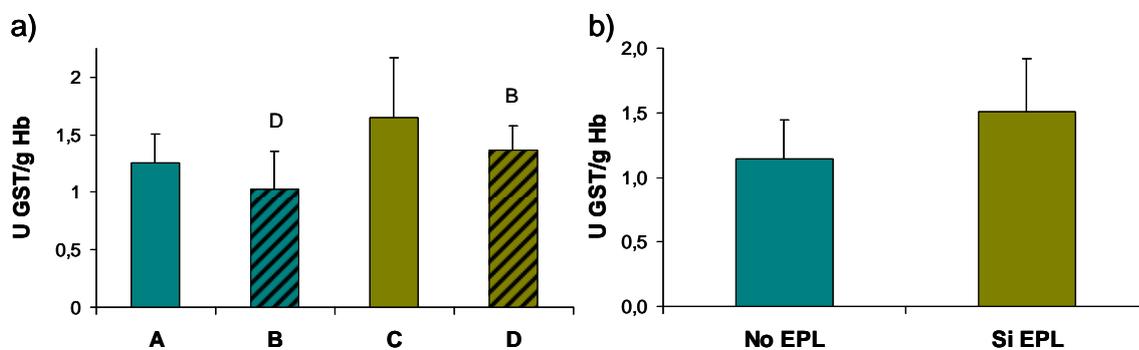


Figura 61: representación de los niveles de actividad GST eritrocitaria; a) según los cuatro grupos de estudio (t-Student); **b)** en función del tratamiento con EPL (t-Student); ($p < 0,05$).

En el estudio por factores se observó que la RUV influyó en la glutatión reductasa eritrocitaria reduciendo su actividad (U-Mann-Whitney, $P=0,001$; figura 62b). Sin embargo en el estudio por grupos, esta diferencia sólo se apreció entre los animales tratados con EPL (figura 62a), probablemente debido a la gran dispersión de los resultados del grupo no tratado y no irradiado. Por otra parte se observó una tendencia de los grupos tratados a mostrar una menor actividad de este enzima que sus respectivos grupos tratado, pero no se alcanzó la significación estadística ni entre grupos, ni en función del tratamiento.

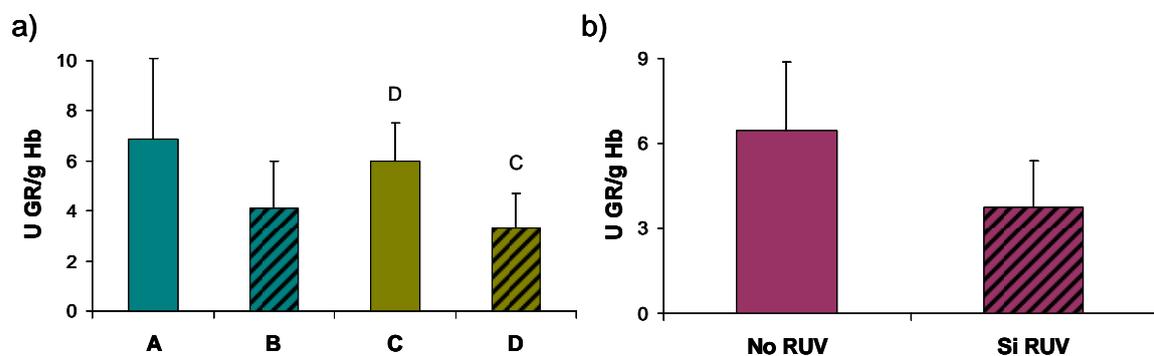


Figura 62: representación de los niveles de actividad GR eritrocitaria: a) según los cuatro grupos de estudio (t-Student); b) en función de la irradiación (U-Mann-Whitney); ($p<0,05$).

La actividad GPx eritrocitaria mostró diferencias entre el grupo tratado con EPL y no irradiado con el grupo control (t-Student; figura 63a); esto indicó que el tratamiento, en ausencia de un estímulo estresante (RUV), aumentó los niveles de actividad de este enzima. En el análisis por factores se demostró que el tratamiento afectó a esta variable (t-Student, $p=0,014$; figura 63c). Se observó una tendencia de la RUV a reducir los niveles de actividad GPx. Sin embargo no se observaron diferencias significativas que lo corroborasen ni el estudio por grupos ni por factores.

Estudio 4

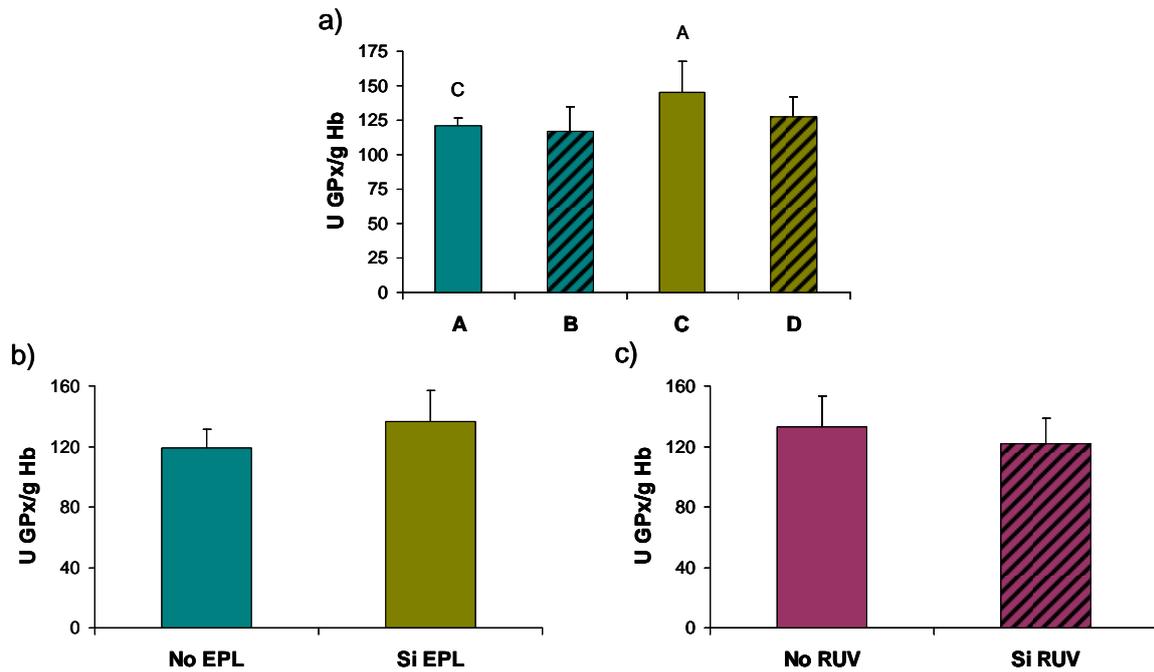


Figura 63: representación de los niveles de actividad GPx eritrocitaria: **a)** según los cuatro grupos de estudio (t-Student); **b)** según el tratamiento con EPL (t-Student, no significativo); ($p < 0,05$).

Niveles de glutaciones sanguíneos

- Glutaciones eritrocitarias: los niveles de glutaciones eritrocitarias de los cuatro grupos de estudio se recogen la tabla 30.

	A	B	C	D
GSH (μ moles GSH/g Hb)	6,48 \pm 0,94	6,44 \pm 1,27	7,00 \pm 1,10 _D	5,77 \pm 0,75 _C
GSSG (μ moles GSSG/g Hb) ^R	0,27 \pm 0,01	0,31 \pm 0,05	0,29 \pm 0,04	0,31 \pm 0,03
Razón (GSH/GSSG) ^R	23,97 \pm 3,24 _B	20,47 \pm 2,59 _A	24,42 \pm 2,98 _D	18,64 \pm 1,72 _C

Tabla 30: valores de los niveles de glutaciones eritrocitarias en los cuatro grupos de estudio (media \pm desviación típica, N=7); **R** indica diferencias estadísticas debidas a la radiación (t-Student o U-Mann-Whitney) y las letras en subíndice (A-D) indican los grupos que muestran diferencias significativas entre sí (t-Student); ($p < 0,05$).

En eritrocitos, los niveles de GSH mostraron diferencias entre ambos grupos tratados, siendo más elevados en el del grupo no irradiado (figura 64). Este aumento podría deberse a la presencia de *P. leucotomos* en la muestra, cuya acción antioxidante, en ausencia de un estímulo oxidante como la radiación, evitase el consumo de la molécula GSH. Sin embargo, en conjunto, el análisis por factores no mostró diferencias debidas ni a la RUV ni al tratamiento con EPL sobre esta variable.

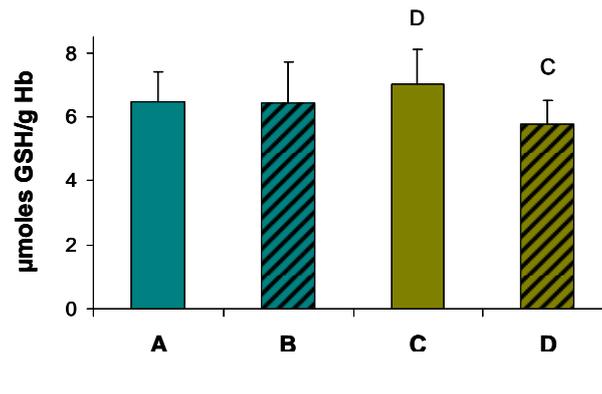


Figura 64: representación de los niveles de GSH eritrocitaria según los cuatro grupos de estudio (t-Student; $p < 0,05$).

En el estudio por factores se demostró que la RUV aumentaba los valores de GSSG eritrocitario. En cambio, en el análisis por grupos de estudio no se detectaron diferencias significativas (U-Mann-Whitney, $p = 0,011$; figura 65b).

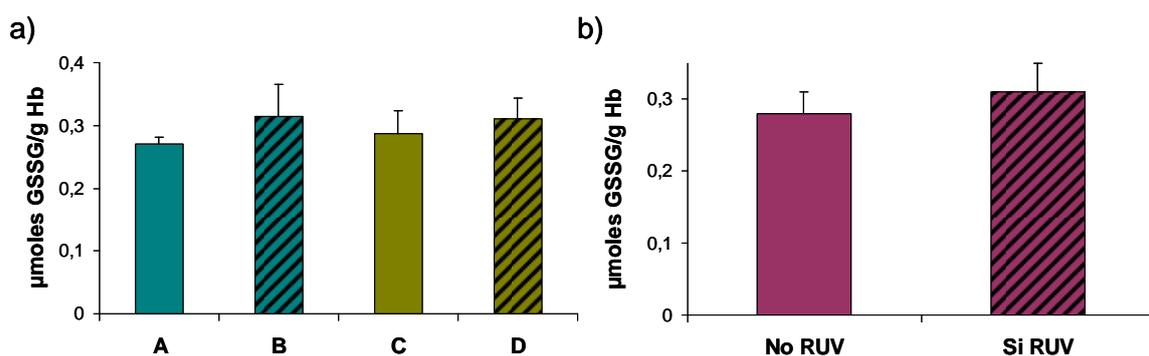


Figura 65: representación de los niveles de GSSG eritrocitaria; a) según los cuatro grupos de; b) en función de la irradiación (U-Mann-Whitney); ($p < 0,05$).

Estudio 4

El efecto de la RUV se hizo más patente en la valoración del balance de glutaciones eritrocitarias, observándose diferencias significativas debidas a la radiación tanto en el estudio por factores (t-Student, $p < 0,001$; figura 66b), como en el análisis entre grupos de estudio; en este último caso se observaron diferencias entre los grupos irradiados y sus respectivos no irradiados (t-Student, figura 66a).

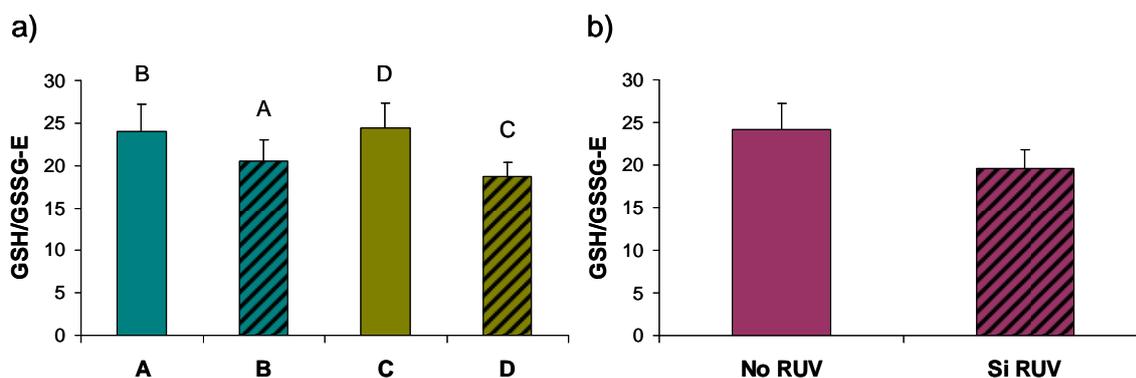


Figura 66 representación de la relación GSH/GSSG eritrocitaria; **a)** según los cuatro grupos de estudio (t-Student); **b)** en función de la radiación (T-Student, $p < 0,001$).

- Glutaciones plasmáticos los niveles de glutaciones plasmáticos de los cuatro grupos de estudio se recogen la tabla 31.

	A	B	C	D
GSH (nmoles GSH/ml plasma)	15,95±4,13	14,19±5,35	16,82±4,51	15,19±2,88
GSSG (nmoles GSSG/ml plasma)	14,50±0,87 _C	15,30±1,71	17,32±0,90 _{AD}	14,65±1,66 _C
Razón	1,09±0,24	0,94±0,37	0,98±0,28	1,05±0,23

Tabla 31: valores de los niveles de glutaciones plasmáticos en los cuatro grupos de estudio (media ± desviación típica, N=7); las letras en subíndice (A-D) indican los grupos que muestran diferencias significativas entre sí (Kruskal-Wallis y U-Mann-Whitney); ($p < 0,05$).

Los niveles de glutaciones plasmáticos no mostraron diferencias en el estudio por factores, como tampoco lo mostró la relación entre ambos glutaciones. Se observó una tendencia de los grupos tratados con EPL a presentar unos mayores niveles de GSH, sin embargo la diferencia no alcanzó la significación estadística.

En cuanto al estudio por grupos se detectaron diferencias en el estudio de la forma oxidada, al mostrar el grupo tratado con EPL y no irradiado niveles de GSSG mayores que el no tratado y no irradiado y el tratado e irradiado. Debido a que este grupo fue el que presenta mayores niveles de GSH, no se observaron diferencias entre la relación GSH/GSSG de este grupo con los demás (figura 67).

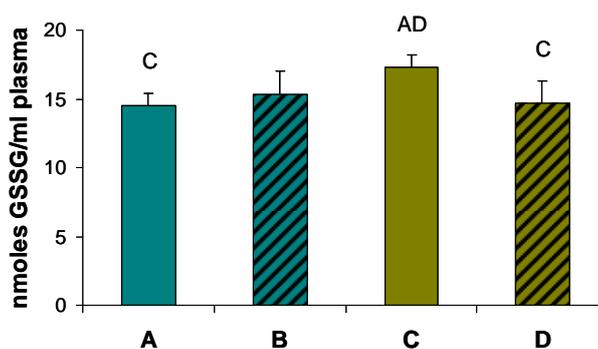


Figura 67: representación de los niveles de GSSG plasmáticos en los cuatro grupos de estudio (U-Mann-Whitney; $p < 0,05$).

En la valoración global, en el estudio de la relación entre glutaciones, no se observaron diferencias significativas ni entre grupos ni debidas a los factores de estudio; los niveles de ambos glutaciones se mantuvieron entre unos valores de equilibrio probablemente regulados por los enzimas implicados en su consumo y reconversión.

Valoración de la capacidad antioxidante del plasma por el método ORAC

En la tabla 32 se recogen los valores de actividad antioxidante del plasma de los cuatro grupos de estudios determinada por el método ORAC.

	A	B	C	D
ORAC ($\mu\text{moles TE/ml plasma}$)^T	8,86 \pm 3,38	7,44 \pm 2,43	10,39 \pm 2,26	9,68 \pm 2,69

Tabla 32: niveles de inhibición de la formación de peroxilos (ORAC) en los cuatro grupos de estudio (media \pm desviación típica, N=7), T indica diferencias debidas al tratamiento con EPL (t-Student; $p < 0,05$).

El estudio de la actividad antioxidante del plasma nativo, medida por el método ORAC, no mostró diferencias significativas entre los grupos de estudio. Sin embargo la

Estudio 4

comparación en función del tratamiento indicó que el EPL aumentaba la capacidad antioxidante del plasma (t-Student, $p=0,034$; figura 68b).

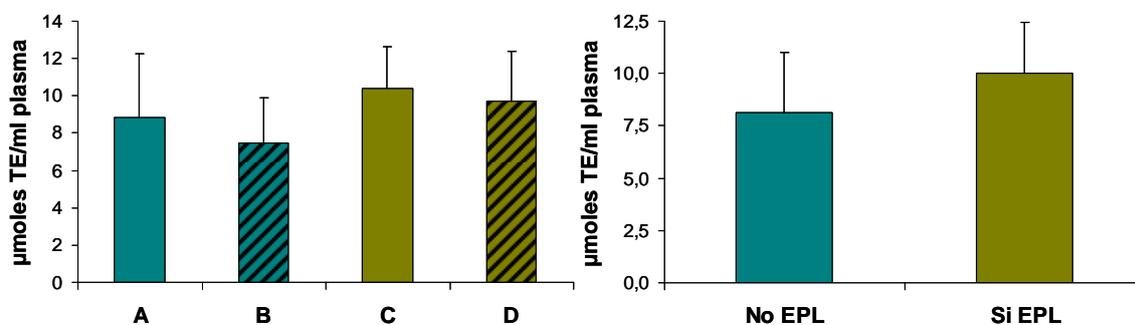


Figura 68 representación de la capacidad antioxidante (ORAC) plasmática; **a)** según los cuatro grupos de estudio; **b)** en función del tratamiento con EPL (t-Student); ($p<0,05$).

4.1.2. Valoración mediante western blot de la presencia de enzimas antioxidantes en al epidermis de los animales del estudio de irradiación aguda en ratones

Al igual que en el estudio de irradiación crónica, en las valoraciones de western blot de este estudio hemos realizado el análisis estadístico, mediante el cual se hacen más evidentes las diferencias observadas en las fotografías de las membranas. En la tabla 33 se exponen los resultados de las valoraciones de proteína de los enzimas antioxidantes de epidermis por western blot; los valores hacen referencia a las medias \pm desviaciones típicas de cada grupo de estudio en cuanto a la relación de densitometría de cada uno de los enzimas respecto al de la actina.

	A	B	C	D
SOD/ACT	0,42 \pm 0,19	0,31 \pm 0,14	0,41 \pm 0,28	0,40 \pm 0,27
CAT/ACT^R	1,62 \pm 0,42 _B	1,00 \pm 0,32 _A	2,06 \pm 0,61 _D	1,00 \pm 0,36 _C
GST/ACT^R	5,52 \pm 1,96 _B	3,47 \pm 1,29 _A	3,89 \pm 1,53 _D	2,61 \pm 1,06 _C
GR/ACT^R	1,21 \pm 0,39 _B	0,53 \pm 0,30 _A	1,34 \pm 0,63 _D	0,55 \pm 0,16 _C

Tabla 33 valores de proteína de los enzimas antioxidantes epidérmicos en relación a la actina (media \pm desviación típica, N=7). **R** indica la influencia de la radiación en los valores de la variable (t-Student) y las letras en subíndice (A-D) indican los grupos de estudio que muestran diferencias ente sí (t-Student); (p<0,05).

La relación SOD/ACT no mostró diferencias estadísticamente significativas ni entre grupos de estudio, ni en función de los factores. Sin embargo destacó que el menor valor lo presenta el grupo no tratado e irradiado, mientras que el nivel del tratado e irradiado se mantuvo al mismo nivel que el grupo tratado no irradiado. Esta apreciación no fue respaldada por la estadística, probablemente debido a la gran variabilidad interindividual observada.

Los niveles de CAT/ACT se vieron reducidos por acción de la RUV, hecho que se detectó tanto en la comparación por grupos como en el estudio por factores (t-Student, p<0,001, figura 69b). El tratamiento con EPL no influyó en esta variable, a pesar que el grupo tratado con el extracto y no irradiado mostró mayores niveles de CAT que los demás grupos.

Estudio 4

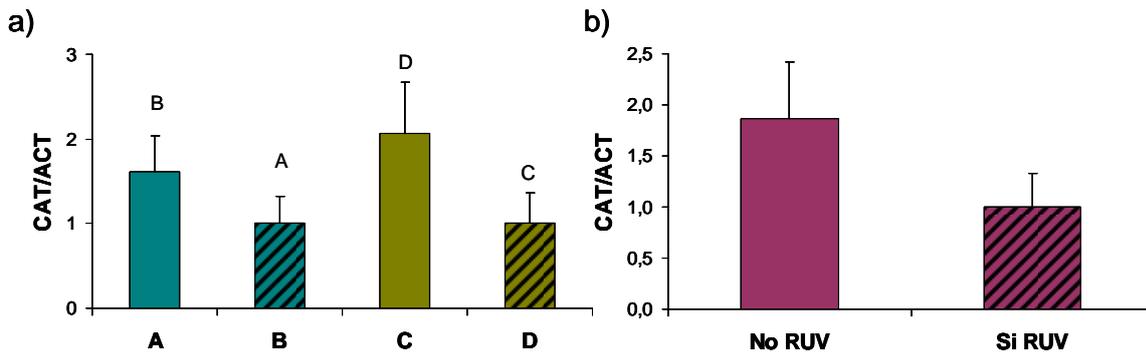


Figura 69: representación de la relación ACT/CAT determinada por western blot; **a)** según los grupos de estudio (t-Student); **b)** según la radiación (t-Student); ($p < 0,05$).

El estudio de la relación GST/ACT epidérmica mostró la influencia de la radiación sobre los valores de la variable tendiendo a reducir los niveles de expresión de la misma tanto en el estudio por grupos (t-Student), como en el estudio por factores (t-Student, $p = 0,011$, figura 70b). Además, se observó una tendencia en los grupos tratados a reducir la GST presente, sin embargo, no se observaron diferencias significativas que corroborasen esa observación ni en el estudio por grupos, ni por factores (t-Student, $p = 0,062$).

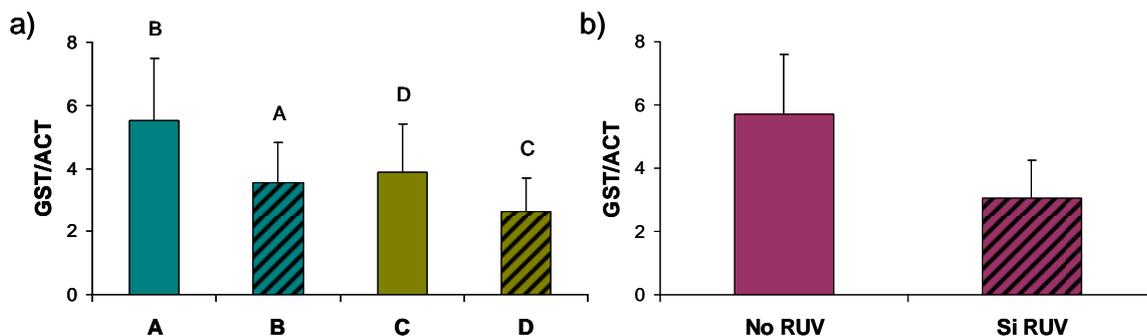


Figura 70: representación de la relación GST/ACT determinada por western blot; **a)** según los grupos de estudio (t-Student); **b)** según la radiación (t-Student); ($p < 0,05$).

Los valores de la relación GR/ACT se vieron reducidos por la acción de la RUV, lo que quedó demostrado tanto en el análisis por grupos, como por el factor (t-Student, $p < 0,001$; figura 71b). Los grupos tratados con EPL mostraron niveles ligeramente mayores que los no tratados, sin embargo esta diferencia no alcanzó la significación estadística.

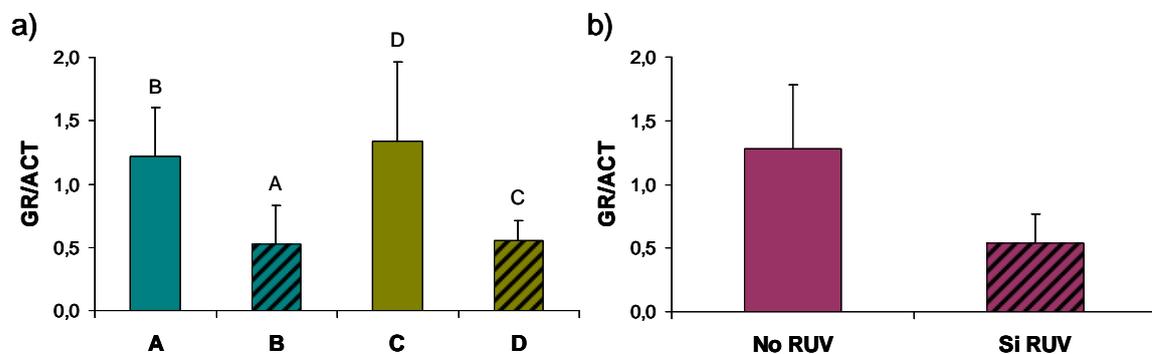


Figura 71: representación de la relación GR/CAT determinada por western blot; **a)** según los grupos de estudio (t-Student); **b)** según la radiación (t-Student); ($p < 0,05$).

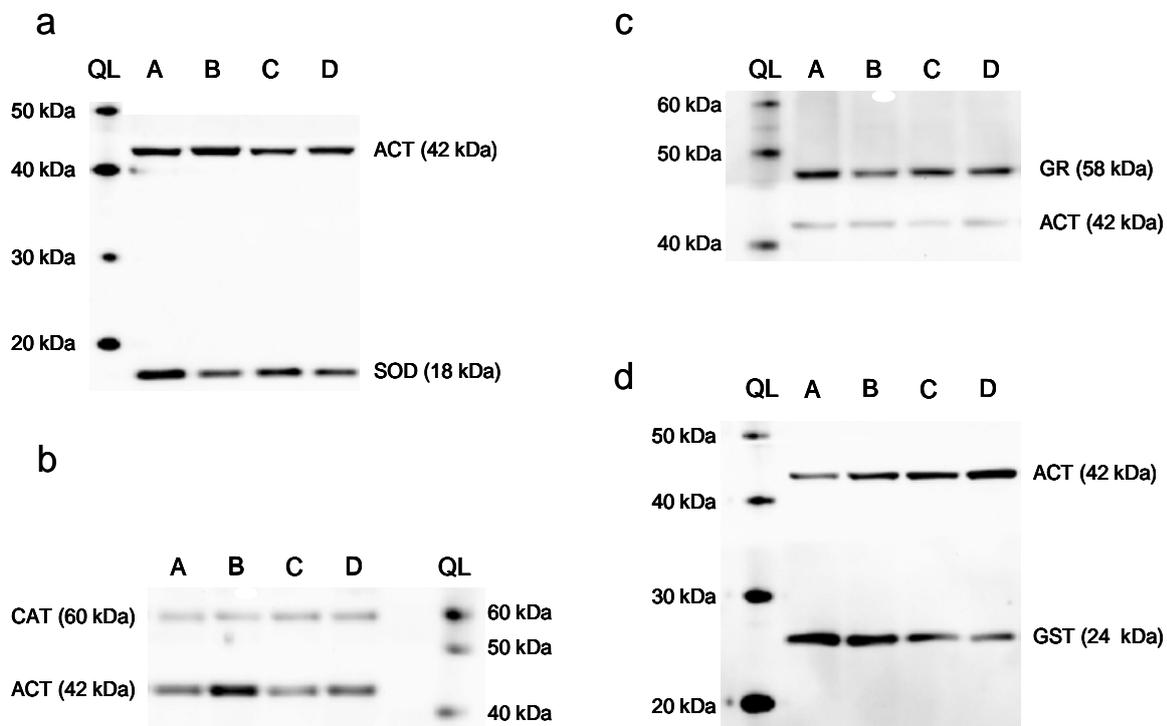


Figura 72: fotografía de las membranas de las determinaciones realizadas por la técnica de western blot en fracción soluble de epidermis de ratón; QL indica la calle correspondiente al marcador de pesos moleculares quimioluminiscentes; A-D grupos de estudio; a) determinaciones de SOD y ACT; b) determinaciones de CAT y ACT; c) determinaciones de GR y ACT; d) determinaciones de GST y ACT.

Estudio 4

4.1.3. Observaciones realizadas en las muestras de anatomía patológica de la piel de los animales del estudio de irradiación aguda en ratones

Los cortes histológicos de la piel de los ratones del estudio de irradiación aguda fueron teñidos bajo las técnicas clásicas de hematoxilina-eosina y orceína-Shikata y la técnica de inmunohistoquímica frente a los antígenos PCNA y p53.

Tinciones clásicas: hematoxilina-eosina y orceína-Shikata

La observación mediante microscopía óptica de los cortes de piel teñidos bajo estas técnicas reveló ciertas diferencias entre los cuatro grupos de estudio, que permitían al ojo humano discriminar entre los factores de estudio: radiación y tratamiento con EPL. Así, la observación de las muestras teñidas mediante hematoxilina-eosina, sugirió la posibilidad de diferenciar los grupos en función del factor radiación, ya que los irradiados, en respuesta a la RUV, presentaban hiperproliferación epidérmica e hiperqueratinización de la capa córnea, en comparación con los grupos no irradiados. Por otra parte, la observación de las muestras teñidas mediante la técnica de la orceína de Shikata, indicaba que los grupos que habían sido tratados con el EPL mostraban una disposición más sólida y ordenada de las fibras elásticas.

La valoración de la capacidad de un observador de discriminar *de visu* las muestras en función de alguno de los dos factores de estudio se realizó en condiciones de anonimato. Para ello, un investigador codificó cada una de las preparaciones con un número aleatorio y, posteriormente, otro investigador, el observador, valoró las preparaciones, asignando las muestras a uno de dos grupos: no irradiado o irradiado, en el caso de las teñidas con hematoxilina-eosina, y no tratado con EPL o tratado con EPL, en las muestras teñidas con orceína de Shikata. Posteriormente se analizó la correspondencia entre los códigos asignados a cada grupo y las muestras pertenecientes al mismo.

La capacidad de discriminar *de visu* si las muestras habían sometidos a radiación fue muy alta, siendo el valor predictivo positivo del 93% y el valor predictivo negativo también del 93%. El índice de concordancia entre los grupos reales y los asignados por el observador obtenido por el test de Cohen fue $\kappa=0,86$, siendo la probabilidad asociada $p<0,001$, por lo que la capacidad de discriminar entre las muestras en función del factor irradiación es altamente significativa.

Por otra parte, en estas muestras no se observaron diferencias debidas al tratamiento en cuanto a la morfología de la epidermis.

En la figura 73 se muestran dos cortes histológicos de la piel de los animales del estudio de irradiación aguda bajo tinción de hematoxilina-eosina. Se puede observar la hiperproliferación epidérmica y la hiperqueratosis que presenta la muestra irradiada (B) en comparación con la no irradiada (A).

Como se ha comentado en la introducción, una característica del fotoenvejecimiento es la elastogénesis inducida por la RUV (Uitto, 2008). Ésta provoca la generación de fibras elásticas de mayor tamaño y forma irregular, aumenta la densidad de fibras en cúmulos, perdiéndose el entramado formado por las fibras y, por tanto, la elasticidad del tejido, lo que se denomina elastosis. En las muestras de este estudio, bajo la tinción con orceína, se observaron diferencias en la presencia de fibras elásticas entre los animales tratados con EPL y los no tratados con el extracto. El EPL favoreció el incremento de estas fibras en la dermis, sobre todo en el contorno de las glándulas sebáceas. Esta disposición de las fibras nos indicó que se mantuvo la red fibrilar de elastina del tejido, lo que hizo suponer que la elastogénesis inducida por el EPL preservaría la elasticidad tisular. Se obtuvieron altos valores predictivos de la capacidad de discriminar *de visu* si las muestras procedían de animales tratados con EPL, siendo el valor predictivo positivo del 87% y el valor predictivo negativo del 100%. El índice de concordancia entre los grupos reales y los asignados por el observador obtenido por el test de Cohen fue $\kappa=0,86$, siendo la probabilidad asociada $p<0,001$, por lo que la capacidad de discriminar entre las muestras en función del factor tratamiento es altamente significativa.

En la figura 74 se muestran dos fotografías de la piel de los ratones del estudio de irradiación aguda bajo la tinción de orceína. Se puede observar que la muestra del animal tratado con EPL (B) presenta una mayor densidad de fibras elásticas, dispuestas ordenadamente, respecto al animal no tratado con el extracto (A), ambos animales pertenecen a grupos no irradiados.

Las observaciones realizadas en las preparaciones de anatomía patológica, indicaron por un lado, que la dosis de irradiación empleada fue suficiente para inducir cambios en el tejido y, por otro, que el EPL alcanzó la piel induciendo cambios en la misma.

Estudio 4

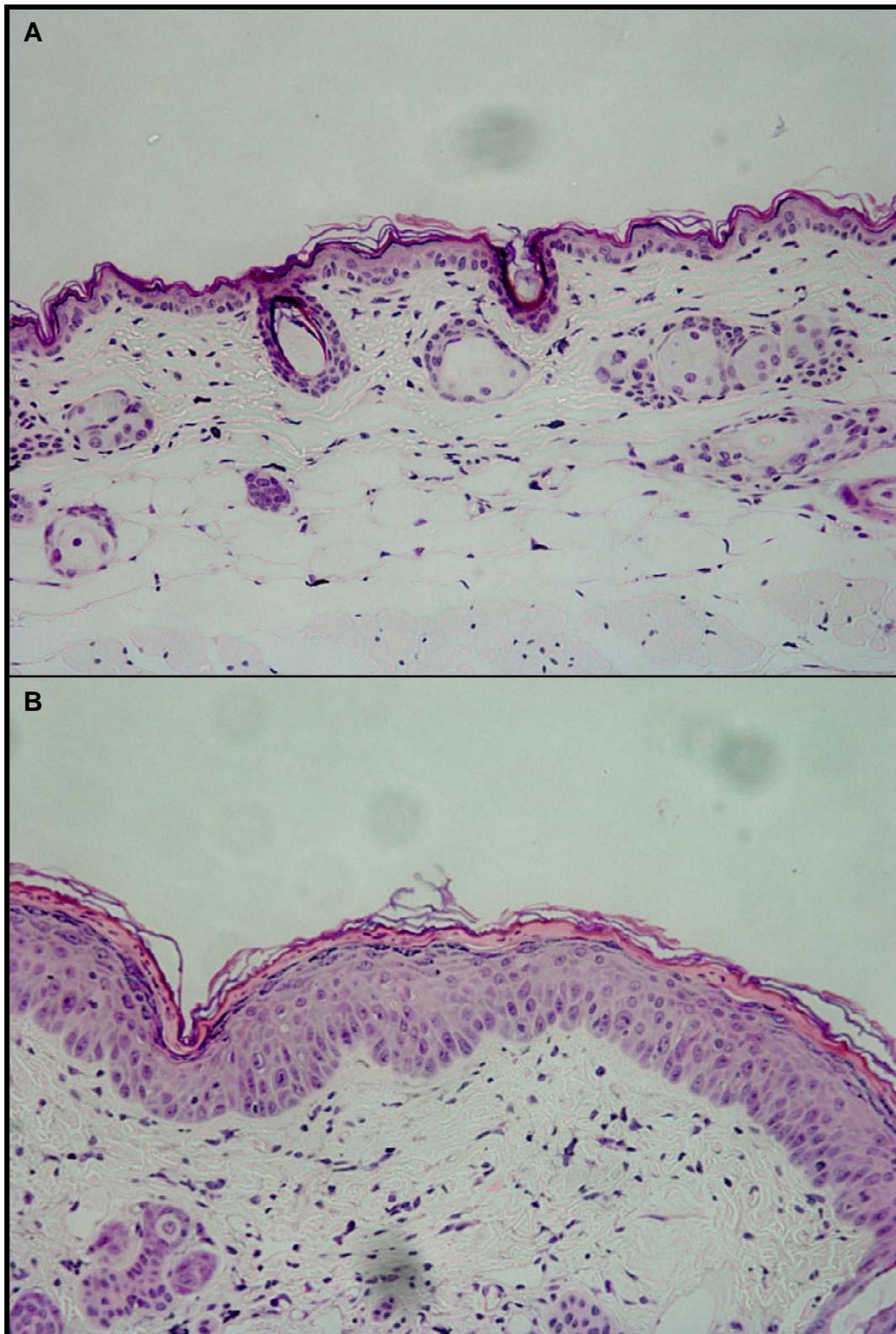


Figura 73: imágenes de la epidermis de los animales del estudio agudo bajo la tinción de hematoxilina -eosina; A: animal no irradiado; B: animal irradiado.

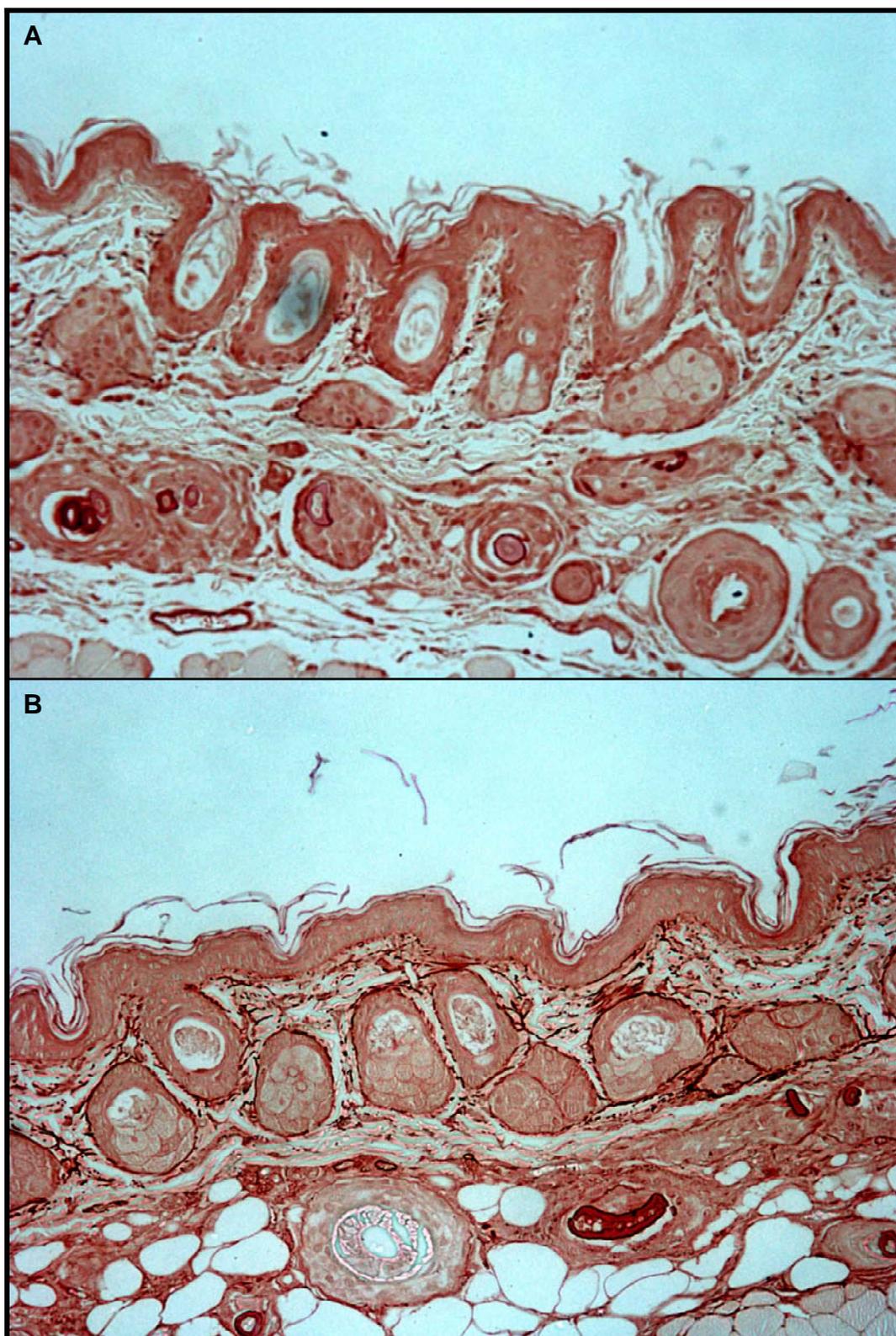


Figura 74: imágenes de la epidermis de los animales del estudio agudo, bajo la tinción de orceína; A: animal no tratado con EPL; B: animal tratado con EPL; ambos animales pertenecen a grupos no irradiados.

Estudio 4

Técnica de inmunohistoquímica frente a los antígenos PCNA y p53

Las muestras histológicas procesadas mediante técnicas de inmunohistoquímica pretendían valorar la respuesta de la p53 y la proliferación celular, células PCNA⁺, ante la irradiación y la posible influencia del tratamiento con EPL sobre dichas variables.

Estas determinaciones se realizaron contando 10 secciones de piel de 100µm de longitud de 7 animales por grupo, excepto en la determinación de la proliferación grupo D que se realizó el recuento en 6 animales. A continuación (tabla 34, figura 75) se muestran los resultados obtenidos de los recuentos, expresándose los resultados como células positivas por sección de piel de 1mm de longitud.

	A	B	C	D
Respuesta al daño (Células p53 ⁺ /mm) ^R	0,0±0,0	54,6±13,1 _D	0,0±0,0	89,3±12,4 _B
Proliferación (Células PCNA ⁺ /mm) ^R	102,1±20,8 _B	211,7±13,3 _{AD}	104,0±11,5 _D	183,8±9,6 _{BC}

Tabla 34: valores de respuesta al daño (células p53⁺) y de proliferación celular (células PCNA⁺) por sección de piel de 1mm de longitud (media ± desviación típica, N=7, excepto determinación de proliferación en el grupo D cuyo tamaño muestral es de 6). **R** indica la influencia de la radiación en los valores de la variable y las letras en subíndice (A-D) indican los grupos de estudio que muestran diferencias entre sí (t-Student); (p<0,05).

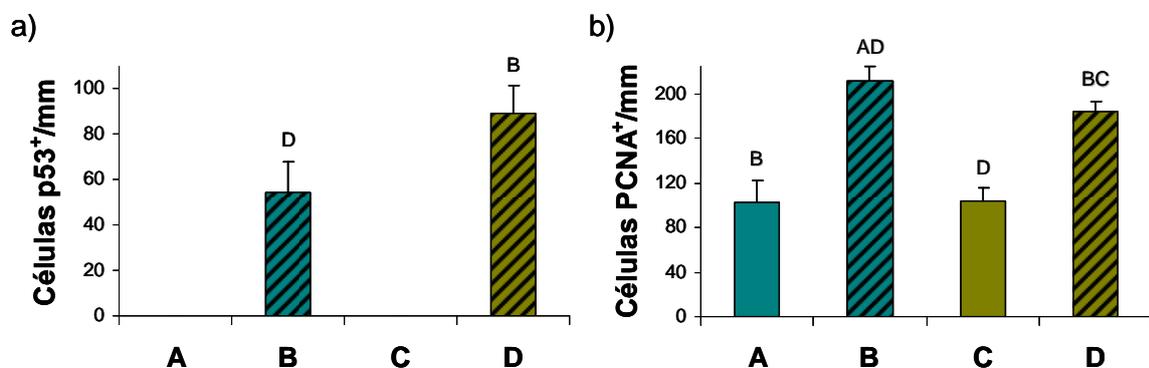


Figura 75: representación de los recuentos de células positivas bajo la tinción de inmunohistoquímica por sección de longitud de epidermis de 1mm; a) células p53⁺/mm; b) células PCNA⁺/mm; (t-Student, p>0,05).

Los resultados anteriores muestran que la irradiación incrementa tanto la proliferación celular (t-Student, $p < 0,001$), como el número de células que responden al daño (diferencia obvia debido a los valores de los grupos no irradiados). Por su parte el tratamiento con EPL aumenta el número de células que expresan p53⁺ inducida por la RUV y reduce el incremento de la proliferación celular inducida por dicha radiación.

En la figura 76 se muestra un corte de piel de un animal de cada uno de los cuatro grupos de estudio teñidos por la técnica de inmunohistoquímica frente al anticuerpo p53. Las muestras correspondientes a animales no irradiados (A y C) no muestran células positivas para este antígeno; mientras que las correspondientes a animales irradiados (B y D) presentan células p53⁺, siendo su presencia mayor en el grupo tratado con EPL (D) que en el no tratado con el extracto (B). Además de la diferencia que se observa entre estos dos grupos en cuanto al número de células positivas, se observa una mayor densidad óptica en las células positivas del grupo irradiado y tratado con EPL (D) que en el del grupo irradiado y no tratado (B).

En la figura 77 se muestra un corte de la piel de un animal de cada uno de los cuatro grupos de estudio teñida por la técnica de inmunohistoquímica frente al anticuerpo PCNA. Se observa que los grupos no irradiados (A y C) presentan una hilera de células proliferantes localizadas en la zona basal. Los grupos irradiados (B y D) muestran células proliferantes en capas suprabasales, siendo mayor el número de células positivas y la densidad del marcaje en el animal no tratado con EPL (B) que en el tratado con el extracto (D).

El aumento de la presencia de células p53⁺ debido a la irradiación indica que el tejido ha sufrido daño y responde ante el mismo parando el ciclo celular para favorecer la acción de los mecanismos reparadores del ADN o, si el daño es muy elevado, inducir la apoptosis de las células transformadas (Rass y Reichrath, 2008). El EPL, por su parte, potencia la síntesis de p53 en el tejido irradiado, lo cual favorece el control de la homeostasis tisular llevada a cabo por dicha proteína.

Por otra parte, el tratamiento con EPL redujo la proliferación celular inducida por la RUV. Esto puede ser una consecuencia de la acción reguladora de la p53, previniendo al tejido de la multiplicación de células transformadas.

Estudio 4

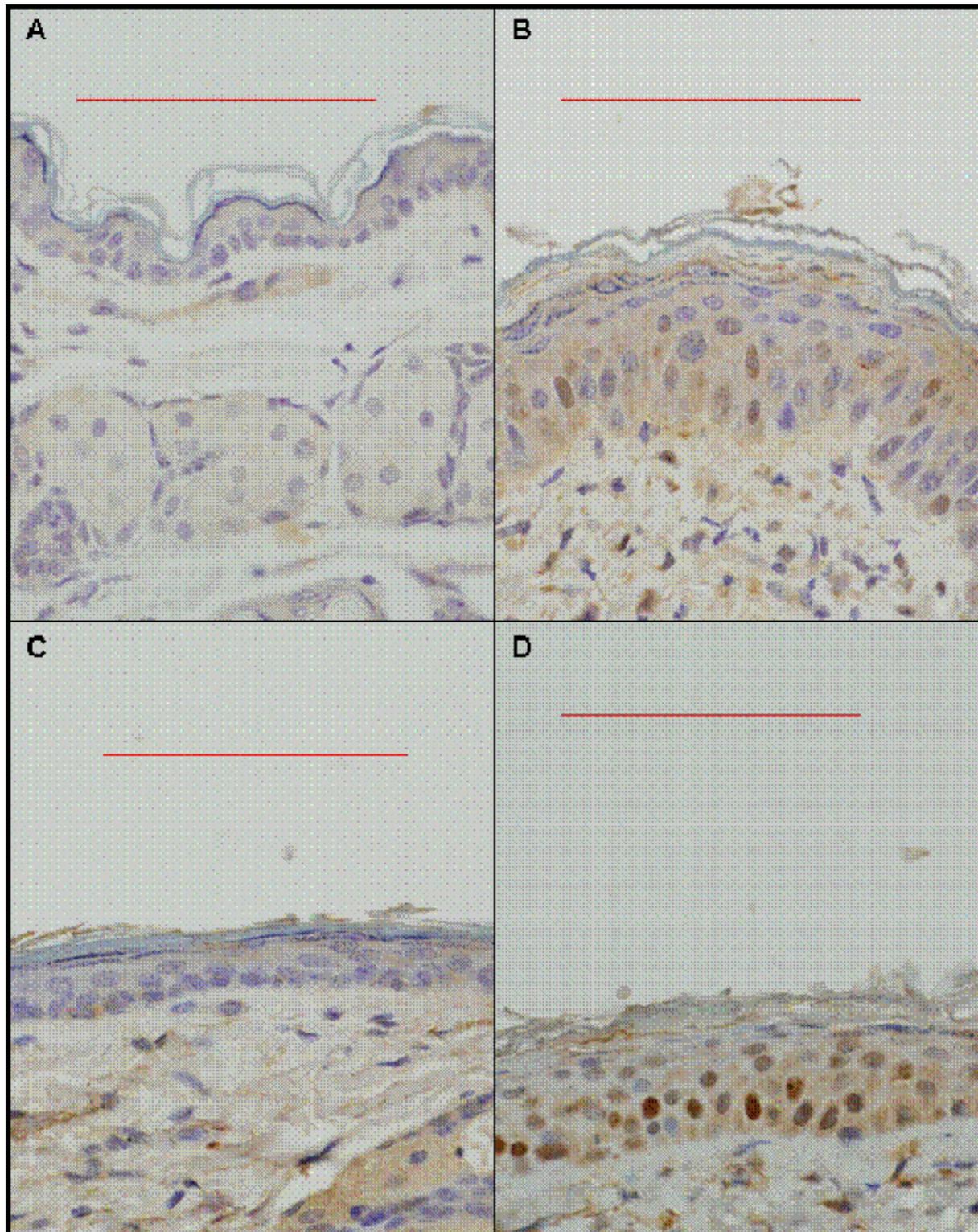


Figura 76: imágenes de la epidermis de los animales del estudio agudo bajo tinción mediante la técnica de inmunohistoquímica frente al antígeno p53; A: animal no tratado con EPL y no irradiado; B: animal no tratado con EPL e irradiado; C: animal tratado con EPL y no irradiado; D: animal tratado con EPL e irradiado. La longitud de la barra es de 100µm.

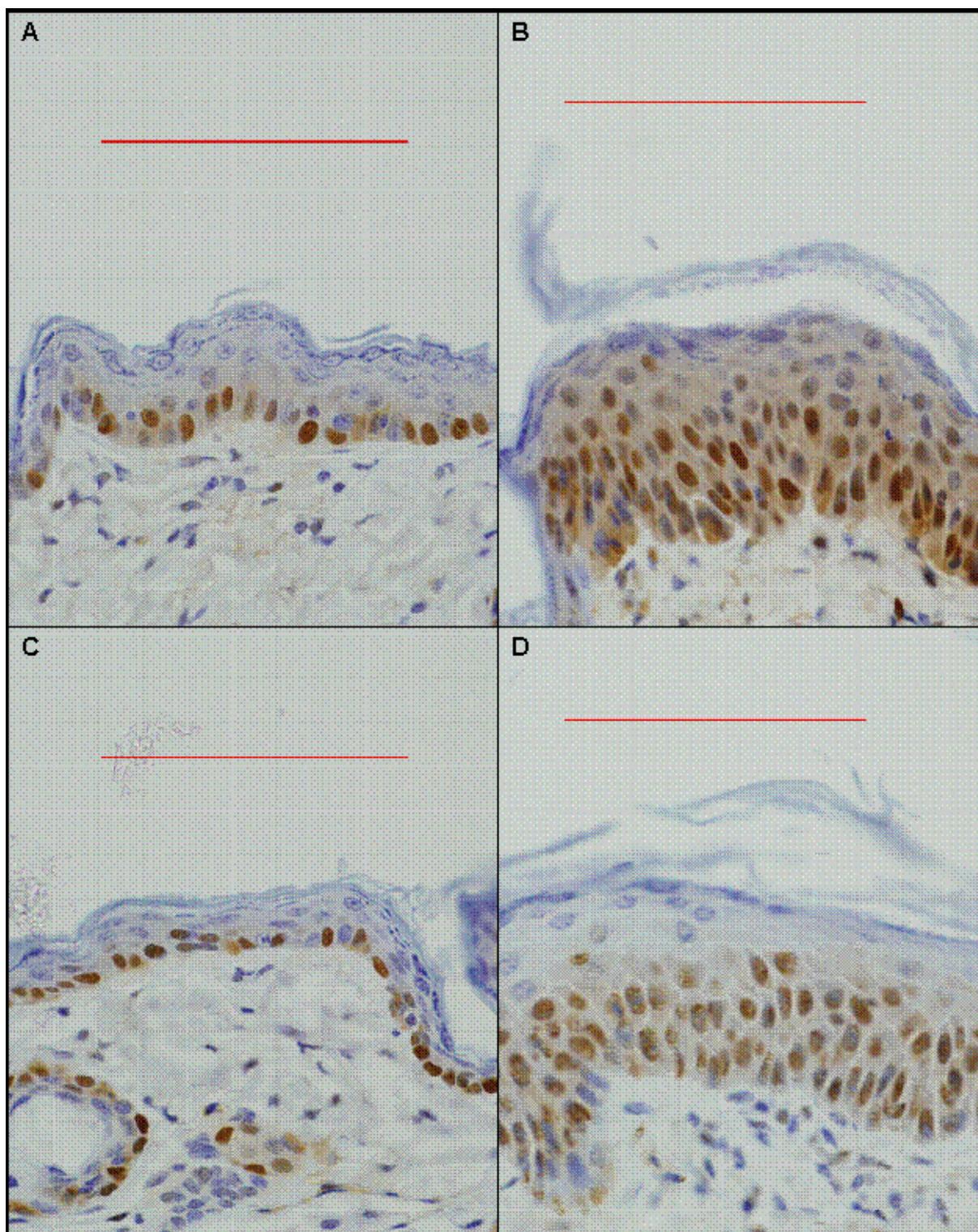


Figura 77: imágenes de la epidermis de los animales del estudio agudo bajo tinción mediante la técnica de inmunohistoquímica frente al antígeno de proliferación PCNA; A: animal no tratado con EPL y no irradiado; B: animal no tratado con EPL e irradiado; C: animal tratado con EPL y no irradiado; D: animal tratado con EPL e irradiado. La longitud de la barra es de 100 μ m.

Estudio 4

4.2. Discusión del estudio 4

Tras el estudio para la valoración del efecto del EPL en un modelo animal sometido a RUV crónica, se planteó este estudio con el fin de valorar los efectos de la RUV aguda sobre los parámetros sanguíneos relacionados con el estado oxidativo en sangre y la expresión de algunas proteínas de la fracción soluble de epidermis, así como las modificaciones en la histología de la piel en ratones *hairless*.

Valoración conjunta de los parámetros valorados en sangre

Las diferencias observadas en los valores del hematocrito podrían ser debidas a la hemólisis provocada por la RUV. Así pues, la hemoglobina determinada en la sangre total no sería exclusivamente la contenida en los eritrocitos, sino que, debido a la hemólisis, parte de la hemoglobina detectada estaría libre en el plasma. Esto implica que al relacionar la hemoglobina respecto al volumen de eritrocitos se está cometiendo un error, el cual condujo a un aumento de la relación hemoglobina/eritrocitos en los grupos irradiados; todo ello hizo que la expresión de los parámetros eritrocitarios en función de la hemoglobina presente en las muestras los grupos irradiados mostrasen valores algo inferiores a los que puedan considerarse reales.

Ambos factores influyeron sobre algunos de los parámetros enzimáticos eritrocitarios. Los valores de las actividades enzimáticas se expresan en función de la hemoglobina eritrocitaria, la cual se vio aumentada en los grupos irradiados, hecho que puede aumentar ligeramente las diferencias entre los grupos irradiados y no irradiados. La radiación redujo la actividad GR y la GPx, la SOD en los grupos no tratados con EPL y se observó una tendencia de la RUV a reducir la actividad GST en los grupos no tratados con el extracto. El tratamiento con EPL aumentó la actividad de los enzimas SOD, GST y GPx, así como la actividad CAT en el grupo no irradiado. Tanto en la actividad SOD como en la actividad GST, se observa que los descensos de actividad debida a la radiación se previenen mediante la administración del EPL.

El tratamiento con EPL no afectó a los niveles de glutationes eritrocitarios. Sin embargo, hay que recordar que los grupos tratados mostraron una actividad GST aumentada, por lo que en ellos, el consumo de GSH sería mayor que en los no tratados;

pese a esto, los niveles fueron similares en todos los grupos, esto se debería a que el EPL presente en los eritrocitos ejerció cierta acción antioxidante que evitó el consumo de esta molécula por otras vías.

En los grupos irradiados aumentaron los niveles de GSSG eritrocitario. Por un lado, se podría pensar que el estrés oxidativo inducido por la RUV indujo un aumento de la oxidación del GSH, sin embargo, la actividad GPx se vio reducida por la RUV, no aumentada. Por otro lado, la actividad GR se redujo con la irradiación, lo cual sí explicaría los altos niveles de GSSG en los grupos irradiados, por la reducción de reconversión del glutatión a su forma reducida.

En cuanto a los valores plasmáticos, el grupo tratado con EPL y no irradiado mostró un nivel más elevado de GSSG plasmático que su control no tratado y que su control irradiado. Sin embargo, también aumentó el contenido de GSH, con lo cual en el balance de glutaciones no se observaron diferencias significativas; mostrando un equilibrio entre ambas formas de esta molécula. Aunque no influya directamente en estas determinaciones habría que recordar que el EPL aumentó la capacidad antioxidante del plasma, según la determinación ORAC.

En resumen, la RUV redujo los niveles de hematocrito, los niveles de actividad enzimática SOD, GR y GPx y aumentó los niveles de GSSG eritrocitario, reduciendo el balance GSH/GSSG eritrocitario. El tratamiento con EPL previno de la reducción de la actividad SOD inducida por la RUV y aumentó los niveles de actividad GST y GPx, los niveles de glutaciones plasmáticos y la capacidad antioxidante del plasma.

Valoración conjunta de la expresión de enzimas en la fracción soluble de epidermis

Se observa una reducción de la expresión de SOD en el grupo irradiado y no tratado con EPL respecto a los otros tres grupos de estudio. Esta reducción fue del 26% respecto a su control no irradiado. El hecho de que la expresión de la SOD no disminuyera en el grupo irradiado y tratado con EPL indicaría un efecto protector del EPL. Estas diferencias observadas no alcanzaron la significación estadística debido a la dispersión de los resultados.

Los otros tres enzimas estudiados (CAT, GST- π y GR) se vieron afectados por la radiación, reduciéndose su expresión. Por otra parte, se observó una tendencia del EPL a reducir la expresión de GST- π siendo un 27% inferior en los grupos tratados con el extracto

Estudio 4

que en los no tratados, sin embargo esta diferencia no alcanzó la significación estadística ($p=0,062$).

Observaciones histológicas

La piel reacciona claramente ante ambos factores de estudio (irradiación y tratamiento con EPL). El daño inducido por una energía de irradiación UV igual a 1DEM se pudo observar de modo cualitativo por la hiperproliferación epidérmica e hiperqueratosis que presentan las muestras irradiadas, que permitió diferenciarlas de las no irradiadas y, cuantitativamente, se observó un aumento significativo de células proliferantes inducido por la RUV. Además, la irradiación aumenta la expresión de p53. Por su parte, el tratamiento con EPL (300mg/kg) reforzó el entramado de fibras elásticas, pudiéndose diferenciar las muestras tratadas de las no tratadas con el extracto; además, este tratamiento redujo el número de células proliferantes inducidas por la RUV y potenció la expresión de p53 inducida por dicha radiación.

En conjunto se observa que la RUV afecta a la piel, la cual, para defenderse, aumenta su grosor y activa los mecanismos dependientes de la p53. El tratamiento con EPL reduce la proliferación inducida por la radiación, aumenta la expresión de p53 y refuerza el entramado de fibras elásticas. Por todo esto, el tratamiento con EPL actúa reduciendo el daño inducido por la RUV.

Comentario general

Los cambios observados en las determinaciones realizadas, indicaron por un lado, que la dosis de radiación empleada fue suficiente para inducir cambios tanto en sangre como en epidermis y, por otro, que el EPL, además de alcanzar la piel, modificó algunos de los parámetros estudiados en sangre o en epidermis, observándose algunas reacciones defensivas inducidas por el EPL frente al daño inducido por la RUV.

5. ESTUDIO 5: EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE CÁPSULAS DE EPL SOBRE EL SISTEMA ANTIOXIDANTE SANGUÍNEO EN HUMANOS

5.1. Resultados de estudio 5

Este estudio se llevó a cabo en 13 participantes, de dos de ellos no se pudo obtener la segunda muestra de sangre, por lo que el tamaño muestral quedó reducido a 11 individuos en todas las determinaciones.

Hemoglobina, hematocrito y hemólisis

	Antes	Después
Hemoglobina (g/100ml sangre)	15,4±2,1	15,5±2,1
Hematocrito (%)	44,21±6,50	45,07±6,66
Hemólisis (%)	9,06±2,80	10,27±3,47

Tabla 35: valores de hemoglobina, hematocrito y hemólisis inducida por H₂O₂ antes y después del tratamiento con cápsulas de EPL (media ± desviación típica); no se observaron diferencias estadísticas (t-Student para muestras apareadas; p<0,05).

Como se muestra en la tabla 35, que recoge los valores de hemoglobina, hematocrito y hémolisis inducida por H₂O₂, en el estudio de estas tres variables no se detectaron diferencias significativas debidas al tratamiento con cápsulas de EPL, por lo que se consideró que el producto no afectó a los valores de estos parámetros.

Estudio 5

Actividades enzimáticas

La tabla 36 recoge los valores de las actividades enzimáticas eritrocitarias antes y después del tratamiento con cápsulas de EPL.

	Antes	Después
SOD (U/g Hb)^T	1432±506	2013±1115
CAT (KU/g Hb)^T	240±59	189±55
GST total (U/g Hb)	1,18±0,36	1,31±0,39
GST termoestable (U/g Hb)	0,12±0,05	0,12±0,06
GST residual (%)	10,37±2,44	9,63±3,37
GR (U/g Hb)	2,65±0,49	2,61±0,79
GPx (U/g Hb)	19,11±4,26	20,16±6,12

Tabla 36: valores de las actividades enzimáticas relacionadas con el estado oxidativo antes y después del tratamiento con cápsulas de EPL (media ± desviación típica); **T** indica que la variable muestra diferencias estadísticamente significativas debidas al tratamiento (t-Student para muestras apareadas, excepto GST termoestable que se analizó por el test de Wilcoxon; p<0,05).

La actividad superóxido dismutasa aumento un 40% tras la administración del tratamiento (t-Student para muestras relacionadas, p=0,029; figura 78). Este aumento se produjo en 9 de los 11 pacientes estudiados. En los otros dos sujetos, la actividad SOD se mantuvo en uno de ellos y en el otro descendió ligeramente.

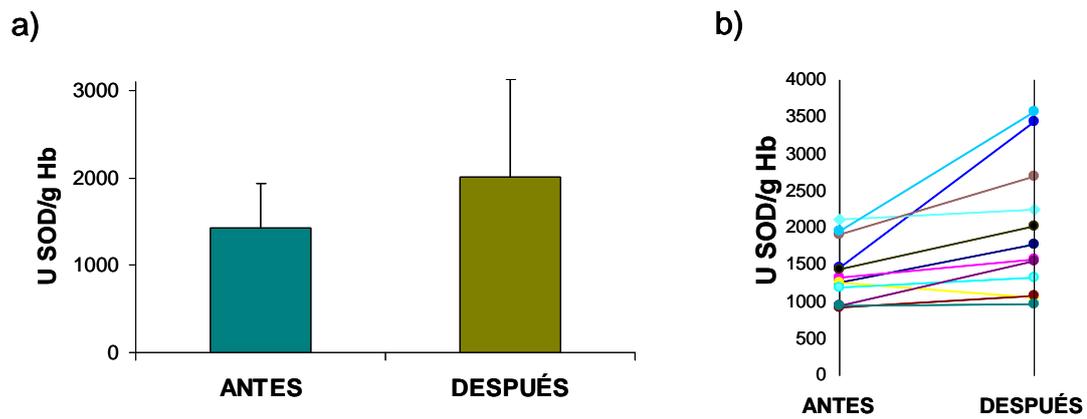


Figura 78: representación de la actividad SOD antes y después de la administración de cápsulas de EPL; a) media \pm desviación típica; b) valores de actividad SOD en cada uno de los pacientes.

El tratamiento con cápsulas de EPL indujo una significativa reducción de un 21% de la actividad catalasa (t-Student para muestras relacionadas, $p=0,012$; figura 79), siendo ésta patente en ocho pacientes. En los otros tres pacientes se mantuvo prácticamente invariable, aumentando ligeramente en dos de ellos.

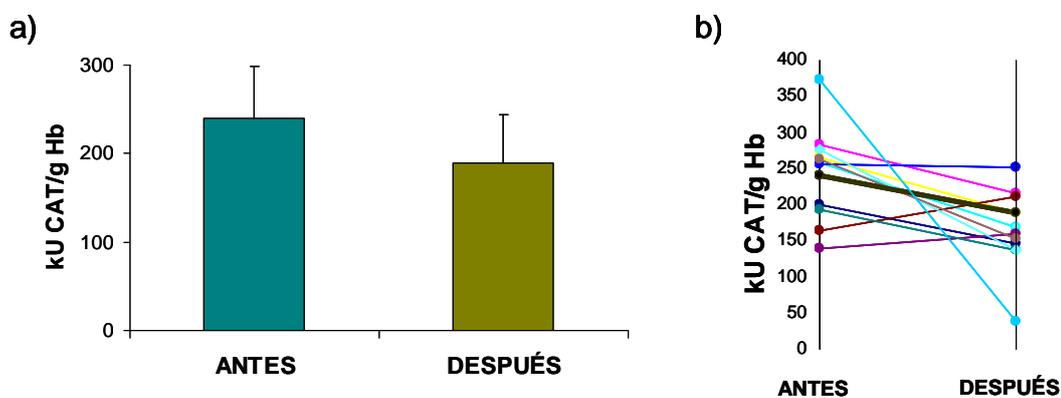


Figura 79: representación de la actividad CAT antes y después de la administración de cápsulas de EPL ; a) media \pm desviación típica; b) valores de actividad CAT en cada uno de los pacientes.

Las actividades glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa (total, termoestable y residual) no mostraron diferencias estadísticamente significativas debidas al tratamiento.

Estudio 5

Niveles de glutaciones sanguíneos

- Glutaciones eritrocitarios

	Antes	Después
GSH (μ moles GSH/g Hb)	2,62 \pm 1,10	2,96 \pm 0,87
GSSG (μ moles GSSG/g Hb)	0,71 \pm 0,27	0,76 \pm 0,28
GSH/GSSG	3,68 \pm 2,45	3,88 \pm 1,83

Tabla 37: valores de los glutaciones eritrocitarios antes y después del tratamiento con cápsulas de EPL (media \pm desviación típica); no se observaron diferencias significativas (test de Wilcoxon; $p < 0,05$).

- Glutaciones plasmáticos

	Antes	Después
GSH (nmoles GSH/ml plasma)	17,38 \pm 7,26	17,09 \pm 7,71
GSSG (nmoles GSSG/ml plasma)	18,29 \pm 5,12	18,13 \pm 6,56
GSH/GSSG	0,95 \pm 0,54	0,94 \pm 0,56

Tabla 38: valores de los glutaciones plasmáticos antes y después del tratamiento con cápsulas de EPL (media \pm desviación típica); no se observaron diferencias significativas (GST-P y GSH/GSSG-P análisis por t-Student para muestras apareadas, GSSG-P análisis por test de Wilcoxon; $p < 0,05$).

No se observaron diferencias significativas debidas a la administración de las cápsulas de EPL en los valores de los glutaciones eritrocitarios (tabla 37), ni en los plasmáticos (tabla 38).

Actividad antioxidante plasmática

	Antes	Después
FRAP (µmoles TE/ml plasma)	0,80±0,56	0,90±0,54
ORAC plasma total (µmoles TE/ml plasma)	15,80±4,43	13,61±2,22
ORAC plasma libre proteínas (µmoles TE/ml plasma libre de proteínas)	1,13±0,32	1,40±0,31

Tabla 39: valores de la actividad antioxidante del plasma antes y después del tratamiento con cápsulas de EPL (media ± desviación típica); no se observaron diferencias significativas (ambas determinaciones de ORAC analizadas por t-Student para muestras apareadas, FRAP por el test de Wilcoxon; $p < 0,05$).

La tabla 39 recoge los valores de actividad antioxidante del plasma antes y después del tratamiento con las cápsulas de EPL determinados por los métodos FRAP y ORAC. Ninguna de las tres variables en las que se midió la actividad antioxidante del plasma presentó diferencias significativas. Sin embargo, se observó una tendencia al aumento de la capacidad antioxidante del plasma libre de proteínas con el tratamiento con cápsulas de EPL; aún siendo éste de un 24%, no se alcanzó la significación estadística (t-Student para muestras relacionadas, $p = 0,065$; figura 80). Este hecho se observó en 8 de los 11 pacientes; de los otros tres, en uno de ellos se mantuvo sin variación y en los dos restantes este valor disminuyó ligeramente.

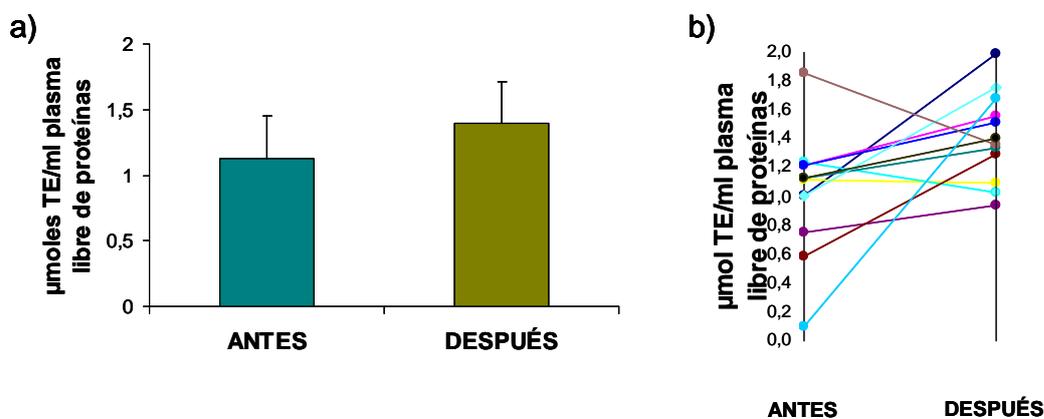


Figura 80: representación de la capacidad antioxidante del plasma libre de proteínas antes y después de la administración de cápsulas de EPL; a) media ± desviación típica; b) valores de actividad antioxidante del plasma según el método ORAC en cada uno de los pacientes.

Estudio 5

TBARS sanguíneos

La tabla 40 recoge los valores de TBARS sanguíneos antes y después del tratamiento con cápsulas de EPL.

	Antes	Después
TBARS (nmoles MDA eq/g Hb) ^T	2,15±0,70	2,77±0,89
TBARS (nmoles MDA eq/ml plasma)	1,84±0,32	1,62±0,84

Tabla 40: valores de TBARS eritrocitarios y plasmáticos antes y después del tratamiento con cápsulas de EPL (media ± desviación típica); **T** indica que las diferencias debidas tratamiento son estadísticamente significativas (t-Student para muestras apareadas; $p < 0,05$).

Se observó un aumento significativo de casi el 28% en los TBARS eritrocitarios tras el tratamiento con cápsulas de EPL (t-Student para muestras relacionadas, $p = 0,036$; figura 81). La técnica de TBARS para detectar peróxidos lipídicos, se basa en la reacción de éstos con el ácido tiobarbitúrico. Se sabe que uno de los componentes del *Polypodium leucotomos*, el ácido quínico, es capaz de reaccionar con este ácido, por lo que el aumento detectado puede ser un falso positivo debido a la presencia de alguno de estos componentes en la sangre, tras la administración del producto.

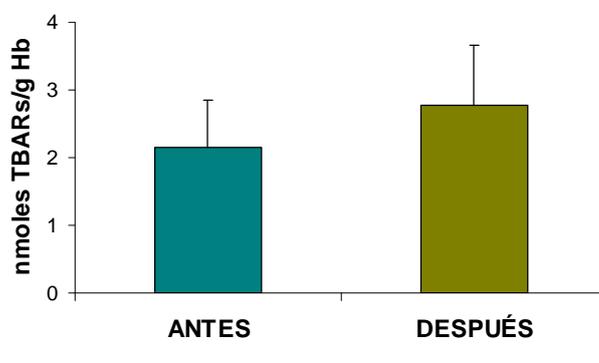


Figura 81: representación de los valores del TBARS eritrocitarios, diferencia estadísticamente significativas según la t-Student para muestras apareadas.

Resultados

Por la misma razón podía esperar que con el tratamiento con cápsulas de EPL aumentasen los TBARS plasmáticos, sin embargo se observó una reducción de los niveles, aunque ésta no fue significativa.

Estudio 5

5.2. Discusión del estudio 5

En este estudio realizado en voluntarios humanos se pretendía valorar el estado oxidativo y la capacidad antioxidante sanguínea tras la administración oral de cápsulas de EPL, producto con propiedades antioxidantes reconocidas. El efecto de dicho producto en la sangre está condicionado por la absorción intestinal de sus componentes y/o las modificaciones hepáticas que dichos componentes puedan sufrir; por lo que el aumento de la capacidad antioxidante de la sangre no está asegurado.

El hecho de que algunos parámetros sanguíneos valorados mostrasen diferencias estadísticas debidas tratamiento con cápsulas de EPL indicó que este producto además de alcanzar la circulación ejerce una acción capaz de modificar la acción de parámetros relacionados con el estado oxidativo sanguíneo. Por otra parte, el aumento de los TBARS eritrocitarios, seguramente por contaminación, avalaría la suposición de que el producto alcanza los eritrocitos. También era esperable que los niveles TBARS plasmáticos hubiesen aumentado debido a la administración del producto, pero por el contrario, se observó una disminución del nivel que no mostró significación estadística.

El tratamiento con cápsulas de EPL aumentó la actividad superóxido dismutasa por lo que suponemos que el producto potencia esta actividad. Por otra parte se observó que el tratamiento redujo la actividad catalasa pudiendo deberse este efecto a la capacidad antioxidante del propio producto, hecho que provocaría la disminución de este enzima y, por tanto, la reducción de su actividad. En cualquier caso, se ha de recordar que los eritrocitos son células anucleadas y su tasa de renovación es de 120 días. Así pues, cualquier cambio de actividad enzimática observado tras 8 días de tratamiento sería consecuencia de cambios alostéricos de los enzimas, debidos bien a la acción de algún componente del producto, o a modificaciones del estado oxidativo que dicho producto fue capaz de inducir en el ambiente circulatorio.

En este estudio, la valoración mediante los métodos FRAP y ORAC de la actividad antioxidante del plasma nativo no se vio afectada por la administración de cápsulas de EPL. Sin embargo, la determinación por el método ORAC de la capacidad antioxidante del plasma libre de proteínas mostró un aumento debido a la administración del producto en 8 de los 11 pacientes; siendo dicho incremento, de media, de un 24%. A pesar de la dimensión del incremento éste no alcanzó la significación estadística.

Resultados

En resumen, los cambios observados en las actividades SOD y CAT eritrocitarias, así como en los valores de TBARS eritrocitarios, nos muestran la capacidad del tratamiento con cápsulas de EPL de alcanzar la circulación sanguínea y ejercer cambios en el estado oxidativo de dicho tejido. El aumento de la actividad antioxidante, determinada por el método ORAC, en el plasma libre de proteína mostrado por 8 de los 11 pacientes del estudio y el alto valor del incremento, indicar el efecto del producto sobre el valor de la capacidad antioxidante, a pesar de que, como se explicó anteriormente, este parámetro no alcanzó la significación estadística.

DISCUSIÓN GLOBAL

Como hemos visto en la introducción, la eficacia de los derivados del *Polypodium leucotomos* en contrarrestar los efectos deletéreos de la RUV ha sido demostrada en estudios previos tanto en cultivos celulares (Philips y col., 2003) como modelos animales tratados por vía tópica (González y Pathak, 1996). Su acción fotoprotectora también fue valorada tras su administración por vía oral en animales (Alcaraz y col., 1999) así como en voluntarios humanos (González y col., 1997; Middelkamp-Hup y col., 2004a) en los que se observó que un extracto del *P. leucotomos* disminuía el eritema UV.

En los estudios que aquí hemos planteado, hemos valorado la acción fotoprotectora del EPL en la prevención de la tumorogénesis inducida por la RUV. También hemos tratado de establecer la posible relación de dicha actividad fotoprotectora con la capacidad antioxidante propia del EPL, así como los efectos de éste sobre los antioxidantes endógenos de la piel y otros mecanismos de respuesta de la piel frente al daño provocado por la irradiación.

1. ACTIVIDAD ANTITUMORAL

El objetivo principal de este estudio era valorar la capacidad preventiva del *P. leucotomos* en la tumorogénesis inducida por la RUV, lo que se valoró en el estudio de irradiación crónica llevado a cabo en ratones *hairless* a los que se le administró EPL disuelto en el agua de bebida de manera continuada durante todo el estudio (estudio 3). La valoración de la supervivencia se realizó mediante el test t de Student entre ambos grupos de animales irradiados que habían sido sacrificados al alcanzar alguno de sus tumores un diámetro de 4mm, este análisis concluyó que el grupo de animales irradiado que había sido sometido al tratamiento con el EPL tenía una mayor supervivencia que los animales irradiados no tratados con el extracto, siendo la diferencia de 3 semanas. Por lo tanto, el EPL administrado por vía oral tiene actividad anticancerígena frenando el daño que ejerce la RUV en la piel.

El retraso de la aparición del tumor también quedó patente en el resultado del estudio anatomopatológico de la zona periférica a la línea media dorsal, donde no se observaron tumores, pero aparecieron signos de transición a tumor. De los siete animales estudiados de cada grupo, estos signos se observaron claramente en seis de los animales irradiados y no tratados con EPL y sólo en dos de los irradiados y tratados con el extracto.

El hecho de que el tratamiento con EPL previniese de la pérdida de peso corporal inducida por la radiación demostró que dicho tratamiento mejora la calidad de vida de los animales irradiados.

Otros estudios en los que se valora su actividad antitumorogénica

La capacidad antitumoral de un extracto del rizoma de *P. leucotomos* fue descrita en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* frente a distintos tumores, entre ellos el carcinoma de células basales, atribuyéndose la acción del extracto a la actividad anabólica y no citostática (Horvath y col., 1967).

Estudios moleculares relacionaron la actividad anticancerígena del EPL con su capacidad de inhibir del factor de transcripción NF- κ B (Manna y col., 2003) y a la reducción

de la presencia de dímeros de pirimidinas en los queratinocitos en la piel de voluntarios sometidos a irradiación (Middelkamp-Hup y col., 2004b).

En cultivos de células de melanoma se observó que bajas concentraciones de ascorbato activan proteínas reguladoras de la apoptosis y proteínas del shock térmico (*heat shock proteins*, HSP), entre ellas la HSP-27, la HSP-70 y la HSP-90, que están relacionadas con la estabilización de proteínas pro-oncogénicas. Por lo que el ascorbato a bajas concentraciones promueve la apoptosis y facilita la tumorigénesis. El tratamiento simultáneo con dichas concentraciones de ascorbato y *P. leucotomos* redujo la activación de las HSP-27 y la HSP-70, aunque no consiguió reducir la activación de la HSP-90 (Philips y col., 2009b).

El factor de crecimiento transformante beta (*transforming growth factor beta*, TGF- β) es una citocina considerada de actividad supresora de tumor debido a su capacidad de evitar la proliferación de células epidérmicas, sin embargo, esto sólo ocurre en los estadios iniciales de la tumorigénesis. En estadios posteriores, alteraciones en proteínas o genes activados indirectamente por esta citocina, inhiben su actividad antiproliferativa, mientras otras de sus funciones, como la degradación de la matriz extracelular y la membrana basal, permanecen inalteradas. Por lo que se considera que en células tumorales el TGF- β actúa como un promotor tumoral estimulando la angiogénesis, la invasión, la metástasis y la inmunosupresión (Javelaud y col., 2008). En células de la piel en cultivo, el *P. leucotomos* es capaz de modular la actividad TGF- β según el tipo celular, ya que no se comporta de igual modo en todas las células, promoviendo su actividad antitumoral, como veremos más adelante cuando se hable de la integridad estructural de la piel.

Propiedades del *P. leucotomos* que contribuyen a su capacidad antitumoral

2. PROPIEDADES DEL *P. LEUCOTOMOS* QUE CONTRIBUYEN A SU CAPACIDAD ANTITUMORAL

La actividad antitumorogénica y fotoprotectora del *P. leucotomos* ha de ser consecuencia de la acción de todas sus propiedades beneficiosas. Los demás objetivos de los estudios incluidos en esta memoria tratan de dilucidar los posibles mecanismos de acción por los que el *P. leucotomos* ejerce su acción fotoprotectora. Los resultados de dichos estudios ya han sido explicados en sí. Sin embargo, la visión conjunta de estos estudios es más compleja, ya que fueron realizados en distintos modelos experimentales, a distintas energías de irradiación y con diferencias en la administración y la duración de los tratamientos con EPL. Sin embargo, su análisis permite establecer conclusiones contribuyendo al conocimiento sobre los mecanismos de acción de los derivados del *P. leucotomos*.

2.1. Propiedades antioxidantes

En la literatura se encuentran muchos ejemplos sobre productos naturales con capacidad fotoprotectora a nivel sistémico tras su administración por vía oral. Ello se debe a que contienen principios activos con propiedades antioxidantes (Pillai y col., 2005; González y col., 2008), como son los carotenoides, los polifenoles del té verde, como el epigallocatequin-8-galato, la genisteína (isoflavona de la soja) y los ácidos grasos poliinsaturados omega-3.

Las propiedades antioxidantes del *P. leucotomos* han sido demostradas *in vitro*, entre ellas destaca la capacidad de neutralizar el HO \cdot , el O $_2^{\cdot-}$ y el $^1\text{O}_2$ (Gomes y col., 2001) y la capacidad de reducir la producción de O $_2^{\cdot-}$, de peróxidos lipídicos y, en menor medida, de $^1\text{O}_2$ generados por la radiación ultravioleta (González y Pathak, 1996). La inhibición de la peroxidación lipídica y el mantenimiento de las membranas celulares por acción del *P. leucotomos* también fue demostrada en queratinocitos y fibroblastos en cultivos frente a la radiación UVA y UVB (Philips y col., 2003).

2.1.1. Capacidad antioxidante endógena de los productos usados en los estudios

Dada la reconocida capacidad antioxidante del *P. leucotomos* se ha presupuesto que dicha capacidad ha de ser responsable, al menos en parte, de la acción fotoprotectora del helecho, por lo que en un primer estudio (estudio 1) se determinó la capacidad antioxidante del EPL, quedando demostrada la capacidad antioxidante endógena del extracto de inhibir los radicales peroxilo (método ORAC) y de reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} (método FRAP).

2.1.2. Valores de los parámetros relacionados con el estado oxidativo

En los otros cuatro estudios, se determinaron parámetros relacionados con el estado oxidativo en distintos tejidos (piel o epidermis y sangre en los modelos animales y sólo sangre en los humanos voluntarios), con el fin de valorar los efectos del EPL en dichos tejidos. En los estudios con animales, se añadió otro factor de estudio, la irradiación con RUV, con lo que se pretendía valorar si el EPL modifica la respuesta del tejido a la RUV en alguno de los parámetros estudiados.

Valoración de la capacidad antioxidante de plasma y fracción soluble de piel

En el estudio realizado en ratones, tanto sometidos a tratamiento crónico con EPL e irradiación crónica (estudio 3), como en el de tratamiento de una semana e irradiación aguda (estudio 4), se observó que el tratamiento aumentó la actividad antioxidante del plasma nativo según el método ORAC. Sin embargo, en el estudio realizado en humanos (estudio 5) no se encontraron diferencias significativas en la valoración de la actividad antioxidante del plasma nativo mediante ninguno de los dos métodos de determinación empleados (ORAC y FRAP), a pesar de que en el plasma libre de proteínas se observó una clara tendencia del tratamiento con cápsulas de EPL a aumentar la actividad antioxidante determinada por el método ORAC.

Por otra parte, en el estudio de irradiación crónica (estudio 3) se redujo la actividad ORAC en la fracción soluble de piel. Esto podría deberse a una menor síntesis de los antioxidantes en la piel debida a una menor necesidad de los mismos por la acción antioxidante del EPL presente en el tejido.

Propiedades del *P. leucotomos* que contribuyen a su capacidad antitumoral

Resistencia a la hemólisis inducida por H₂O₂

En el estudio de irradiación aguda realizado en ratas (estudio 2) se observó que el tratamiento aumentó la resistencia frente a la hemólisis inducida por H₂O₂. Una tendencia similar se observó en los estudios de irradiación crónica (estudio 3). Esto es debido al efecto protector del EPL sobre las membranas celulares al prevenir la peroxidación lipídica, capacidad que ya había sido descrita tras estudios *in vitro* (Philips y col., 2003). Este hecho no se observó en el estudio realizado en humanos (estudio 5).

Actividad de enzimas implicados en la defensa antioxidante

En los cuatro estudios realizados *in vivo* se observó que el tratamiento con EPL afecta la actividad de algunos de los enzimas implicados en la defensa antioxidante tanto en eritrocitos como en piel o epidermis. Las tendencias observadas son diferentes entre los distintos estudios, lo que es debido al uso de distintos modelos y a las diferencias en la administración del EPL y en los patrones de irradiación.

El hecho de observar modificaciones debidas al tratamiento tanto en sangre como en epidermis y piel indican que el tratamiento alcanza estos tejidos y que es capaz de modificar la acción de enzimas presentes en los mismos.

En los estudios de irradiación aguda (estudios 2 y 4) y en el realizado en humanos (estudio 5) las modificaciones observadas en la actividad de algunos enzimas eritrocitarios debidas a la administración del EPL y/o la irradiación obedecen a modificaciones alostéricas de la actividad del enzima y no al aumento de la síntesis proteica, al ser los eritrocitos células anucleadas (Cervelló y col., 1994; Giralt y col., 1996). Por lo tanto, el *P. leucotomos* además de presentar actividad antioxidante *per se* es capaz de modificar la actividad del sistema antioxidante del tejido en el que se encuentre, lo que estará condicionado a la situación fisiológica de dicho tejido y a otros estímulos que pueda recibir.

En el estudio de irradiación crónica (estudio 3) se puede hablar de síntesis enzimática puesto que la tasa de renovación de los eritrocitos es de 120 días y en este estudio el tiempo que los animales estuvieron expuestos a los factores de variación fue mayor. En esta línea, destaca el hecho de que los animales irradiados presenten unos niveles de GSH ligeramente superiores a los de los animales no irradiados, cuando en esos mismos animales

la actividad GST está aumentada y las actividades GR y GPx se mantienen estables. Dicho aumento del glutatión reducido, ha de deberse a la síntesis *de novo* del tripéptido por acción del enzima γ -glutamylcistein sintetasa cuya síntesis aumentaría en respuesta al daño sufrido por la irradiación, posiblemente mediante la estimulación de la transcripción mediada por Nrf2 (Wild y col., 1999b).

En cuanto a la radiación, el hecho de que ésta modifique la actividad de enzimas presentes en la piel, junto con de otros parámetros, evidencia la necesidad de la administración de sustancias fotoprotectoras de administración oral y acción sistémica que protejan de los daños inducidos por la RUV en otros tejidos distintos de las zonas irradiadas.

La radiación puede dañar la estructura de las proteínas, principalmente mediante la inducción de daño oxidativo, conduciendo a una menor actividad enzimática. En algún caso, la presencia de EPL podría prevenir el daño oxidativo por su acción antioxidante endógena. Esto explicaría algunos resultados como el de la SOD eritrocitaria en el estudio de irradiación aguda realizado en ratones (estudio 4) en el cual el tratamiento previene del descenso de la actividad del enzima por acción de la RUV.

Relación entre las formas reducida y oxidada del glutatión

Ambas formas del glutatión se mantuvieron en los valores normales de equilibrio en la mayoría de los tejidos valorados en los distintos estudios, observándose en varios casos una tendencia del tratamiento a favorecer un estado más reducido y la capacidad de los tejidos de promover la actividad defensiva del sistema enzimático para contrarrestar el daño ejercido por la RUV.

Son de destacar los resultados del estudio realizado de irradiación aguda en ratas (estudio 2), donde el tratamiento desequilibró la relación entre las formas de glutatión hacia un estado reducido. Esto se observó en eritrocitos, en plasma libre de proteínas y en fracción soluble de epidermis.

En general los resultados observados reflejan los cambios de las actividades de los enzimas implicados en el consumo del glutatión reducido, en su regeneración y, además, en el estudio de irradiación crónica (estudio 3) también se observó la implicación de los enzimas encargados de su generación, como se comentó anteriormente.

Propiedades del *P. leucotomos* que contribuyen a su capacidad antitumoral

2.1.3. Mecanismos por los que el *P. leucotomos* refuerza la defensa antioxidante

Capacidad antioxidante endógena del EPL

Como hemos comentado anteriormente, la capacidad antioxidante del *P. leucotomos* ha sido demostrado en diversos estudios *in vitro* (González y Pathak, 1996; Gomes y col., 2001), lo que, de por sí, ya puede ser una de las vías responsables de sus actividades terapéuticas, entre ellas la capacidad fotoprotectora. En varios estudios, el efecto fotoprotector de extractos del helecho se atribuye a esta propiedad antioxidante (González y Pathak, 1996; Siscovick y col., 2008).

Por otra parte, en el estudio 1 de esta memoria se determinó la capacidad antioxidante del EPL, evitando la oxidación de la fluoresceína (método ORAC) y reduciendo el ión férrico (método FRAP).

La capacidad antioxidante del *P. leucotomos* se debe a compuestos bioactivos presentes en él, entre los que destacan los compuestos fenólicos (García y col., 2006), sustancias con capacidad antioxidante que además tienen la capacidad de modificar los perfiles de síntesis proteica celular. La tasa de absorción de los principales polifenoles del *P. leucotomos* se calculó que llegaba al 70-100% y que el tiempo para su metabolismo era de unas 24h (Gombau y col., 2006). Por lo tanto, si estos compuestos alcanzan el tejido de interés, en nuestro caso la piel, su actividad antioxidante neutralizaría y reduciría las EROs que allí se produzcan, en nuestro caso inducidas por la RUV.

Activación del sistema de defensa antioxidante de la piel

Las secuencias génicas ARE (*antioxidant response elements*), EpRE (*electrophile responsive element*) o XRE (*xenobiotic response element*) son unas secuencias reguladoras de la expresión de genes relacionados con la detoxificación celular. Se localizan río arriba de dichos genes, por lo que actúan en cis. Actúan regulando al alza la transcripción de la región codificante por lo que estas secuencias son consideradas potenciadores (*enhancers*) de la transcripción de dichos genes (Telakowski-Hopkins y col., 1988; Forman y Ruden, 2004). Para ejercer su acción es necesaria la unión del factor de transcripción Nrf2 a estas secuencias. El Nrf2 se sintetiza constitutivamente y, en ausencia de estímulo, se localiza en

el citoplasma bloqueado por el Keap-1 que, además de reprimir la entrada del factor de transcripción en el núcleo, puede promover su degradación. Ante un estímulo nocivo, se favorece la entrada de este factor de transcripción al núcleo donde, uniéndose a su secuencia diana, favorecerá la transcripción de la región codificante del gen. Uno de los principales estímulos capaces de inducir la expresión de estos genes detoxificadores es la presencia de radicales libres en la célula (You y col., 2001), que actúan facilitando la acción del factor de transcripción Nrf2.

Dado que el tipo de genes que se regulan por esa vía tienen función protectora para las células, principalmente la potenciación de esa vía ya ha sido descrita como una posible estrategia en la prevención del cáncer (Zhang y Gordon, 2004; Giudice y Montella, 2006). En cuanto al cáncer de piel, se demostró la implicación del factor Nrf2 en su prevención ya que los ratones knockout para este gen son más susceptibles a la carcinogénesis inducida por agentes químicos en la piel que los silvestres (auf dem Keller y col., 2006). En otro estudio en animales, se observó que la aplicación de un extracto de brotes de brócoli por vía tópica previno frente al cáncer de piel inducido por la radiación ultravioleta, lo cual se explica por la presencia en dicho extracto de sulforafano (Beyer y col., 2007), compuesto con una reconocida capacidad de activar del Nrf2.

Como se ha comentado, el Nrf2 se activa en respuesta a estímulos, principalmente nocivos para el tejido y, por otra parte, se ha demostrado su implicación en la prevención del cáncer de piel. Por todo esto, cabría suponer que la incidencia de la RUV en la piel indujese, como mecanismo de defensa, la activación de este factor de transcripción. Sin embargo, un estudio de irradiación de queratinocitos en cultivo demostró que estos no reaccionaban ante las radiaciones UVA y UVB, a pesar de que a las dosis de radiación aplicadas se induce un incremento de los niveles de EROs intracelulares; en cambio reaccionaban ante la administración de compuestos electrófilos (Durchdewald y col., 2007). Por otra parte, en fibroblastos dérmicos de ratón en cultivo, la radiación del rango UVA activa la translocación y el acúmulo nuclear del Nrf2; al contrario que bajo la acción de la radiación de tipo UVB, bajo la cual no se observaron cambios en la expresión ni en la localización del factor de transcripción; esto se atribuye a la capacidad de la RUV del rango A de aumentar de la generación de $^1\text{O}_2$ mediada por cromóforos, siendo esta especie reactiva la activadora del factor de transcripción (Hirota y col., 2005). La distinta reacción de los queratinocitos y los fibroblastos ante la RUV en cuanto a la estimulación de Nrf2 indica que ésta ha de depender del tipo celular.

Propiedades del *P. leucotomos* que contribuyen a su capacidad antitumoral

Si algunos estímulos nocivos para las células activan la vía del Nrf2, cabría la posibilidad de que la RUV estimulase la respuesta antioxidante por esta vía. Un estudio demostró que la capacidad de activación del Nrf2 por la RUV quedó demostrada a bajas dosis de UVB ($7,5\text{J}/\text{m}^2$) produciéndose un acúmulo de este factor de transcripción en el núcleo y la consecuente activación de la transcripción de los genes ARE; mientras que dosis altas de UVB ($20\text{J}/\text{m}^2$) provocaban la exclusión del factor de transcripción del núcleo y, por tanto, no se llevaba a cabo la inducción de la transcripción (Kannan y Jaiswal, 2006). Las dosis empleadas en nuestros estudios son mayores que las dosis del experimento anterior, por lo que la RUV empleada en nuestros experimentos no induciría la activación de este mecanismo de estimulación de la respuesta antioxidante.

Entre los estímulos inductores de la entrada de Nrf2 al núcleo están los compuestos fenólicos (Benrath y col., 1995; Nguyen y col., 2003). Aunque la composición del EPL no sea del todo conocida, la presencia de compuestos fenólicos ha sido descrita (Gombau y col., 2006) por lo que este mecanismo es una posible vía de acción del *P. leucotomos*.

2.2. Efecto regulador de la respuesta inmune

La RUV altera los procesos inmunes principalmente de la piel, como se demostró al observarse su capacidad de anular la respuesta de hipersensibilidad por contacto (Aubin, 2003). Los fallos del sistema inmune favorecen la progresión y promoción del tumor; por tanto, el restablecimiento de la respuesta inmune es una prioridad en la prevención del cáncer de piel (Norval, 2006).

La acción del *Polypodium* sobre el sistema inmune sigue dos vías. Por un lado, promueve un efecto inmunorregulador y, por otro, favorece la inmunidad humoral; pero, además, se ha demostrado que es capaz de inhibir la fotodescomposición del urocanato y preserva el número y la integridad las células de Langerhans.

Inmunomodulación y regulación de la inmunidad humoral

El *P. leucotomos* inhibe la respuesta proliferativa en monocitos inducida por mitógenos derivados de los linfocitos T (Rayward y col., 1997). Además, el *P. leucotomos* reduce la respuesta linfoblástica inducida por mitógenos, favoreciendo la activación de los

linfocitos CD8⁺ frente a los CD4⁺ (Vargas y col., 1983), entre los cuales, estimula la activación de linfocitos CD4⁺ Th2, reduciendo la actividad de los linfocitos CD4⁺ Th1. Por todo esto, se deduce que el *P. leucotomos* promueve la inmunidad humoral frente a la celular, respaldando su uso en situaciones en las que la inmunidad celular esté anómalamente aumentada, como son los procesos inflamatorios y las enfermedades autoinmunes (González y col., 2000).

La RUV, debido a su efecto inmunosupresor, inhibe la reacción de hipersensibilidad por contacto normal de la piel, reduciendo el infiltrado inflamatorio en la zona. Un estudio realizado en ratones demostró que el tratamiento con *P. leucotomos* reduce la inhibición de dicha reacción de hipersensibilidad, lo que se observó tanto cuando fue inducida a nivel local como sistémico, manteniendo los niveles de infiltrado inflamatorio en la piel (Siscovick y col., 2008).

Inhibición de la fotodescomposición del trans-urocanato

En la piel, el ácido trans-urocánico actúa de cromóforo y, al absorber la energía de la RUV se isomeriza a su forma cis, que al ser un estado excitado de la molécula, puede reaccionar con otras de su entorno transfiriéndoles la energía (Darr y Fridovich, 1994). Esta acción del cis-UCA se ha relacionado con la reducción de la eficacia de la respuesta inmune inducida por la RUV. Aunque las vías por las que actúa son desconocidas (Norval, 2006), se ha demostrado que uno de los mecanismos por los que ejerce su acción es la propagación del daño oxidativo.

La inhibición de la fotodescomposición del trans-UCA prevendría del daño derivado de su forma cis, preservando la respuesta inmune y reduciendo el daño oxidativo inducido por la RUV. Se ha descrito que el *P. leucotomos* realiza esta acción *in vitro* (Capote y col., 2006), con lo que además de reducirse el daño oxidativo derivado de la acción del isómero cis, también se reduce su efecto inmunosupresor (De Fabo y Noonan, 1983).

Mantenimiento del número y la morfología de las células de Langerhans

La incidencia de la RUV en la piel induce el aumento de especies reactivas presentes en la misma y daña el ADN de las células presentes en la misma. Las células de Langerhans

Propiedades del *P. leucotomos* que contribuyen a su capacidad antitumoral

presentes en la epidermis sufren ambos daños derivados de la acción de la RUV, conduciendo a la reducción de la eficacia de la función presentadora de antígeno y, por tanto, a fallos en la respuesta inmune (Ullrich, 2005).

El tratamiento con *P. leucotomos* mostró un efecto protector al prevenir el descenso del número de células de Langerhans inducida por la RUV (González y Pathak, 1996). En otros estudios no se observaron cambios en el número, pero sí preservación de la morfología dendrítica; evitando así su aumento de tamaño ante los efectos de la RUV (González y col., 1997; Middelkamp-Hup y col., 2004b).

Los estudios incluidos en esta memoria, en los que se contaron las células de Langerhans, corroboran la capacidad del *P. leucotomos* de preservar su número tras la irradiación tanto aguda como crónica. En el estudio de irradiación aguda realizado en ratas (estudio 2) se observó que la radiación redujo este el número de células de Langerhans, que fue claramente prevenida por la administración oral de EPL. En el estudio de irradiación crónica (estudio 3) se observó un descenso del número de células de Langerhans debido a la irradiación tanto en el estudio por factores como en la comparación entre ambos grupos no tratados, mientras que entre ambos grupos no tratados no se observó diferencia, indicando un efecto beneficioso del extracto en la prevención de la reducción del número de estas células. Además, en este estudio, se observó una tendencia a la reducción del número de células de Langerhans debido al tratamiento con EPL, lo que se explicaría por el efecto beneficioso que ejerce el extracto sobre estas células, debido a sus propiedades principalmente antioxidantes, que conduciría a una mejora de la eficacia de su función y, por lo tanto, se reduciría el número de las mismas que requiere el tejido.

2.3. Capacidad antiinflamatoria

El efecto antiinflamatorio del *P. leucotomos* es conocido por su uso tradicional y en él se basan la mayoría de las aplicaciones de los derivados de este helecho y de otros de la misma familia. Estudios sobre su mecanismo de actuación apuntan a que la actividad antiinflamatoria del *Polypodium* se deriva, entre otras propiedades, de su capacidad de inhibir el NF- κ B, de inhibir la Cox-2 y de reducir la infiltración de células proinflamatorias en el tejido.

NF- κ B

El factor de transcripción NF- κ B está implicado en procesos inflamatorios y tiene función antiapoptótica. Además, en la piel, está implicado en procesos de diferenciación, morfogénesis e hiperproliferación de la epidermis. Este factor de transcripción se activa por la RUV y está implicado en la iniciación y en la promoción de la carcinogénesis inducida por la RUV en la piel (Cooper y Bowden, 2007).

El tratamiento con *P. leucotomos* redujo la activación del NF- κ B inducida por la RUV en células HaCaT en cultivo (Janczyk y col., 2007). Por otra parte se observó que la inactivación del factor de transcripción puede ser inducida por diversos agentes, por lo que se deduce que distintos componentes del extracto actúan suprimiendo distintos pasos en la activación del NF- κ B (Manna y col., 1998) y, por tanto, de la expresión génica mediada por NF- κ B (Manna y col., 2003).

Reducción de la actividad de la ciclooxigenasa-2

Ha sido demostrado que la RUV induce un aumento de la actividad de la ciclooxigenasa-2 en la piel (Orengo y col., 2002); como consecuencia de la acción de este enzima aumentan los niveles de prostaglandinas proinflamatorias. Como ya se ha comentado en la introducción, la inflamación es una respuesta defensiva del tejido ante el daño inducido por la RUV; pero, aunque el objetivo de la reacción inflamatoria sea disminuir el daño, aumenta el efecto nocivo de la RUV principalmente por favorecer la generación de especies reactivas en la piel (Halliday, 2005). Datos preliminares de González, avanzados por el propio autor (González y col., 2008), sobre la administración de *P. leucotomos* por vía oral a ratones sometidos a RUV, demuestran la capacidad del helecho de inhibir la actividad de la Cox-2. Esto favorece la reducción de la reacción inflamatoria ante la RUV y ejercen un efecto fotoprotector en la piel.

Mastocitos

Se ha descrito que el *P. leucotomos* reduce la infiltración de mastocitos en la piel inducida por la RUV, reduciendo así la inflamación (Middelkamp-Hup y col., 2004a). En el

Propiedades del *P. leucotomos* que contribuyen a su capacidad antitumoral

estudio de irradiación crónica (estudio 4) se observó una tendencia del tratamiento a reducir la infiltración de mastocitos en la dermis superior inducida por la RUV.

Otras actividades antiinflamatorias

La RUV activa el TNF- α , incrementando la reacción inflamatoria de la piel ante la RUV. En células HaCaT se demostró que el *P. leucotomos* inhibe o reduce, según la dosis de irradiación, la activación del TNF- α inducida por la RUV. Además se demostró que esta propiedad es independiente de su efecto antioxidante (Janczyk y col., 2007).

Por otra parte, se ha descrito la capacidad del *P. leucotomos* de prevenir la vasodilatación en piel inducida por la UVR (Middelkamp-Hup y col., 2004a; Middelkamp-Hup y col., 2004b).

Además, se ha demostrado *in vitro* la capacidad de los helechos de este género de inhibir la señal inflamatoria inducida por el TNF (Punzón y col., 2003).

2.4. Mantenimiento de la integridad estructural de la piel y prevención del envejecimiento

La estructura de la piel se mantiene gracias a la membrana basal y a la matriz extracelular. La integridad de estas depende principalmente del equilibrio entre su degradación mediada por las MMPs, la protección frente a dicha degradación mediante los TIMPs, la síntesis de colágeno (Philips y col., 2009a) y el mantenimiento de la red de fibras elásticas (Uitto, 2008). La RUV rompe este equilibrio hacia un desorden de las fibras de elastina (Rabe y col., 2006) favoreciendo el envejecimiento celular y la tumorogénesis.

Mantenimiento de la matriz extracelular y la membrana basal

La regulación de la remodelación de la matriz extracelular y la membrana basal está mediada por el TGF- β . En la piel es sintetizado en queratinocitos, fibroblastos, neutrófilos y células cancerígenas (Philips y col., 2009a). Se secreta a la MEC, donde, al activarse, ejerce su acción directa al actuar sobre enzimas allí presentes, pero también actúa de un modo

paracrino, activando en las células vecinas cascadas moleculares que provocan respuestas celulares o cambios en los patrones de expresión de proteínas (Javelaud y col., 2008). En la piel, su actividad difiere entre distintos tipos celulares. En células epidérmicas, esta citocina aumenta la actividad de las MMPs e inhibe el crecimiento celular. En fibroblastos, el TGF- β la estimula la actividad de la MMP-2 y de los TIMPs, también estimula la síntesis de colágeno y elastina, inhibe la acción de la MMP-1 y no influye en la proliferación celular. La RUV inhibe la acción del TGF- β , por lo que en la piel envejecida su actividad esta disminuida.

En estudios *in vitro* (Philips y col., 2009a), el *P. leucotomos* inhibe la expresión de las siguientes MMPs: MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP9. En el mismo estudio se observó que, en fibroblastos en cultivo, el *P. leucotomos* inhibe la expresión de MMP-2 y aumenta la expresión de TIMP-1, TIMP-2 y TGF- β . La radiación UVA estimula el TGF- β mientras que la UVB la inhibe. Un extracto de *P. leucotomos* al 1% estimula el TGF- β en fibroblastos no irradiados e irradiados con UVB o UVA. En células de melanoma en cultivo (Philips y col., 2009a), el *P. leucotomos* inhibe la expresión de MMP-1, mediante la inhibición de la actividad de su promotor, lo que implica la implicación de factor de transcripción AP-1. En estas células, el *P. leucotomos* también inhibe el TGF- β y aumenta la expresión de TIMP-2.

El tratamiento de células de melanoma con bajas concentraciones de ascorbato tiene efectos antitumorogénicos como la inhibición del crecimiento celular y la estimulación de la apoptosis; pero también se activa el TGF- β , estimulando la actividad de la MMP-1 e inhibiendo la acción del TIMP-1, favoreciendo el proceso tumorogénico. Estos efectos negativos se contrarrestan al añadir *P. leucotomos* al medio (Philips y col., 2009b).

Síntesis de colágeno

Las radiaciones UVA y UVB reducen la expresión de colágeno I y II y el promotor del colágeno. La expresión del colágeno tipo V es inhibida por la radiación UVB pero no por la UVA. El *P. leucotomos* activa la expresión de colágenos tipo I, III y V, y activa el promotor de colágeno tipo I en fibroblastos no irradiados. El *P. leucotomos* activa la síntesis de colágeno tipo I y V en los fibroblastos irradiados con UVA o UVB, pero no contrarresta la inhibición de la síntesis de colágeno tipo III por ambas radiaciones (Philips y col., 2009a). En el estudio realizado en ratones sometidos a irradiación crónica, se ha observado una tendencia del EPL a elevar el grosor de la dermis, lo cual sería principalmente debido al aumento del colágeno en dicha capa de la piel. Lo cual concuerda con el aumento de la

Propiedades del *P. leucotomos* que contribuyen a su capacidad antitumoral

proteína soluble en piel y el número de vasos sanguíneos del grupo irradiado y tratado con EPL.

Mantenimiento de la red de fibras elásticas

En el mantenimiento de la estructura de la piel es necesario que la red de fibras elásticas mantenga su estructura y su función. Se había observado la capacidad del *P. leucotomos* de aumentar la expresión de elastina tanto en ausencia como en presencia de RUV en cultivos de queratinocitos y fibroblastos (Philips y col., 2003). En el estudio realizado en ratones tratados con EPL y sometidos a RUV aguda (estudio 4), se ha podido observar que el tratamiento con el extracto del helecho durante una semana refuerza la red de fibras elásticas en ambos grupos de animales irradiados. Por todo esto podemos afirmar que el EPL favorece el mantenimiento de la estructura de la piel mediante la conservación de la elasticidad de la misma, previniendo tanto del envejecimiento tanto intrínseco como del fotoenvejecimiento.

Por lo tanto la actividad protectora del *P. leucotomos* en el mantenimiento de la matriz extracelular y la membrana basal se considera debida a la regulación diferencial del TGF- β en los distintos tipos celulares, la inhibición de las HSP, la activación de la síntesis de colágeno y el refuerzo de la red de fibras elásticas.

2.5. Prevención de la apoptosis y activación de los mecanismos de reparación del ADN

La RUV activa tres factores de transcripción importantes en la determinación de la supervivencia o la apoptosis, estos son la AP-1, de actividad principalmente antiapoptótica; el NF- κ B que, además de su actividad inmunorreguladora e inmunosupresora, puede activar tanto vías antiapoptóticas como vías apoptóticas en función de otras señales celulares; y, por último, la p53, que también puede inducir la apoptosis o evitarla en función de las causas que la activen (Latonen y Laiho, 2005).

AP-1

Estos factores de transcripción activadores de la promoción y la progresión de tumores cutáneos pueden ser inducidos por la RUV (Cooper y Bowden, 2007); sin embargo, el tratamiento con *P. leucotomos* reduce su activación inducida por la RUV, lo que se observó en células HaCaT en cultivo, en las que, por acción del tratamiento, a pesar de inhibir este factor de transcripción antiapoptótico, no se observó un aumento de la apoptosis inducida por la RUV (Janczyk y col., 2007).

p53

La principal función de la p53 es actuar como factor de transcripción en situaciones de estrés celular comportándose como supresor tumoral. Se encuentran mutaciones del p53 en el 90% de los carcinomas de células escamosas y en el 50% de los carcinomas de células basales (Ichihashi y col., 2003). Ante el daño inducido por la RUV, principalmente en el ADN, la p53 se activa y, en el núcleo, activa la síntesis de proteínas de respuesta al daño (Prives y Hall, 1999). Ante daño leve, la p53 activa los mecanismos de reparación del daño, para mantener la integridad genómica de la célula asegurando su supervivencia. Si el daño es elevado o persiste, se induce la apoptosis, por la vía intrínseca (Rass y Reichrath, 2008), dando lugar en la piel a las denominadas *sunburn cells*.

En los experimentos de irradiación de ratones (estudios 3 y 4) se observó un aumento de la activación de la p53 por acción de la radiación, lo que concuerda con la bibliografía (Hall y col., 1993), indicando que las dosis de irradiación fueron suficientes para inducir la expresión de este factor de transcripción.

Llama en especial la atención el aumento de la p53 inducido por la RUV en el estudio de irradiación aguda (estudio 4), ya que sólo se aplicó una dosis, siendo la energía de la misma equivalente a una DEM. Por lo tanto, dado que la expresión de p53 se activa ante las lesiones sufridas por el ADN y que la DEM es la dosis que se maneja como indicadora de daño por RUV, nuestros resultados apoyan la necesidad de buscar un indicador del daño más sensible que la valoración del eritema. Otros autores han propuesto escalas más sensibles de detección del daño basadas en la activación del p53 (Lens y col., 2008) o en el daño oxidativo (Herrling y col., 2006).

Propiedades del *P. leucotomos* que contribuyen a su capacidad antitumoral

Por su parte, el tratamiento con EPL potenció la activación de la p53 inducida por la RUV tanto en el estudio de irradiación crónica (estudio 3) como en el de irradiación aguda (estudio 4). Esto podría deberse a que alguno de los componentes del extracto del helecho potencie la expresión de dicha proteína inducida por la radiación o que, al estar las células menos dañadas, debido al tratamiento con un extracto con propiedades antioxidantes, entre otras, respondan mejor a la activación de la p53 inducida por la RUV o estabilicen la proteína, manteniendo su actividad durante más tiempo.

El aumento de la p53 en el tejido irradiado se podría asociar bien con la inducción de apoptosis, bien con el incremento de la reparación de las lesiones que presenta el ADN. Un estudio realizado en células HaCaT en cultivo sometidos a RUV demostraron que el *P. leucotomos* reducía la tasa de apoptosis inducida por la radiación (Janczyk y col., 2007) y en muestras de voluntarios sanos sometidos a RUV se observó que el *P. leucotomos* reducía la presencia de *sunburn cells* (Middelkamp-Hup y col., 2004a). Por lo tanto, el incremento de p53 inducido por el extracto no induce una respuesta apoptótica en el tejido.

Por otra parte, la administración por vía oral de un extracto de *P. leucotomos* redujo la presencia de CPDs presentes en queratinocitos de voluntarios sanos sometidos a RUV (Middelkamp-Hup y col., 2004b). Este hecho podría explicarse por la acción antioxidante del *P. leucotomos* que redujese el daño oxidativo sufrido por el ADN, sin embargo, este tipo de lesión no es propia del daño oxidativo inducido por la RUV, por lo que esta hipótesis pierde consistencia. Otra explicación sería la activación de los sistemas de reparación del daño, siendo el sistema NER el más efectivo en la reparación de CPDs en mamíferos placentarios (Ywan Feng y col., 1993; D'Errico y col., 2007) y cuya acción es estimulada por la p53 al detectarse las lesiones inducidas por la RUV en el ADN (Brash, 2006).

Por todo lo anterior, proponemos que la potenciación ejercida por el *P. leucotomos* del incremento de p53 inducido por la RUV, favorece la actuación de los sistemas de reparación de lesiones en el ADN, principalmente del sistema NER, asegurando la supervivencia celular. Esto concuerda con la sugerencia de otros autores sobre la capacidad del *P. leucotomos* de promover la reparación del ADN (Middelkamp-Hup y col., 2004a).

3. RESUMEN

Los resultados expuestos en la presente tesis, demuestran la efectividad de la administración por vía oral de EPL en la lucha contra los efectos nocivos de la RUV. Entre dichos resultados destaca la capacidad antitumoral del extracto puesta de manifiesto al aumentar la supervivencia de los animales, ralentizando el proceso de fotocarcinogénesis, reduciendo la gravedad de los tumores y mejorando la calidad de vida de los animales tratados. Además, se demostró su capacidad de prevenir el daño agudo inducido por la RUV, de contrarrestar los signos de fotoenvejecimiento, de contribuir al mantenimiento de la inmunidad tisular al mantener el número de células de Langerhans y de estimular las repuestas de defensa tisulares frente al daño inducido por la radiación. Por todo lo anterior, estos estudios avalan la efectividad del *P. leucotomos* administrado por vía oral como fotoprotector de acción sistémica.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados expuestos y comentados anteriormente extraemos las siguientes conclusiones:

1. En ratones *hairless*, el tratamiento continuado con EPL retrasa la aparición de tumores cutáneos inducidos por la exposición crónica a dosis suberitemógenas de RUV.
2. El EPL mostró poseer capacidad antioxidante según los métodos ORAC y FRAP, corroborando otros estudios que demostraron la capacidad antirradicalar del helecho usando otros diseños *in vitro*.
3. El tratamiento continuado con EPL aumenta la capacidad antioxidante del plasma, pero reduce dicha capacidad en la fracción soluble de piel. Esto último expresaría una menor necesidad de antioxidantes endógenos ante la presencia de los compuestos bioactivos del EPL en el tejido.
4. En los cuatro estudios realizados *in vivo* se observó que el tratamiento con EPL modifica la actividad de enzimas implicados en la defensa antioxidante y los niveles de ambas formas del glutatión, favoreciendo la forma reducida. La capacidad antioxidante endógena y la potenciación de diversos sistemas de defensa antirradicalar contribuyen a la acción antitumorogénica del *P. leucotomos*.
5. La administración continuada de EPL activa las respuestas defensivas de la epidermis frente al daño inducido por la RUV y reduce la hiperproliferación celular de células tumorales y la apoptosis masiva.

Conclusiones

6. El tratamiento con EPL aumenta el grosor de la dermis, probablemente activando la síntesis de colágeno y regulando la actividad de enzimas implicados en la síntesis y degradación de la matriz extracelular. Además, el tratamiento con EPL refuerza el entramado de fibras elásticas. Al mantener la integridad de la dermis, el EPL previene el envejecimiento cutáneo, principalmente el debido a la RUV.

7. La irradiación crónica con dosis suberitemógenas de UV o con una única dosis de energía equivalente a una DEM activan la expresión de la p53, el tratamiento con EPL potencia en ambos casos dicha expresión. Este hecho, junto a datos encontrados en la literatura que demuestran la capacidad del EPL de prevenir la apoptosis, indican que otra de las vías de actuación del *P. leucotomos* frente al daño inducido por la RUV es la activación de los sistemas de reparación del ADN mediada por la p53, con lo cual se asegura la supervivencia de células no transformadas, previniendo de la apoptosis masiva y/o indiscriminada y de la formación de tumor.

8. La RUV induce una reducción del número de células de Langerhans presentes en la epidermis. El tratamiento con EPL previene la reducción del número de estas células debida a la irradiación aguda. En cambio, el tratamiento a largo plazo con EPL (irradiación crónica), reduce el número de estas células, independientemente de la RUV. Esto se interpreta como una respuesta a los menores requerimientos de células de Langerhans ante la presencia continuada del EPL. Además, en este mismo estudio, los animales irradiados y tratados con EPL presentaron una tendencia a una menor infiltración de mastocitos en la dermis debida a la irradiación. Estos hechos indican que la regulación de la inmunidad y la actividad antiinflamatoria podrían contribuir al mecanismo de acción del *P. leucotomos*.

9. Dosis de RUV inferiores a una DEM son capaces de producir daños importantes en la piel. Esto reitera la necesidad de reconsiderar los actuales métodos de evaluación de los fotoprotectores, implantando nuevos protocolos basados en parámetros más racionales que la simple valoración del eritema.

BIBLIOGRAFÍA

- Afaq, F., V. M. Adhami and H. Mukhtar (2005). *Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis*. Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 571(1-2 SPEC. ISS.): 153-173.
- Alcaraz, M. V., M. A. Pathak, F. Rius, N. Kollias and S. González (1999). *An extract of Polypodium leucotomos appears to minimize certain photoaging changes in a hairless albino mouse animal model: A pilot study*. Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine 15(3-4): 120-126.
- Alonso-Lebrero, J. L., C. Domínguez-Jiménez, R. Tejedor, A. Brieva and J. P. Pivel (2003). *Photoprotective properties of a hydrophilic extract of the fern Polypodium leucotomos on human skin cells*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 70(1): 31-37.
- Athar, M., K. P. An, K. D. Morel, A. L. Kim, M. Aszterbaum, J. Longley, Epstein E.H, Jr. and D. R. Bickers (2001). *Ultraviolet B (UVB)-induced COX-2 expression in murine skin: An immunohistochemical study*. Biochemical and Biophysical Research Communications 280(4): 1042-1047.
- Aubin, F. (2003). *Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression*. European Journal of Dermatology 13(6): 515-23.
- auf dem Keller, U., M. Huber, T. A. Beyer, A. Kumin, C. Siemes, S. Braun, P. Bugnon, V. Mitropoulos, D. A. Johnson, J. A. Johnson, D. Hohl and S. Werner (2006). *Nrf transcription factors in keratinocytes are essential for skin tumor prevention but not for wound healing*. Molecular and Cellular Biology 26(10): 3773-84.
- Autier, P., M. Boniol and J. F. Dore (2007). *Sunscreen use and increased duration of intentional sun exposure: still a burning issue*. International Journal of Cancer 121(1): 1-5.
- Bagniewska-Zadworna, A., E. Zenkteler, P. Karolewski and M. Zadworny (2008). *Phenolic compound localisation in Polypodium vulgare L. rhizomes after mannitol-induced dehydration and controlled desiccation*. Plant Cell Reports 27(7): 1251-9.
- Benrath, J., C. Eschenfelder, M. Zimmermann and F. Gillardon (1995). *Calcitonin gene-related peptide, substance P and nitric oxide are involved in cutaneous inflammation following ultraviolet irradiation*. European Journal of Pharmacology - Environmental Toxicology and Pharmacology Section 293(1): 87-96.

Bibliografía

- Benzie, I. F. and J. J. Strain (1996). *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay*. *Analytical Biochemistry* 239(1): 70-6.
- Besaratinia, A., T. W. Synold, B. Xi and G. P. Pfeifer (2004). *G-to-T transversions and small tandem base deletions are the hallmark of mutations induced by ultraviolet A radiation in mammalian cells*. *Biochemistry* 43(25): 8169-8177.
- Beyer, T. A., U. Auf dem Keller, S. Braun, M. Schafer and S. Werner (2007). *Roles and mechanisms of action of the Nrf2 transcription factor in skin morphogenesis, wound repair and skin cancer*. *Cell Death and Differentiation* 14(7): 1250-4.
- Bickers, D. R. and M. Athar (2006). *Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease*. *Journal of Investigative Dermatology* 126(12): 2565-75.
- Boticario, C. and M. Cascales (1995). *Crecimiento celular y cáncer*. Madrid: Universidad Nacional de Educación a Distancia.
- Bradford, M. M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding*. *Analytical Biochemistry* 72(1-2): 248-254.
- Brash, D. E. (2006). *Roles of the transcription factor p53 in keratinocyte carcinomas*. *British Journal of Dermatology* 154 Suppl 1: 8-10.
- Brenner, M. and V. J. Hearing (2008). *The protective role of melanin against UV damage in human skin*. *Photochemistry and Photobiology* 84(3): 539-49.
- Bruls, W. A., H. Slaper, J. C. van der Leun and L. Berrens (1984). *Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths*. *Photochemistry and Photobiology* 40(4): 485-94.
- Buege, J. A. and S. D. Aust (1978). *Microsomal lipid peroxidation*. *Methods in Enzymology* 52: 302-310.
- Cao, G., H. M. Alessio and R. G. Cutler (1993). *Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants*. *Free Radical Biology and Medicine* 14(3): 303-311.
- Capella Pérez, M. C. and A. Castells Rodellas (1981). *Double-blind study using "anapsos" 120 mg. in the treatment of psoriasis [Estudio a doble ciego con "anapsos" 120 mg en el tratamiento del psoriasis.]*. *Actas Dermo-Sifiliograficas* 72(9-10): 487-494.

- Capote, R., J. L. Alonso-Lebrero, F. García, A. Brieva, J. P. Pivel and S. González (2006). *Polypodium leucotomos extract inhibits trans-urocanic acid photoisomerization and photodecomposition*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 82(3): 173-179.
- Carell, T., L. T. Burgdorf, L. M. Kundu and M. Cichon (2001). *The mechanism of action of DNA photolyases*. Current Opinion in Chemical Biology 5(5): 491-498.
- Cervelló, I., M. Giralt, M. R. Nogues, F. Ortin, A. M. Puerto and J. Mallol (1994). *Modifications of glutathione S-transferase (GST) activity in the last period of pregnancy in rats treated with benzo(a)pyrene (BP)*. Placenta 15(4): 431-40.
- Claerhout, S., A. Van Laethem, P. Agostinis and M. Garmyn (2006). *Pathways involved in sunburn cell formation: deregulation in skin cancer*. Photochemistry and Photobiology Science 5(2): 199-207.
- Clydesdale, G. J., G. W. Dandie and H. K. Muller (2001). *Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects*. Immunology and Cell Biology 79(6): 547-568.
- Cohen, G., D. Dembiec and J. Marcus (1970). *Measurement of catalase activity in tissue extracts*. Analytical Biochemistry 34: 30-38.
- Cooper, K. D., N. Duraiswamy, C. Hammerberg, E. Allen, C. Kimbrough-Green, W. Dillon and D. Thomas (1993). *Neutrophils, differentiated macrophages, and monocyte/macrophage antigen presenting cells infiltrate murine epidermis after UV injury*. Journal of Investigative Dermatology 101(2): 155-163.
- Cooper, S. J. and G. T. Bowden (2007). *Ultraviolet B regulation of transcription factor families: roles of nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) and activator protein-1 (AP-1) in UVB-induced skin carcinogenesis*. Current Cancer Drug Targets 7(4): 325-34.
- Costin, G. E. and V. J. Hearing (2007). *Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress*. Faseb Journal 21(4): 976-94.
- Chang, H. R., D. A. Tsao, S. R. Wang and H. S. Yu (2003). *Expression of nitric oxide synthases in keratinocytes after UVB irradiation*. Archives of Dermatological Research 295(7): 293-296.
- Chaudière, J. and R. Ferrari-Iliou (1999). *Intracellular antioxidants: From chemical to biochemical mechanisms*. Food and Chemical Toxicology 37(9-10): 949-962.

Bibliografía

- Chow, J. and V. A. Tron (2005). *Molecular aspects of ultraviolet radiation-induced apoptosis in the skin*. Journal of Cutaneous Medicine and Surgery 9(6): 289-95.
- D'Errico, M., T. Lemma, A. Calcagnile, L. Proietti De Santis and E. Dogliotti (2007). *Cell type and DNA damage specific response of human skin cells to environmental agents*. Mutation Research 614(1-2): 37-47.
- Dandie, G. W., G. J. Clydesdale, I. Jacobs and H. K. Muller (1998). *Effects of UV on the migration and function of epidermal antigen presenting cells*. Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 422(1): 147-154.
- Darr, D. and I. Fridovich (1994). *Free radicals in cutaneous biology*. Journal of Investigative Dermatology 102(5): 671-675.
- Daya-Grosjean, L. (2008). *Xeroderma pigmentosum and skin cancer*. Advances in Experimental Medicine and Biology 637: 19-27.
- De Fabo, E. C. (2006). *Initial studies on an in vivo action spectrum for melanoma induction*. Progress in Biophysics and Molecular Biology 92(1): 97-104.
- De Fabo, F. C. and F. P. Noonan (1983). *Mechanism of immune suppression by ultraviolet irradiation in vivo. I. Evidence for the existence of a unique photoreceptor in skin and its role in photoimmunology*. Journal of Experimental Medicine 158(1): 84-98.
- de Gruijl, F. R. (1999). *Skin cancer and solar UV radiation*. European Journal of Cancer 35(14): 2003-9.
- de Gruijl, F. R. and P. D. Forbes (1995). *UV-induced skin cancer in a hairless mouse model*. Bioessays 17(7): 651-60.
- Dedon, P. C. and S. R. Tannenbaum (2004). *Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation*. Archives of Biochemistry and Biophysics 423(1): 12-22.
- Del Pino Gamboa, J., F. De Sambricio Guiu and C. Colomo Gomez (1982). *Comparison of Polypodium leucotomos extract with placebo in 37 cases of psoriasis [estudio comparativo entre anapsos 120 mg yun placebo en 37 enfermos de psoriasis]*. Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana 10(3): 203-208.
- Diffey, B. L. (2002). *Sources and measurement of ultraviolet radiation*. Methods 28(1): 4-13.
- Donawho, C. K., H. K. Muller, C. D. Bucana and M. L. Kripke (1996). *Enhanced growth of murine melanoma in ultraviolet-irradiated skin is associated with local inhibition of immune effector mechanisms*. Journal of Immunology 157(2): 781-6.

- Drabkin, D. and J. Austin (1935). *Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin*. The Journal of Biological Chemistry. 112: 51.
- Durchdewald, M., T. A. Beyer, D. A. Johnson, J. A. Johnson, S. Werner and U. auf dem Keller (2007). *Electrophilic chemicals but not UV irradiation or reactive oxygen species activate Nrf2 in keratinocytes in vitro and in vivo*. Journal of Investigative Dermatology 127(3): 646-53.
- Eisenbarth, H., R. Rukwied, M. Petersen and M. Schmelz (2004). *Sensitization to bradykinin B1 and B2 receptor activation in UV-B irradiated human skin*. Pain 110(1-2): 197-204.
- Elsner, P., E. Holzle, T. Diepgen, S. Grether-Beck, H. Honigsmann, J. Krutmann, K. Scharffetter-Kochanek, T. Schwarz and T. Luger (2007). *Recommendation: daily sun protection in the prevention of chronic UV-induced skin damage*. Journal of the German Society of Dermatology 5(2): 166-73.
- English, D. R., B. K. Armstrong, A. Kricger and C. Fleming (1997). *Sunlight and cancer*. Cancer Causes Control 8(3): 271-83.
- Farrell, P. M., J. G. Bieri and J. F. Fratantoni (1977). *The occurrence and effects of human vitamin E deficiency. A study in patients with cystic fibrosis*. Journal of Clinical Investigation 60(1): 233-241.
- Fitzpatrick, T. B. (1988). *The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI*. Archives of Dermatology 124(6): 869-871.
- Font i Quer, P. (2000). *Plantas medicinales. El Dioscórides renovado*. Madrid: Peninsula Ediciones.
- Forman, H. J. and D. Ruden (2004). *Introduction to serial reviews on EpRE and its signaling pathway*. Free Radical Biology and Medicine 36(10): 1197-1198.
- Fraser, D. R. (1995). *Vitamin D*. Lancet 345(8942): 104-107.
- Gallagher, R. P. and T. K. Lee (2006). *Adverse effects of ultraviolet radiation: a brief review*. Progress in Biophysics and Molecular Biology 92(1): 119-31.
- García, F., J. P. Pivel, A. Guerrero, A. Brieva, M. P. Martínez-Alcázar, M. Caamaño-Somoza and S. González (2006). *Phenolic components and antioxidant activity of Fernblock®, an aqueous extract of the aerial parts of the fern Polypodium leucotomos*. Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 28(3): 157-160.

Bibliografía

- Gibbs, N. K., J. Tye and M. Norval (2008). *Recent advances in urocanic acid photochemistry, photobiology and photoimmunology*. Photochemican and Photobiology Sciences 7(6): 655-67.
- Gilchrest, B. A. (2008). *The a-B-C-ds of sensible sun protection*. Skin Therapy Lett 13(5): 1-5.
- Giralt, M., I. Cervello, M. R. Nogues, A. M. Puerto, F. Ortin, N. Argany and J. Mallol (1996). *Glutathione, glutathione S-transferase and reactive oxygen species of human scalp sebaceous glands in male pattern baldness*. Journal of Investigative Dermatology 107(2): 154-8.
- Giudice, A. and M. Montella (2006). *Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway: A promising strategy in cancer prevention*. BioEssays 28(2): 169-181.
- Gniadecki, R., T. Thorn, J. Vicanova, A. Petersen and H. C. Wulf (2000). *Role of mitochondria in ultraviolet-induced oxidative stress*. Journal of Cellular Biochemistry 80(2): 216-222.
- Gombau, L., F. García, A. Lahoz, M. Fabre, P. Roda-Navarro, P. Majano, J. L. Alonso-Lebrero, J. P. Pivel, J. V. Castell, M. J. Gómez-Lechon and S. González (2006). *Polypodium leucotomos extract: Antioxidant activity and disposition*. Toxicology in Vitro 20(4): 464-471.
- Gomes, A. J., C. N. Lunardi, S. Gonzales and A. C. Tedesco (2001). *The antioxidant action of Polypodium leucotomos extract and kojic acid: Reactions with reactive oxygen species*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 34(11): 1487-1494.
- González, S., M. V. Alcaraz, J. Cuevas, M. Perez, P. Jaen, M. Alvarez-Mon and V. G. Villarrubia (2000). *An extract of the fern Polypodium leucotomos (Difur®) modulates Th1/Th2 cytokines balance in vitro and appears to exhibit anti-angiogenic activities in vivo: Pathogenic relationships and therapeutic implications*. Anticancer Research 20(3 A): 1567-1575.
- González, S., J. L. Alonso-Lebrero, R. Del Rio and P. Jaen (2007). *Polypodium leucotomos extract: a nutraceutical with photoprotective properties*. Drugs Today (Barc) 43(7): 475-85.
- González, S., M. Fernandez-Lorente and Y. Gilaberte-Calzada (2008). *The latest on skin photoprotection*. Clinical Dermatology 26(6): 614-26.

- González, S. and M. A. Pathak (1996). *Inhibition of ultraviolet-induced formation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, erythema and skin photosensitization by Polypodium leucotomos*. Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine 12(2): 45-56.
- González, S., M. A. Pathak, J. Cuevas, V. G. Villarrubia and T. B. Fitzpatrick (1997). *Topical or oral administration with an extract of Polypodium leucotomos prevents acute sunburn and psoralen-induced phototoxic reactions as well as depletion of Langerhans cells in human skin*. Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine 13(1-2): 50-60.
- Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby (1974). *Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation*. Journal of Biological Chemistry 249(22): 7130-7139.
- Hall, P. A., P. H. McKee, H. D. Menage, R. Dover and D. P. Lane (1993). *High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin*. Oncogene 8(1): 203-7.
- Halliday, G. M. (2005). *Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis*. Mutation Research 571(1-2): 107-20.
- Halliday, G. M. and J. G. Lyons (2008). *Inflammatory doses of UV may not be necessary for skin carcinogenesis*. Photochemical and Photobiology 84(2): 272-83.
- Halliwell, B., R. Aeschbach, J. Loliger and O. I. Aruoma (1995). *The characterization of antioxidants*. Food and Chemical Toxicology 33(7): 601-17.
- Hansson, J. (2008). *Familial melanoma*. The Surgical clinics of North America 88(4): 897-916, viii.
- Haralampus-Grynaviski, N., C. Ransom, T. Ye, M. Rözanowska, M. Wrona, T. Sarna and J. D. Simon (2002). *Photogeneration and quenching of reactive oxygen species by urocanic acid*. Journal of the American Chemical Society 124(13): 3461-3468.
- Herrling, T., K. Jung and J. Fuchs (2006). *Measurements of UV-generated free radicals/reactive oxygen species (ROS) in skin*. Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 63(4): 840-845.
- Hill, L. L., A. Ouhtit, S. M. Loughlin, M. L. Kripke, H. N. Ananthaswamy and L. B. Owen-Schaub (1999). *Fas ligand: a sensor for DNA damage critical in skin cancer etiology*. Science 285(5429): 898-900.

Bibliografía

- Hiramoto, K., N. Yanagihara, E. F. Sato and M. Inoue (2003). *Ultraviolet B irradiation of the eye activates a nitric oxide-dependent hypothalamopituitary proopiomelanocortin pathway and modulates functions of α -melanocyte-stimulating hormone-responsive cells*. Journal of Investigative Dermatology 120(1): 123-127.
- Hirota, A., Y. Kawachi, K. Itoh, Y. Nakamura, X. Xu, T. Banno, T. Takahashi, M. Yamamoto and F. Otsuka (2005). *Ultraviolet A irradiation induces NF-E2-related factor 2 activation in dermal fibroblasts: protective role in UVA-induced apoptosis*. Journal of Investigative Dermatology 124(4): 825-32.
- Hissin, P. J. and R. Hilf (1976). *A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues*. Analytical Biochemistry 74(1): 214-226.
- Horvath, A., F. Alvarado, J. Szöcs, Z. N. de Alvarado and G. Padilla (1967). *Metabolic effects of calagualine, an antitumoral saponine of Polypodium leucotomos*. Nature 214(94): 1256-1258.
- Huang, D., B. Ou and R. L. Prior (2005). *The chemistry behind antioxidant capacity assays*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(6): 1841-56.
- Hug, D. H., J. K. Hunter and D. D. Dunkerson (1998). *The potential role for urocanic acid and sunlight in the immune suppression associated with protein malnutrition*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 44(2): 117-123.
- Hussein, M. R. (2005). *Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms*. Journal of Cutaneous Pathology 32(3): 191-205.
- Ichihashi, M., M. Ueda, A. Budiyanto, T. Bito, M. Oka, M. Fukunaga, K. Tsuru and T. Horikawa (2003). *UV-induced skin damage*. Toxicology 189(1-2): 21-39.
- Ikehata, H., T. Masuda, H. Sakata and T. Ono (2003). *Analysis of mutation spectra in UVB-exposed mouse skin epidermis and dermis: Frequent occurrence of C-T transition at methylated CpG-associated dipyrimidine sites*. Environmental and Molecular Mutagenesis 41(4): 280-292.
- Ismail, F., L. Mitchell, D. Casabonne, A. Gulati, R. Newton, C. M. Proby and C. A. Harwood (2006). *Specialist dermatology clinics for organ transplant recipients significantly improve compliance with photoprotection and levels of skin cancer awareness*. British Journal of Dermatology 155(5): 916-25.
- Janczyk, A., M. A. Garcia-Lopez, P. Fernandez-Penas, J. L. Alonso-Lebrero, I. Benedicto, M. Lopez-Cabrera and S. Gonzalez (2007). *A Polypodium leucotomos extract inhibits*

- solar-simulated radiation-induced TNF-alpha and iNOS expression, transcriptional activation and apoptosis*. *Experimental Dermatology* 16(10): 823-9.
- Javelaud, D., V. I. Alexaki and A. Mauviel (2008). *Transforming growth factor-beta in cutaneous melanoma*. *Pigment Cell Melanoma Res* 21(2): 123-32.
- Jenkins, G. (2002). *Molecular mechanisms of skin ageing*. *Mechanisms of Ageing and Development* 123(7): 801-810.
- Jimenez, D., E. Doblare and R. Naranjo (1986). *Anapsos modifies immunological parameters and improves the clinical course in atopic dermatitis*. *Dermatologica* 173(3): 154-155.
- Jimenez, D., R. Naranjo, E. Doblare, C. Munoz and J. F. Vargas (1987). *Anapsos, an antipsoriatic drug, in atopic dermatitis*. *Allergologia et Immunopathologia* 15(4): 185-189.
- Kannan, S. and A. K. Jaiswal (2006). *Low and high dose UVB regulation of transcription factor NF-E2-related factor 2*. *Cancer Research* 66(17): 8421-9.
- Kanno, S. I., S. Iwai, M. Takao and A. Yasui (1999). *Repair of apurinic/aprimidinic sites by UV damage endonuclease; a repair protein for UV and oxidative damage*. *Nucleic Acids Research* 27(15): 3096-3103.
- Kato Jr, T., T. Todo, H. Ayaki, K. Ishizaki, T. Morita, S. Mitra and M. Ikenaga (1994). *Cloning of a marsupial DNA photolyase gene and the lack of related nucleotide sequences in placental mammals*. *Nucleic Acids Research* 22(20): 4119-4124.
- Kemp, C. J. (2005). *Multistep skin cancer in mice as a model to study the evolution of cancer cells*. *Semin Cancer Biol* 15(6): 460-73.
- Klaunig, J. E. and L. M. Kamendulis (2004). *The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 44: 239-267.
- Kohen, R. and I. Gati (2000). *Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress*. *Toxicology* 148(2-3): 149-157.
- Kripke, M. L. (1977). *Ultraviolet radiation and tumor immunity*. *Journal of the Reticuloendothelial Society* 22(3): 217-22.
- Kulms, D. and T. Schwarz (2002). *Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis*. *Biochemical Pharmacology* 64(5-6): 837-841.
- Kunisada, M., K. Sakumi, Y. Tominaga, A. Budiyanto, M. Ueda, M. Ichihashi, Y. Nakabeppu and C. Nishigori (2005). *8-Oxoguanine formation induced by chronic UVB exposure*

Bibliografía

- makes Ogg1 knockout mice susceptible to skin carcinogenesis. Cancer Research* 65(14): 6006-10.
- Kvam, E. and R. M. Tyrrell (1997). *Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. Carcinogenesis* 18(12): 2379-2384.
- Latonen, L. and M. Laiho (2005). *Cellular UV damage responses--functions of tumor suppressor p53. Biochimica et Biophysica Acta* 1755(2): 71-89.
- Lavker, R. M., G. F. Gerberick, D. Veres, C. J. Irwin and K. H. Kaidbey (1995). *Cumulative effects from repeated exposures to suberythemal doses of UVB and UVA in human skin. Journal of the American Academy of Dermatology* 32(1): 53-62.
- Lee, J. H., H. T. An, J. H. Chung, K. H. Kim, H. C. Eun and K. H. Cho (2002). *Acute effects of UVB radiation on the proliferation and differentiation of keratinocytes. Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine* 18(5): 253-61.
- Lee, S. C., J. W. Lee, J. E. Jung, H. W. Lee, S. D. Chun, I. K. Kang, Y. H. Won and Y. P. Kim (2000). *Protective role of nitric oxide-mediated inflammatory response against lipid peroxidation in ultraviolet B-irradiated skin. British Journal of Dermatology* 142(4): 653-659.
- Lens, M., S. Bielfeldt, V. Bataille and K. P. Wilhelm (2008). *p53 labeling index in assessing the efficacy of a sunscreen in protection against UV-induced damage. International Journal of Dermatology* 47(12): 1234-9.
- Leyden, J. (2001). *What is photoaged skin? European Journal of Dermatology* 11(2): 165-167.
- Lo, H. L., S. Nakajima, L. Ma, B. Walter, A. Yasui, D. Ethell and L. B. Owen (2005). *Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest. BMC Cancer* 5.
- Lloyd, R. S. (1998). *Base excision repair of cyclobutane pyrimidine dimers. Mutation Research - DNA Repair* 408(3): 159-170.
- Mackenzie, I. C. and C. A. Squier (1975). *Cytochemical identification of ATPase-positive langerhans cells in EDTA-separated sheets of mouse epidermis. The British Journal Of Dermatology* 92(5): 523-533.
- Macve, J. C., R. C. McKenzie and M. Norval (2004). *Exposure to multiple doses of UVB radiation reduces the numbers of epidermal Langerhans cells and lymph node dendritic cells in mice. Photochemical and Photobiological Sciences* 3(1): 91-95.

- Mallol, J., M. Giralt and M. R. Nogués (2004). *Ultraviolet radiation and oxidative stress in hairless rats. Photoprotective effect of a Polypodium leucotomos extract. Providence, RI: SID (Society of Investigative Dermatology). Journal of Investigative Dermatology* A141.
- Manna, S. K., C. Bueso-Ramos, F. Alvarado and B. B. Aggarwal (2003). *Calagualine inhibits nuclear transcription factors- κ B activated by various inflammatory and tumor promoting agents. Cancer Letters* 190(2): 171-182.
- Manna, S. K., H. J. Zhang, T. Yan, L. W. Oberley and B. B. Aggarwal (1998). *Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. The Journal of Biological Chemistry* 273(21): 13245-54.
- Marnett, L. J. (2000). *Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis* 21(3): 361-370.
- Matsumura, Y. and H. N. Ananthaswamy (2004). *Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. Toxicology and Applied Pharmacology* 195(3): 298-308.
- Meunier, L., Z. Bata-Csorgo and K. D. Cooper (1995). *In human dermis, ultraviolet radiation induces expansion of a CD36+ CD11b+ CD1- macrophage subset by infiltration and proliferation; CD1+ Langerhans-like dendritic antigen-presenting cells are concomitantly depleted. Journal of Investigative Dermatology* 105(6): 782-8.
- Meves, A., S. N. Stock, A. Beyerle, M. R. Pittelkow and D. Peus (2001). *H(2)O(2) mediates oxidative stress-induced epidermal growth factor receptor phosphorylation. Toxicology Letters* 122(3): 205-14.
- Middelkamp-Hup, M. A., M. A. Pathak, C. Parrado, T. Garcia-Caballero, F. Rius-Díaz, T. B. Fitzpatrick and S. González (2004a). *Orally administered Polypodium leucotomos extract decreases psoralen-UVA-induced phototoxicity, pigmentation, and damage of human skin. Journal of the American Academy of Dermatology* 50(1): 41-49.
- Middelkamp-Hup, M. A., M. A. Pathak, C. Parrado, D. Goukassian, F. Rius-Díaz, M. C. Mihm, T. B. Fitzpatrick and S. González (2004b). *Oral Polypodium leucotomos extract decreases ultraviolet-induced damage of human skin. Journal of the American Academy of Dermatology* 51(6): 910-918.
- Misra, H. P. and I. Fridovich (1972). *The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. Journal of Biological Chemistry.* 247: 3170-3175.

Bibliografía

- Mohammad, A. (1989). *Vitiligo repigmentation with Anapsos (Polypodium leucotomos)*. International Journal of Dermatology 28(7): 479.
- Moinova, H. R. and R. T. Mulcahy (1999). *Up-regulation of the human γ -glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene involves binding of Nrf-2 to an electrophile responsive element*. Biochemical and Biophysical Research Communications 261(3): 661-668.
- Morales-Molina, J. A., Grau, S., Jiménez-Martín, J., Mateu-De Antonio, J., Espona, M., berges-Fraile, M.J., Zarzuelo, A., Salas, E. (2006). *Quemaduras solares: fotoprotección y tratamiento (sun burn: photoprotection and treatment)*. Ars Pharmaceutica 47(2): 119-135.
- Mulero, M., M. Romeu, M. Giralt, J. Folch, M. R. Nogues, A. Fortuno, F. X. Sureda, V. Linares, M. Cabre, J. L. Paternain and J. Mallol (2006). *Oxidative stress-related markers and langerhans cells in a hairless rat model exposed to UV radiation*. Journal of Toxicology and Environmental Health A 69(14): 1371-85.
- Murphy, G. M., P. G. Norris, A. R. Young, M. F. Corbett and J. L. M. Hawk (1993). *Low-dose ultraviolet-B irradiation depletes human epidermal Langerhans cells*. British Journal of Dermatology 129(6): 674-677.
- Nakabeppu, Y., K. Sakumi, K. Sakamoto, D. Tsuchimoto, T. Tsuzuki and Y. Nakatsu (2006). *Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids*. The Journal of Biological Chemistry 387(4): 373-9.
- Nguyen, T., P. J. Sherratt and C. B. Pickett (2003). *Regulatory Mechanisms Controlling Gene Expression Mediated by the Antioxidant Response Element*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 43: 233-260.
- Norval, M. (2001). *Effects of solar radiation on the human immune system*. Journal of Photochemistry and Photobiology B 63(1-3): 28-40.
- Norval, M. (2006). *The mechanisms and consequences of ultraviolet-induced immunosuppression*. Progress in Biophysics and Molecular Biology 92(1): 108-18.
- Oikawa, S., S. Tada-Oikawa and S. Kawanishi (2001). *Site-specific DNA damage at the GGG sequence by UVA involves acceleration of telomere shortening*. Biochemistry 40(15): 4763-4768.
- Orengo, I. F., J. Gerguis, R. Phillips, A. Guevara, A. T. Lewis and H. S. Black (2002). *Celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor as a potential chemopreventive to UV-induced*

- skin cancer: A study in the hairless mouse model*. Archives of Dermatology 138(6): 751-755.
- Ou, B., M. Hampsch-Woodill and R. L. Prior (2001). *Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(10): 4619-4626.
- Ou, B., D. Huang, M. Hampsch-Woodill, J. A. Flanagan and E. K. Deemer (2002). *Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(11): 3122-8.
- Parra, E. J. (2007). *Human pigmentation variation: evolution, genetic basis, and implications for public health*. American Journal of Physical Anthropology Supplement 45: 85-105.
- Paunel, A. N., A. Dejam, S. Thelen, M. Kirsch, M. Horstjann, P. Gharini, M. Mürtz, M. Kelm, H. De Groot, V. Kolb-Bachofen and C. V. Suschek (2005). *Enzyme-independent nitric oxide formation during UVA challenge of human skin: Characterization, molecular sources, and mechanisms*. Free Radical Biology and Medicine 38(5): 606-615.
- Peus, D., A. Meves, R. A. Vasa, A. Beyerle, T. O'Brien and M. R. Pittelkow (1999). *H₂O₂ is required for UVB-induced EGF receptor and downstream signaling pathway activation*. Free Radical Biology and Medicine 27(11-12): 1197-202.
- Peus, D., R. A. Vasa, A. Meves, M. Pott, A. Beyerle, K. Squillace and M. R. Pittelkow (1998). *H₂O₂ is an important mediator of UVB-induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes*. Journal of Investigative Dermatology 110(6): 966-71.
- Philips, N., J. Conte, Y. J. Chen, P. Natrajan, M. Taw, T. Keller, J. Givant, M. Tuason, L. Dulaj, D. Leonardi and S. Gonzalez (2009a). *Beneficial regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors, fibrillar collagens and transforming growth factor-beta by Polypodium leucotomos, directly or in dermal fibroblasts, ultraviolet radiated fibroblasts, and melanoma cells*. Archives of Dermatological Research 301(7): 487-95.
- Philips, N., L. Dulaj and T. Upadhy (2009b). *Cancer cell growth and extracellular matrix remodeling mechanism of ascorbate; beneficial modulation by P. leucotomos*. Anticancer Research 29(8): 3233-8.
- Philips, N., J. Smith, T. Keller and S. Gonzalez (2003). *Predominant effects of Polypodium leucotomos on membrane integrity, lipid peroxidation, and expression of elastin and*

Bibliografía

- matrixmetalloproteinase-1 in ultraviolet radiation exposed fibroblasts, and keratinocytes*. Journal of Dermatological Science 32(1): 1-9.
- Pillai, S., C. Oresajo and J. Hayward (2005). *Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review*. International Journal of Cosmetic Science 27(1): 17-34.
- Pineiro Alvarez, B. (1983). *Two years' personal experience in treatment of various clinical forms of psoriasis with Polypodium leucotomos extract (Anapsos) [DOS ANOS DE EXPERIENCIA PERSONAL EN EL TRATAMIENTO CON ANAPSOS DEL PSORIASIS EN DIFERENTES FORMAS CLINICAS]*. Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana 11(1): 65-72.
- Podda, M. and M. Grundmann-Kollmann (2001). *Low molecular weight antioxidants and their role in skin aging [Kleinmolekulare antioxidantien und ihre rolle bei der hautalterung]*. H+G Zeitschrift fur Hautkrankheiten 76(10): 617-621.
- Podda, M., M. G. Traber, C. Weber, L. J. Yan and L. Packer (1998). *UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin*. Free Radical Biology and Medicine 24(1): 55-65.
- Prives, C. and P. A. Hall (1999). *The p53 pathway*. The Journal of Pathology 187(1): 112-26.
- Punzón, C., A. Alcaide and M. Fresno (2003). *In vitro anti-inflammatory activity of Phlebodium decumanum. Modulation of tumor necrosis factor and soluble TNF receptors*. International Immunopharmacology 3(9): 1293-1299.
- Rabe, J. H., A. J. Memelak, P. J. S. McElgunn, W. L. Morison and D. N. Sauder (2006). *Photoaging: mechanisms and repair*. Journal of the American Academy of Dermatology 55(1): 1-19.
- Rass, K. and J. Reichrath (2008). *UV damage and DNA repair in malignant melanoma and nonmelanoma skin cancer*. Advances in Experimental Medicine and Biology 624: 162-78.
- Rayward, J., V. G. Villarrubia, C. Guillen, A. Prieto, M. Rodriguez-Zapata, G. Sada and M. Alvarez-Mon (1997). *An extract of the fern Polypodium leucotomos inhibits human peripheral blood mononuclear cells proliferation in vitro*. International Journal of Immunopharmacology 19(1): 9-14.

- Renzing, J., S. Hansen and D. P. Lane (1996). *Oxidative stress is involved in the UV activation of p53*. Journal of Cell Science 109(5): 1105-1112.
- Richard, M. J., B. Portal, J. Meo, C. Coudray, A. Hadjian and A. Favier (1992). *Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid*. Clinical Chemistry 38(5): 704-709.
- Rochette, P. J., J. P. Therrien, R. Drouin, D. Perdiz, N. Bastien, E. A. Drobetsky and E. Sage (2003). *UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells*. Nucleic Acids Research 31(11): 2786-2794.
- Romerdahl, C. A., H. Okamoto and M. L. Kripke (1989). *Immune surveillance against cutaneous malignancies in experimental animals*. Immunology series 46: 749-767.
- Sander, C. S., H. Chang, F. Hamm, P. Elsner and J. J. Thiele (2004). *Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis*. International Journal of Dermatology 43(5): 326-35.
- Scaletta, L. J. and D. K. MacCallum (1972). *A fine structural study of divalent cation-mediated epithelial union with connective tissue in human oral mucosa*. American Journal of Anatomy 133(4): 431-453.
- Schwarz, A., A. Maeda, K. Kernebeck, H. Van Steeg, S. Beissert and T. Schwarz (2005). *Prevention of UV radiation-induced immunosuppression by IL-12 is dependent on DNA repair*. Journal of Experimental Medicine 201(2): 173-179.
- Schwarz, T. (2005). *Mechanisms of UV-induced immunosuppression*. Keio Journal of Medicine 54(4): 165-171.
- Seite, S., H. Zucchi, D. Moyal, S. Tison, D. Compan, F. Christiaens, A. Gueniche and A. Fourtanier (2003). *Alterations in human epidermal Langerhans cells by ultraviolet radiation: Quantitative and morphological study*. British Journal of Dermatology 148(2): 291-299.
- Sempere-Ortells, J. M., A. Campos, I. Velasco, F. Marco, A. Ramirez-Bosca, J. Diaz and J. Pardo (2002). *Anapsos (Polypodium leucotomos) modulates lymphoid cells and the expression of adhesion molecules*. Pharmacological Research 46(2): 187-190.
- Shindo, Y., E. Witt, D. Han and L. Packer (1994). *Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis*. Journal of Investigative Dermatology 102(4): 470-475.

Bibliografía

- Shreedhar, V., T. Giese, V. W. Sung and S. E. Ullrich (1998). *A cytokine cascade including prostaglandin E2, IL-4, and IL-10 is responsible for UV-induced systemic immune suppression*. Journal of Immunology 160(8): 3783-3789.
- Simon, M. M., Y. Aragane, A. Schwarz, T. A. Luger and T. Schwarz (1994). *UVB light induces nuclear factor kappa B (NF kappa B) activity independently from chromosomal DNA damage in cell-free cytosolic extracts*. Journal of Investigative Dermatology 102(4): 422-7.
- Siscovick, J. R., T. Zapolanski, C. Magro, K. Carrington, S. Prograis, M. Nussbaum, S. Gonzalez, W. Ding and R. D. Granstein (2008). *Polypodium leucotomos inhibits ultraviolet B radiation-induced immunosuppression*. Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine 24(3): 134-41.
- Slominski, A., J. Baker, G. Ermak, A. Chakraborty and J. Pawelek (1996). *Ultraviolet B stimulus production of corticotropin releasing factor (CRF) by human melanocytes*. FEBS Letters 399(1-2): 175-176.
- Stanton, W. R., M. Janda, P. D. Baade and P. Anderson (2004). *Primary prevention of skin cancer: a review of sun protection in Australia and internationally*. Health Promotion International 19(3): 369-78.
- Sturm, R. A. (1998). *Human pigmentation genes and their response to solar UV radiation*. Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 422(1): 69-76.
- Sur, I., M. Ulvmar and R. Toftgard (2008). *The two-faced NF-kappaB in the skin*. International Reviews of Immunology 27(4): 205-23.
- Suschek, C. V., K. Briviba, D. Bruch-Gerharz, H. Sies, K. D. Kröncke and V. Kolb-Bachofen (2001). *Even after UVA-exposure will nitric oxide protect cells from reactive oxygen intermediate-mediated apoptosis and necrosis*. Cell Death and Differentiation 8(5): 515-527.
- Svobodova, A., D. Walterova and J. Vostalova (2006). *Ultraviolet light induced alteration to the skin*. Biomedical Papers of the Medicine Faculty of the University Palackého Olomouc Czech Republic 150(1): 25-38.
- Telakowski-Hopkins, C. A., R. G. King and C. B. Pickett (1988). *Glutathione S-transferase Ya subunit gene: Identification of regulatory elements required for basal level and*

- inducible expression*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85(4): 1000-1004.
- Thiele, J. J. and S. Ekanayake-Mudiyanselage (2007). *Vitamin E in human skin: organ-specific physiology and considerations for its use in dermatology*. Molecular Aspects of Medicine 28(5-6): 646-67.
- Tilli, C. M., M. A. Van Steensel, G. A. Krekels, H. A. Neumann and F. C. Ramaekers (2005). *Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma*. British Journal of Dermatology 152(6): 1108-24.
- Tuominen, M., L. Bohlin and W. Rolfsen (1992). *Effects of Calaguala and an active principle, adenosine, on platelet activating factor*. Planta Medica 58(4): 306-310.
- Uitto, J. (2008). *The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure*. Journal of Drugs in Dermatology 7(2 Suppl): s12-6.
- Ullasz, A. and J. M. Spencer (2004). *Chemoprevention of skin cancer and photoaging*. Clinics in Dermatology 22(3): 178-182.
- Ullrich, S. E. (2005). *Mechanisms underlying UV-induced immune suppression*. Mutation Research 571(1-2): 185-205.
- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic and M. Mazur (2006). *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chem Biol Interact 160(1): 1-40.
- Vargas, J., C. Munoz, C. Osorio and E. Garcia Olivares (1983). *Anapsos, an antipsoriatic drug which increases the proportion of suppressor cells in human peripheral blood*. Annales d'Immunologie 134 C(3): 393-400.
- Vasänge, M., B. Liu, C. J. Welch, W. Rolfsen and L. Bohlin (1997). *The flavonoid constituents of two Polypodium species (Calaguala) and their effect on the elastase release in human neutrophils*. Planta Medica 63(6): 511-517.
- Vile, G. F. (1997). *Active oxygen species mediate the solar ultraviolet radiation-dependent increase in the tumour suppressor protein p53 in human skin fibroblasts*. FEBS Letters 412(1): 70-74.
- Vink, A. A., A. M. Moodycliffe, V. Shreedhar, S. E. Ullrich, L. Roza, D. B. Yarosh and M. L. Kripke (1997). *The inhibition of antigen-presenting activity of dendritic cells resulting from UV irradiation of marine skin is restored by in vitro photorepair of cyclobutane pyrimidine dimers*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94(10): 5255-5260.

Bibliografía

- Vousden, K. H. and D. P. Lane (2007). *p53 in health and disease*. Natural Review Molecular and Cellular Biology 8(4): 275-83.
- Weller, R. (2003). *Nitric oxide: a key mediator in cutaneous physiology*. Clinical and Experimental Dermatology 28(5): 511-4.
- Wheeler, C. R., J. A. Salzman, N. M. Elsayed, S. T. Omaye and D. W. Korte Jr (1990). *Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity*. Analytical Biochemistry 184(2): 193-199.
- Wijnhoven, S. W., E. M. Hoogervorst, H. de Waard, G. T. van der Horst and H. van Steeg (2007). *Tissue specific mutagenic and carcinogenic responses in NER defective mouse models*. Mutation Research 614(1-2): 77-94.
- Wild, A. C., H. R. Moinova and R. T. Mulcahy (1999a). *Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2*. Journal of Biological Chemistry 274(47): 33627-33636.
- Wild, A. C., H. R. Moinova and R. T. Mulcahy (1999b). *Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2*. The Journal of Biological Chemistry 274(47): 33627-36.
- Woodward, D. F. and D. A. A. Owen (1982). *Effect of H1- and H2-receptor antagonists on cutaneous inflammation evoked by histamine analogues and UV radiation*. European Journal of Pharmacology 77(2-3): 103-112.
- Yamaguchi, Y., J. Z. Beer and V. J. Hearing (2008). *Melanin mediated apoptosis of epidermal cells damaged by ultraviolet radiation: factors influencing the incidence of skin cancer*. Archives of Dermatological Research 300 Suppl 1: S43-50.
- You, Y. H., D. H. Lee, J. H. Yoon, S. Nakajima, A. Yasui and G. P. Pfeifer (2001). *Cyclobutane Pyrimidine Dimers Are Responsible for the Vast Majority of Mutations Induced by UVB Irradiation in Mammalian Cells*. Journal of Biological Chemistry 276(48): 44688-44694.
- Young, A. R. (1997). *Chromophores in human skin*. Physics in Medicine and Biology 42(5): 789-802.
- Ywan Feng, L., S. T. Kim and A. Sancar (1993). *Evidence for lack of DNA photoreactivating enzyme in humans*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90(10): 4389-4393.

Bibliografía

Zhang, Y. and G. B. Gordon (2004). *A strategy for cancer prevention: Stimulation of the Nrf2-ARE signaling pathway*. *Molecular Cancer Therapeutics* 3(7): 885-893.