

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y FARMACIA



**IMPLANTACIÓN DE MODELOS TRIDIMENSIONALES DE
PIEL HUMANA: APLICACIÓN EN LA EVALUACIÓN DE LOS
MARCADORES MOLECULARES DE LA RADIACIÓN SOLAR**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

PAULA MONTERO MAGALLÓ

Dirigida por:

DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO

DRA. D.ª. MARIA JOSÉ VILLARROEL UTRILLAS

VALENCIA, 2022



DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO
Catedrático Numerario de Universidad
Departamento de Farmacología
Universidad de Valencia

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Doña Paula Montero Magalló, con el título:

“IMPLANTACIÓN DE MODELOS TRIDIMENSIONALES DE PIEL HUMANA: APLICACIÓN EN LA EVALUACIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES DE LA RADIACIÓN SOLAR”

ha sido realizada bajo mi dirección y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

En València, Abril de 2022.

JULIO
FRANCISCO|
CORTIJO|
GIMENO

Firmado
digitalmente por
JULIO FRANCISCO|
CORTIJO|GIMENO
Fecha: 2022.04.27
08:34:36 +02'00'

Dr. Julio Cortijo Gimeno



DRA. D^a. MARIA JOSÉ VILLARROEL UTRILLAS
Toxicóloga (ERT) y Evaluadora de la seguridad
RNB Cosméticos

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Doña Paula Montero Magalló, con el título:

**“IMPLANTACIÓN DE MODELOS TRIDIMENSIONALES DE PIEL HUMANA: APLICACIÓN EN LA
EVALUACIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES DE LA RADIACIÓN SOLAR”**

ha sido realizada bajo mi dirección y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

En València, Abril de 2022.

Dra. Maria José Villarroel Utrillas

AGRADECIMIENTOS

El viaje personal y profesional que supone la realización de una tesis doctoral es cuanto menos complicado, por ello me gustaría agradecer en las siguientes líneas a todas las personas que han formado parte de este proyecto y han caminado de mi mano durante el proceso.

En primer lugar, agradecer al Dr. Julio Cortijo, que cuando todavía estaba en tercero de carrera, me aceptó como estudiante de prácticas extracurriculares y me explicó los entresijos de la carrera investigadora. Aprendí y disfruté tanto esas prácticas que acabé realizando TGF y TFM bajo su dirección y volví a su laboratorio tras 7 meses en Irlanda, para iniciarme en el mundo de la investigación. Desde entonces, me ha enseñado a crecer profesionalmente no solo en ciencia sino también con su visión empresarial.

En segundo lugar, a la empresa que ha hecho posible esta tesis doctoral; Cuando RNB llamó a mi puerta, acababa de perder una beca predoctoral meritoriamente adquirida por razones absolutamente ajenas a mí, y de la que había disfrutado ya 1 año. No puedo explicar con palabras la indefensión, la indignación y la impotencia que sentí al tener que abandonar por aquel entonces la tesis doctoral. Sin embargo, cuando Julio me habló del proyecto de colaboración con RNB, volví a ilusionarme. No solo tenía la oportunidad de volver a la investigación con un proyecto prometedor, sino además, de la mano de una empresa líder en el sector de la cosmética y beneficiaria del plan CDTI del Ministerio de Ciencia e Innovación, con el proyecto "Nueva metodología experimental para ensayos en piel artificial (ref. ARTSKIN IDI-20190271)" y además, haciendo la tesis en este tema. Por ello quiero hacer especial mención a M^o José Villaroel, mi mentora en RNB, que desde el primer día me recibió con los brazos abiertos y ha estado siempre dispuesta a ayudarme ante cualquier duda y a enseñarme a discutir los resultados desde la perspectiva cosmética.

No puedo dejar de agradecer a las personas que han estado en primera línea durante la tesis, mi Labteam. Trabajar con vosotras (y uso el femenino como genérico, porque la ciencia está plagada de mujeres), ha amenizado mucho más el camino. En la balanza, los días duros en el laboratorio se compensaban con nuestros almuerzos,

charlas científicas o psicológicas, escapadas y confidencias. No me puedo sentir más afortunada de tener compis de trabajo que sé que serán amistades para toda la vida.

Agradecer también a Estela, por aportar su visión artística al trabajo y diseñar la portada de la tesis con tanta creatividad.

Y finalmente, a mi familia:

A mis padres, porque desde que supe que quería trabajar en algo relacionado con el laboratorio, me animaron a estudiar aquello que me apasionara y no algo "que me hiciera ganar dinero". Siento que por la autoexigencia y presión a la que me sometí durante mis años de estudio, para sacar nota, para conseguir trabajar en investigación, tuvierais que aguantar mis malos humos. Pero aquí estoy, gracias a vuestro apoyo y comprensión incondicionales.

A Loci, mi pequeña. Gracias por escuchar siempre con entusiasmo todas mis anécdotas científicas de la tesis, aunque no entiendas nada de nada, y por comprender como funciona el sector en el que trabajo, para apoyarme. Estoy muy orgullosa de la magnífica persona en la que te has convertido y sé que con esa ambición que te mueve, vas a llegar muy lejos profesionalmente. De todas las hermanas que tengo, sin duda, eres mi preferida.

A Vicent, porque hemos crecido juntos durante 10 años, y nos hemos acompañado y apoyado en nuestros caminos profesionales sin importar cual fuera el bache. Sin duda, si no fuera por tí, nuestros hijos gatunos habrían muerto de inanición esperando a que yo les diera de comer tras un largo día de laboratorio. Gracias por haberme animado siempre a seguir con la tesis, por ayudarme con nuestros debates científicos y por enseñarme que no hay que PREocuparse tanto de las cosas. Gracias por ser el sitio al que quiero ir cuando pasa algo, bueno o malo, por ser mi hogar.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	25
1.1	LA PIEL.....	27
1.1.1	Epidermis.....	28
1.1.2	Dermis.....	30
1.1.3	Hipodermis.....	31
1.2	ESPECTRO DE RADIACIÓN SOLAR.....	31
1.3	EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LA RADIACIÓN SOBRE LA PIEL.....	33
1.3.1	Estrés Oxidativo.....	33
1.3.2	Inflamación.....	35
1.3.3	Fotoenvejecimiento.....	37
1.3.4	Fotocarcinogénesis.....	38
1.3.5	Efectos biológicos de la radiación ultravioleta en la piel.....	40
1.3.6	Efectos biológicos del espectro visible en la piel.....	41
1.3.7	Efectos biológicos de la radiación infrarroja en la piel.....	42
1.4	PROTECTORES SOLARES.....	43
1.4.1	Filtros ultravioleta.....	44
1.4.2	Productos biológicos empleados en fotoprotección.....	49
1.5	ACTIVACIÓN DE LA RUTA DE NRF2 EN FOTOPROTECCION.....	49
1.5.1	Obacunona.....	50
1.6	MODELOS ORGANOTÍPICOS DE PIEL PARA LA EXPERIMENTACIÓN COSMÉTICA IN VITRO	51
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	55
2.1	HIPÓTESIS.....	57
2.2	OBJETIVOS.....	59
3	MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
3.1	MATERIALES.....	63
3.1.1	Composición de las formulaciones cosméticas de RNB.....	63
3.1.2	Reactivos empleados.....	64
3.2	MÉTODOS.....	67
3.2.1	Cultivos celulares y modelos 3D.....	67
3.2.2	Tratamiento <i>in vitro</i> para ensayos de irritación en monocapa y en modelos de piel reconstruida.....	68
3.2.3	Protocolos de irradiación en monocapa y modelo 3D.....	70
3.2.3.1	Luz solar completa, UVA y luz azul.....	70
3.2.3.2	Infrarrojo.....	71
3.2.4	Protocolo de fotoprotección en monocapa y modelo 3D.....	72

3.2.4.1	Ensayo de fotoprotección de en monocapa	72
3.2.4.2	Ensayo de fotoprotección en el modelo 3D Phenion®-FT.....	73
3.2.5	Ensayo de viabilidad MTT.....	74
3.2.5.1	MTT en queratinocitos en monocapa	74
3.2.5.2	MTT en modelos 3D SkinEthic™ RHE y Phenion®-FT.....	74
3.2.6	Ensayo de citotoxicidad LDH	75
3.2.7	Dímeros de timina en monocapa por citometría de flujo.....	75
3.2.8	Ensayo de liberación de especies reactivas de oxígeno en monocapa por citometría de flujo.....	76
3.2.9	Ensayo de apoptosis en monocapa por citometría de flujo.....	77
3.2.10	Cuantificación de proteínas liberadas al medio de cultivo mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).....	78
3.2.11	Cuantificación de los niveles de Glutation (GSH)	79
3.2.12	Silenciamiento génico mediante ARN interferente	80
3.2.13	Prueba KeratinoSens®	82
3.2.14	Ensayo de expresión génica	83
3.2.14.1	Extracción y cuantificación de ARN	83
3.2.14.2	Retrotranscripción.....	84
3.2.14.3	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT).....	85
3.2.15	Ensayos de expresión protéica Western Blot.....	88
3.2.16	Histología.....	90
3.2.16.1	Fijación y deshidratación del tejido.....	90
3.2.16.2	Tinción hematoxilina-eosina	91
3.2.16.3	Inmunohistoquímica	92
3.2.17	Análisis estadístico	94
4	RESULTADOS	95
4.1	CARACTERIZACIÓN DE DOS MODELOS 3D DE PIEL	97
4.1.1	El tejido de piel artificial Phenion®-FT presenta mayor resistencia frente irritantes que el tejido de epidermis Skinethic™.....	97
4.1.2	El tejido de piel artificial Phenion®-FT induce una mejor respuesta inflamatoria que el tejido de epidermis Skinethic™	98
4.1.3	El tejido de piel artificial Phenion®-FT tiene una arquitectura tisular similar a la piel humana y es más resistente a alteraciones morfológicas en comparación con el tejido de epidermis Skinethic™.....	99
4.2	EFECTOS DE LA RADIACIÓN SOLAR COMPLETA	101
4.2.1	La radiación solar completa altera la viabilidad celular e induce una respuesta inflamatoria en queratinocitos primarios y en modelos artificiales de piel 3D.....	101

4.2.2	La radiación solar completa modula la expresión génica de marcadores dérmicos y epidérmicos en modelos artificiales de piel 3D.....	104
4.2.3	La radiación solar completa induce el aumento del estrés oxidativo y la formación de dímeros de timina en queratinocitos primarios y en modelos artificiales de piel 3D	106
4.2.4	La radiación solar completa afecta a la arquitectura tisular de los tejidos de epidermis y piel artificial Skinethic™ y Phenion®-FT	108
4.2.5	La radiación solar completa induce la modulación de la expresión de p21 y p53 en Phenion®-FT	110
4.3	EFFECTOS DE LA RADIACIÓN UVA SOLA	112
4.3.1	La radiación UVA altera la viabilidad celular e induce una respuesta inflamatoria en queratinocitos primarios y en el modelo de piel 3D Phenion®-FT.....	112
4.3.2	La radiación UVA modula la expresión génica de marcadores dérmicos y epidérmicos en el modelo de piel 3D Phenion®-FT.	115
4.3.3	La radiación UVA induce el aumento del estrés oxidativo y la formación de dímeros de timina en queratinocitos primarios y en el modelo de piel 3D Phenion®-FT.	116
4.3.4	La radiación UVA afecta a la arquitectura tisular del modelo de piel 3D Phenion®-FT	118
4.3.5	La radiación UVA induce la modulación de la expresión de p21 y p53 en el modelo de piel 3D Phenion®-FT.....	118
4.4	EFFECTOS DE LA LUZ AZUL	120
4.4.1	La luz azul afecta a la viabilidad y citotoxicidad celular, pero no induce una respuesta inflamatoria en queratinocitos primarios.	120
4.4.2	La luz azul disminuye la viabilidad celular, e induce un aumento de la citotoxicidad a dosis altas en el modelo de piel 3D Phenion®-FT	121
4.4.3	La luz azul modula la respuesta inflamatoria, en el modelo de piel 3D Phenion®-FT	122
4.4.4	La luz azul modula la expresión génica de marcadores dérmicos y epidérmicos en el modelo de piel 3D Phenion®-FT	123
4.4.5	La luz azul afecta a la arquitectura tisular en el modelo de piel 3D Phenion®-FT	124
4.4.6	La luz azul induce la modulación de la expresión de p21 y p53 en el modelo de piel 3D Phenion®-FT	125
4.5	EFFECTOS DE LA LUZ INFRARROJA	126
4.5.1	La luz infrarroja afecta a la viabilidad y citotoxicidad celular, pero no induce una respuesta inflamatoria en queratinocitos primarios.	126
4.5.2	La luz infrarroja disminuye la viabilidad celular, e induce un aumento de la citotoxicidad en el modelo de piel 3D Phenion®-FT.	127
4.5.3	La luz infrarroja modula la respuesta inflamatoria, en el modelo de piel 3D Phenion®-FT.	128

4.5.4	La luz infrarroja modula la expresión de marcadores dérmicos en el modelo de piel 3D Phenion®-FT.	129
4.5.5	La luz infrarroja no modifica en gran medida la arquitectura tisular del modelo de piel 3D Phenion®-FT	131
4.5.6	La luz infrarroja induce la modulación de la expresión de p21 y p53 en el modelo de piel 3D Phenion®-FT	132
4.6	ESTUDIO DE CORRELACIÓN DE BIOMARCADORES CON CADA LUZ DEL ESPECTRO SOLAR	133
4.7	FOTOPROTECCIÓN DEL COMPUESTO NATURAL OBACUNONA	134
4.7.1	La obacunona protege frente al aumento de citotoxicidad inducido por la luz solar completa en queratinocitos primarios y en el modelo de piel 3D Phenion®-FT, mientras que su efecto antiinflamatorio no es tan potente.	134
4.7.2	La obacunona previene frente a la modulación de la expresión y liberación de metaloproteinasa y marcadores dérmicos inducidos por la luz solar en queratinocitos primarios y en el modelo de piel 3D Phenion®-FT.	136
4.7.3	La obacunona ejerce efectos antioxidantes frente a la exposición de radiación solar en queratinocitos primarios y en el modelo de piel 3D Phenion®-FT	138
4.7.4	La obacunona previene frente a la apoptosis inducida por la luz solar en queratinocitos primarios y en el modelo de piel 3D Phenion®-FT.....	139
4.7.5	La obacunona activa la cascada de señalización de Nrf2 en queratinocitos NHEK y en los queratinocitos de línea keratinoSens®.	141
4.8	EVALUACIÓN DE LA FOTOPROTECCIÓN DE PROTECTORES SOLARES FORMULADOS POR RNB EN EL MODELO DE PIEL 3D PHENION®-FT.	143
4.8.1	Protección de las formulaciones frente la pérdida de viabilidad, aumento de citotoxicidad e inflamación inducidas por luz solar completa y luz UVA en Phenion®-FT	143
4.8.2	Protección de las formulaciones frente la modulación de biomarcadores dérmicos y la alteración de la arquitectura tisular inducidas por luz solar completa y luz UVA en Phenion®-FT	145
4.8.3	Protección de las formulaciones frente la modulación de los marcadores p21 y p53 inducida por la luz solar completa y luz UVA en Phenion®-FT.....	150
4.8.4	Protección de las formulaciones frente la pérdida de viabilidad, aumento de citotoxicidad e inflamación inducidas por la luz azul en Phenion®-FT.....	152
4.8.5	Protección de las formulaciones frente la modulación de biomarcadores dérmicos y la alteración de la arquitectura tisular inducidas por la luz azul en Phenion®-FT	153
4.8.6	Protección de las formulaciones frente la modulación de los marcadores p21 y p53 inducida por la luz azul en Phenion®-FT.....	155
4.8.7	Protección de las formulaciones frente la pérdida de viabilidad, aumento de citotoxicidad e inflamación inducidas por luz infrarroja en Phenion®-FT.....	156
4.8.8	Protección de las formulaciones frente la modulación de biomarcadores dérmicos y la alteración de la arquitectura tisular inducidas por luz infrarroja en Phenion®-FT	157

4.8.9	Protección de las formulaciones frente la modulación de los marcadores p21 y p53 inducida por la luz azul en Phenion®-FT.....	159
4.8.10	Resumen del panel de marcadores y la fotoprotección ejercida por las formulaciones evaluadas.....	159
5	DISCUSIÓN.....	161
6	CONCLUSIONES.....	177
7	BIBLIOGRAFÍA.....	181
8	ABREVIATURAS.....	201
9	ANEXOS.....	207

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura esquemática de la piel.....	27
Figura 2. Estructura esquemática de la epidermis.....	29
Figura 3. Corte histológico de la dermis.....	30
Figura 4. Longitudes de onda del espectro solar y su penetración en las capas de la piel	33
Figura 5. Activación de la ruta de transcripción de Nrf2	35
Figura 6. Reacción eritematosa en la epidermis tras exposición a UVB.....	37
Figura 7. Cortes histológicos de piel normal y envejecida.....	38
Figura 8. Principales efectos de la radiación ultravioleta en la piel	40
Figura 9. Mecanismo de acción de los protectores solares orgánicos e inorgánicos....	45
Figura 10. Estructura química de la Obacunona	50
Figura 11. Pasos en la reconstrucción de un modelo 3D de piel completa in vitro.....	52
Figura 12. Cultivos celulares y modelos 3D.....	68
Figura 13. Protocolo de aplicación tópica de los irritantes mediante malla de nylon en Phenion®-FT.....	69
Figura 14. Equipos de luz artificial.....	71
Figura 15. Equipo de luz infrarroja	72
Figura 16. Ensayo MTT	75
Figura 17. Reacción del 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H ₂ DCF-DA) a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF)	77
Figura 18. Esquema de la técnica de ELISA cuantitativo en sándwich.....	79
Figura 19: Reacción de conversión de un derivado de la luciferina a luciferina en presencia de GSH por la enzima GSH S-transferasa.....	80
Figura 20. Silenciamiento génico mediante ARN interferente.	81
Figura 21. Inducción de la expresión de la luciferasa en la línea celular keratinoSens®	82
Figura 22. Equipo de extracción de ARN.....	84
Figura 23. Esquemas de la retrotranscripción	85
Figura 24. Sistema TaqMan® de cuantificación fluorométrica de la expresión génica .	86
Figura 25. Esquema de la técnica western Blot	90
Figura 26. Manejo histológico de Phenion®-FT.....	91
Figura 27. El tejido de piel 3D Phenion®-FT presenta mayor resistencia frente a los compuestos irritantes SDS y ácido acético que el tejido de epidermis artificial Skinethic™.....	98
Figura 28. El tejido de piel artificial Phenion®-FT induce una mejor respuesta inflamatoria frente a los compuestos irritantes SDS y ácido acético que el tejido de epidermis Skinethic™.	99
Figura 29. Comparativa de la morfología en cortes histológicos del modelo de epidermis SkinEthic™, el modelo de piel completa Phenion®-FT y piel abdominal humana.....	100
Figura 30. El tejido de piel artificial Phenion®-FT es más resistente a alteraciones morfológicas en comparación con el tejido de epidermis Skinethic™ tras el tratamiento con el compuesto irritante SDS	101

Figura 31. La radiación solar completa induce una disminución de la viabilidad en queratinocitos primarios NHEK, así como un aumento de la inflamación.	102
Figura 32. La radiación solar completa induce una disminución de la viabilidad y aumento de citotoxicidad en los modelos de piel 3D SkinEthic™ Y Phenion®-FT.....	103
Figura 33. La radiación solar completa induce la producción de citoquinas inflamatorias en los modelos de piel 3D SkinEthic™ Y Phenion®-FT.	104
Figura 34. La radiación solar completa modula la expresión génica de marcadores dérmicos y epidérmicos en los tejidos de epidermis artificial SkinEthic™.	105
Figura 35. La radiación solar completa modula la expresión génica de marcadores dérmicos y epidérmicos en los tejidos de piel artificial Phenion®-FT.	106
Figura 36. La radiación solar completa induce la liberación de especies reactivas de oxígeno en queratinocitos primarios NKEK y aumenta los niveles de expresión del antioxidante glutatión peroxidasa 1 en SkinEthic™ y Phenion®-FT.	107
Figura 37. La radiación solar completa induce la formación de dímeros de timina en queratinocitos primarios NKEK y en el tejido de piel 3D Phenion®-FT	108
Figura 38. La radiación solar completa afecta a la arquitectura tisular del tejido de epidermis Skinethic™	109
Figura 39. La radiación solar completa afecta a la arquitectura tisular del tejido de piel Phenion®-FT.....	110
Figura 40. La radiación solar completa induce la modulación de la expresión génica y protéica de p21 y p53.....	111
Figura 41. La radiación UVA induce una disminución de la viabilidad y aumento de la citotoxicidad, así como un aumento de la inflamación, en queratinocitos primarios NHEK	113
Figura 42. La radiación UVA induce una disminución de la viabilidad y aumento de citotoxicidad en el modelo de piel 3D Phenion®-FT.....	114
Figura 43. La radiación UVA induce la producción de citoquinas inflamatorias en el modelo de piel 3D Phenion®-FT	115
Figura 44. La radiación UVA modula la expresión génica de marcadores dérmicos y epidérmicos en el tejido de piel artificial Phenion®-FT.....	116
Figura 45. La radiación UVA induce la formación de dímeros de timina en queratinocitos primarios NKEK y en el tejido de piel 3D Phenion®-FT además de aumentar los niveles de expresión del antioxidante glutatión peroxidasa 1 en Phenion®-FT.....	117
Figura 46. La radiación UVA afecta a la arquitectura tisular del tejido de piel 3D Phenion®-FT.....	118
Figura 47. La radiación UVA induce la modulación de la expresión génica y protéica de p21 y p53.	119
Figura 48. La luz azul induce una disminución de la viabilidad y aumento de la citotoxicidad, pero no el aumento de la inflamación, en queratinocitos primarios NHEK	121
Figura 49. La luz azul induce una disminución de la viabilidad y aumento de citotoxicidad en el modelo de piel 3D Phenion®-FT.....	122

Figura 50. La luz azul induce la producción de citoquinas inflamatorias en el modelo de piel 3D Phenion®-FT.	123
Figura 51. La luz azul modula la expresión génica de marcadores dérmicos y epidérmicos en el tejido de piel artificial Phenion®-FT.....	124
Figura 52. La luz azul afecta a la arquitectura tisular del tejido de piel 3D Phenion®-FT.	125
Figura 53. La luz azul induce la modulación de la expresión génica y protéica de p21 y p53.....	126
Figura 54. La luz infrarroja induce una disminución de la viabilidad, aumento de la citotoxicidad y disminución de metaloproteinasa 1, así como el aumento de la temperatura, a tiempos de exposición altos, en queratinocitos primarios NHEK.....	127
Figura 55. La luz infrarroja induce una disminución de la viabilidad y aumento de citotoxicidad en el modelo de piel 3D Phenion®-FT, manteniendo una temperatura inferior a los 40°C.....	128
Figura 56. La luz infrarroja induce la producción de citoquinas inflamatorias en el modelo de piel 3D Phenion®-FT.....	129
Figura 57. La luz infrarroja disminuye la expresión de los marcadores dérmicos colágeno tipo 1 alfa 1 y elastina y aumenta ligeramente los niveles de expresión del antioxidante glutatión peroxidasa 1 en Phenion®-FT.....	130
Figura 58. La luz infrarroja modula la expresión y liberación de metaloproteinasas en Phenion®-FT.....	131
Figura 59. La luz infrarroja modifica ligeramente la arquitectura tisular del tejido de piel 3D Phenion®-FT.	132
Figura 60. La luz infrarroja induce el aumento de expresión de p53, y la disminución en la expresión de p21.....	132
Figura 61. La obacunona protege frente al aumento de citotoxicidad inducido por la luz solar completa en queratinocitos primarios y en el modelo de piel 3D Phenion®-FT.	135
Figura 62. La obacunona previene ligeramente la producción de citoquinas inflamatorias en queratinocitos primarios y en el modelo de piel 3D Phenion®-FT. ...	136
Figura 63. La obacunona previene el aumento de la metaloproteinasa 1 en queratinocitos primarios y en Phenion®-FT.....	137
Figura 64. La obacunona revierte las modificaciones de expresión de marcadores dérmicos inducidos por la luz solar, excepto del Colágeno 1, en el modelo de piel 3D Phenion®-FT.....	138
Figura 65. La obacunona previene frente al estrés oxidativo en queratinocitos primarios y en Phenion®-FT.....	139
Figura 66. La obacunona revierte apoptosis celular mediada por caspasas.....	140
Figura 67. La Obacunona activa la ruta de señalización de Nrf2 en queratinocitos NHEK y en los KeratinoSens®.....	142
Figura 68. Protección de las formulaciones 1-5 frente al aumento de citotoxicidad y producción de citoquinas inflamatorias inducido por la luz solar completa.	144
Figura 69. Protección de las formulaciones 1-5 frente a la modulación de viabilidad, citotoxicidad y producción de citoquinas inflamatorias inducido por la UVA.....	145

Figura 70. Protección de las formulaciones 1-5 frente a la modulación de biomarcadores dérmicos inducida por la luz solar completa	146
Figura 71. Protección de las formulaciones 1-5 frente a la modulación de biomarcadores dérmicos inducida por la luz UVA	148
Figura 72. Protección de las formulaciones 1-5 frente a las alteraciones de la arquitectura tisular de Phenion®-FT inducidas por la luz solar completa.	149
Figura 73. Protección de las formulaciones 1-5 frente a las alteraciones de la arquitectura tisular de Phenion®-FT inducidas por la luz UVA	150
Figura 74. Protección de las formulaciones 1-5 frente a modulación de la expresión protéica de p21 y p53 inducida por la luz solar completa en Phenion®-FT	151
Figura 75. Protección de las formulaciones 1-5 frente a modulación de la expresión protéica de p21 y p53 inducida por la luz UVA en Phenion®-FT	151
Figura 76. Protección de las formulaciones 1-5 frente al aumento de citotoxicidad y producción de citoquinas inflamatorias inducido por la luz solar completa.	152
Figura 77. Protección de las formulaciones 1-5 frente a la modulación de biomarcadores dérmicos inducida por la luz azul	154
Figura 78. Protección de las formulaciones 1-5 frente a las alteraciones de la arquitectura tisular de Phenion®-FT inducidas por la luz azul	155
Figura 79. Protección de las formulaciones 1-5 frente a modulación de la expresión protéica de p21 y p53 inducida por la luz solar completa en Phenion®-FT.	155
Figura 80. Protección de las formulaciones 1-5 frente al aumento de citotoxicidad y producción de citoquinas inflamatorias inducido por la infrarroja.	157
Figura 81. Protección de las formulaciones 1-5 frente a la modulación de biomarcadores dérmicos inducida por la luz infrarroja	158
Figura 82. Protección de las formulaciones 1-5 frente a las alteraciones de la arquitectura tisular de Phenion®-FT inducidas por la luz infrarroja	159

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LA PIEL

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y representa aproximadamente el 16% del peso corporal total. Es la primera barrera contra el exterior y protege el cuerpo de gran variedad de factores ambientales estresantes [1]. La anatomía de la piel humana está bien caracterizada y existe una clara relación entre su estructura y función. Se compone de tres capas, la epidermis, la dermis y la hipodermis (Figura 1), el grosor de las cuales, varía según la región del cuerpo [2]. Entre las distintas funciones de la piel se encuentran en primer lugar, la protectora, ejerciendo protección a los órganos internos frente a traumatismos mecánicos, físicos y químicos, a la vez que evita la pérdida de agua y electrolitos. En segundo lugar, la piel se encarga de la termorregulación, mediante los fenómenos de vasodilatación y vasoconstricción en los plexos vasculares cutáneos y, en situaciones de calor extremo, la secreción de sudor refresca la superficie cutánea. En tercer lugar, se encuentra la función sensorial: el tacto, presión, vibración, temperatura, dolor y prurito son captados por receptores sensoriales y se transmiten al cerebro. En cuarto lugar, se encarga de la función secretora, a través de las glándulas de sudoríparas y, en quinto lugar, la función inmunológica: en la piel se orquesta un sistema inmune que interviene en la función defensiva cutánea. Por último, la piel es el único órgano donde, en condiciones fisiológicas e inducida por la radiación UVB, se realiza la transformación completa del 7-dehidrocolesterol en calcitriol (1,25-dihidroxitamina D3) [3].

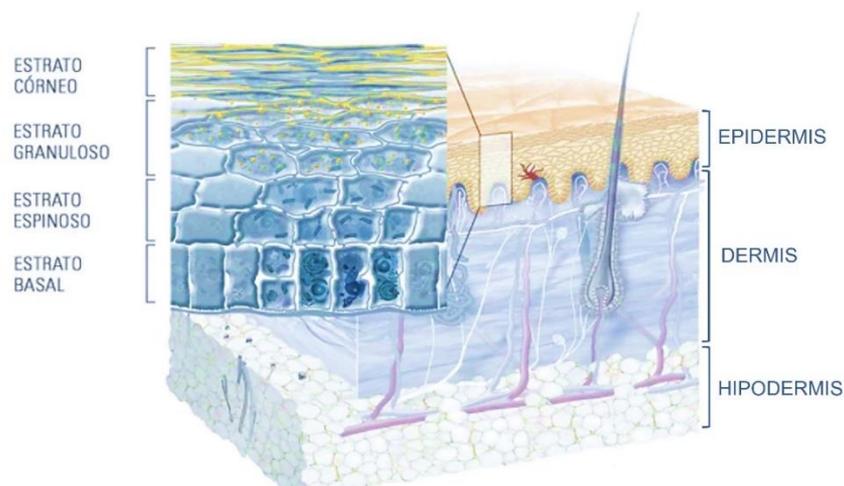


Figura 1. Estructura esquemática de la piel. Figura adaptada de referencia [4].

1.1.1 Epidermis

La epidermis es la capa externa de la piel. Es un epitelio queratinizado estratificado compuesto predominantemente por queratinocitos, que se subdivide en cuatro estratos: basal, espinoso, granular y córneo (Figura 2). En algunas zonas del cuerpo es posible encontrar un estrato adicional llamado estrato lúcido, que contiene de 2 a 3 capas de células entre el estrato granuloso y el corneo. Se encuentra presente en la piel más gruesa como la que se encuentra en las palmas de las manos y las plantas de los pies [2].

La capa basal descansa sobre una membrana en la unión dermoepidérmica y se compone por una hilera de queratinocitos columnares, con un gran núcleo oval, mitóticamente activos, que proliferan, migran superficialmente y se diferencian secuencialmente para formar la epidermis estratificada. A medida que estas células se mueven hacia la superficie y se diferencian en la capa espinosa, pierden su capacidad para dividirse, hacerse más grandes y establecer conexiones intercelulares sólidas mediante los desmosomas. Durante esta etapa de diferenciación, los queratinocitos se alargan y aplanan para formar la capa granular, que se caracteriza por la presencia de gránulos de queratohialina intracelular y cuerpos lamelares. Los gránulos de queratohialina están compuestos por proteínas clave para la formación de la envoltura cornificada, como profilagrina y loricrina, mientras que los cuerpos lamelares son orgánulos cargados de lípidos [5]. Los queratinocitos del estrato granuloso continúan su diferenciación hasta la capa más superficial donde se convierten en corneocitos, las células que componen el estrato córneo, y se caracterizan por tener queratina dispuesta en filamentos agregados junto con la proteína filagrina. Durante la transición de los queratinocitos a corneocitos, las células pierden sus núcleos y orgánulos principales, los lípidos de los cuerpos lamelares se liberan en el espacio intercelular y la envoltura cornificada reemplaza la membrana celular. La envoltura cornificada está compuesta por distintas proteínas, como la involucrina, loricrina, elafina, cornifina, queratolinina, envoplaquina y periplaquina [6]. La función de barrera de la piel se atribuye principalmente a la formación de esta capa córnea, de 10 a 20 mm de espesor compuesta de corneocitos aplanados y diferenciados, separados por capas de lípidos densamente empaquetados [1].

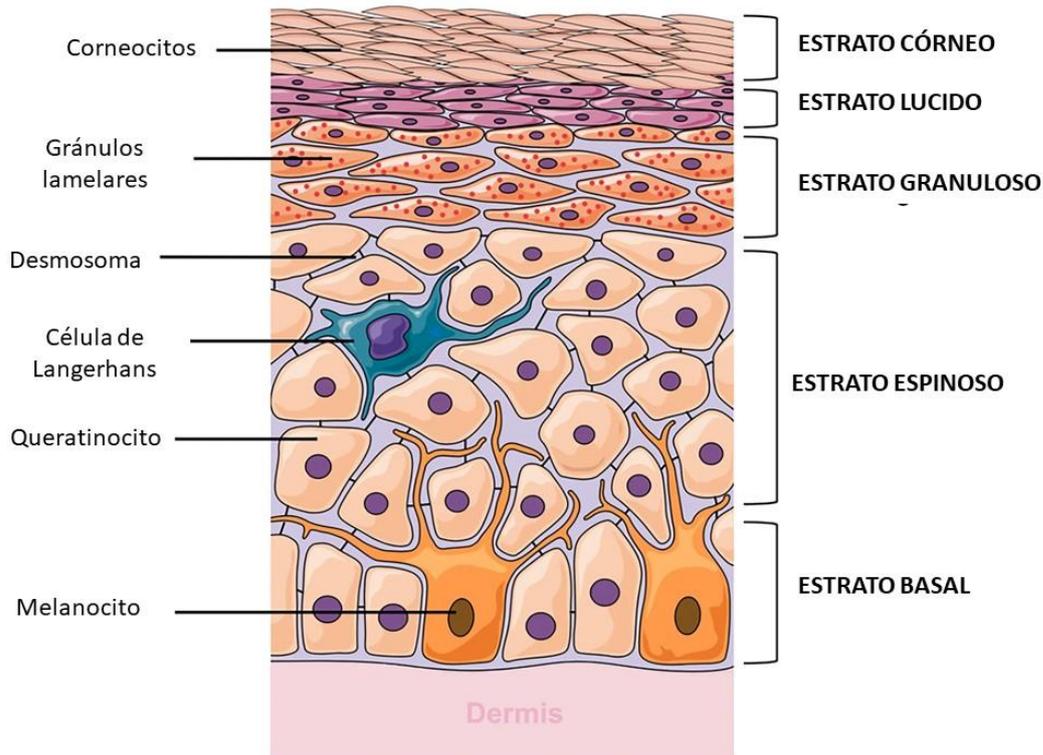


Figura 2. Estructura esquemática de la epidermis. Figura adaptada de referencia [7]

En la epidermis existen también otros tipos celulares como los melanocitos, células de origen de la cresta neural que producen melanina, responsable del pigmento de la piel. También hay células de Langerhans, células dendríticas presentadoras de antígeno que constituyen la primera línea de defensa inmunitaria, y las células de Merkel, células epidérmicas modificadas de forma ovalada que se encuentran en el estrato basal y cumplen una función sensorial como mecanorreceptores para el tacto ligero [2, 3, 8].

En la superficie inferior de la epidermis se encuentran unas prolongaciones digitiformes denominadas crestas interpapilares, introducidas entre las papilas dérmicas, que son proyecciones verticales cónicas de la dermis. La unión de ambas estructuras permite un incremento de la superficie de contacto entre la epidermis y la dermis proporcionando una mayor adhesión entre estas dos capas de la piel. La unión dermoepidérmica comprende un complejo multiprotéico continuo, que forma un entramado que sustenta y fija los queratinocitos epidérmicos a la dermis subyacente y que regula el intercambio metabólico entre las dos capas. Supone la zona de anclaje entre epidermis y dermis y está constituida por cuatro elementos fundamentales: los tonofilamentos de queratina de las células basales, hemidesmosomas, membrana

basal y la lámina fibroreticular [3]. En esta capa, el colágeno IV, colágeno VII, laminina y la integrina $\alpha 6$ son componentes críticos que contribuyen a la integridad mecánica de la piel [1, 9].

1.1.2 Dermis

Inmediatamente por debajo, y separada por la unión dermoepidérmica, se encuentra la dermis, un estrato de 20 a 30 veces mayor que epidermis, que alberga en su interior los plexos vasculonerviosos y sirve de sostén a la epidermis y a sus anejos. Está formada por una matriz fibrosa compuesta de fibras de colágeno y fibras elásticas [8]. Histológicamente, se pueden distinguir dos capas. La superior, o dermis papilar está compuesta por las papilas dérmicas. En esta capa las fibras de colágeno y fibras elásticas son más delgadas. La capa inferior, o dermis reticular, es mucho más gruesa que la papilar, y se compone de fibras de colágeno y elásticas más abundantes y gruesas, dispuestas horizontalmente a la superficie cutánea (Figura 3) [3].

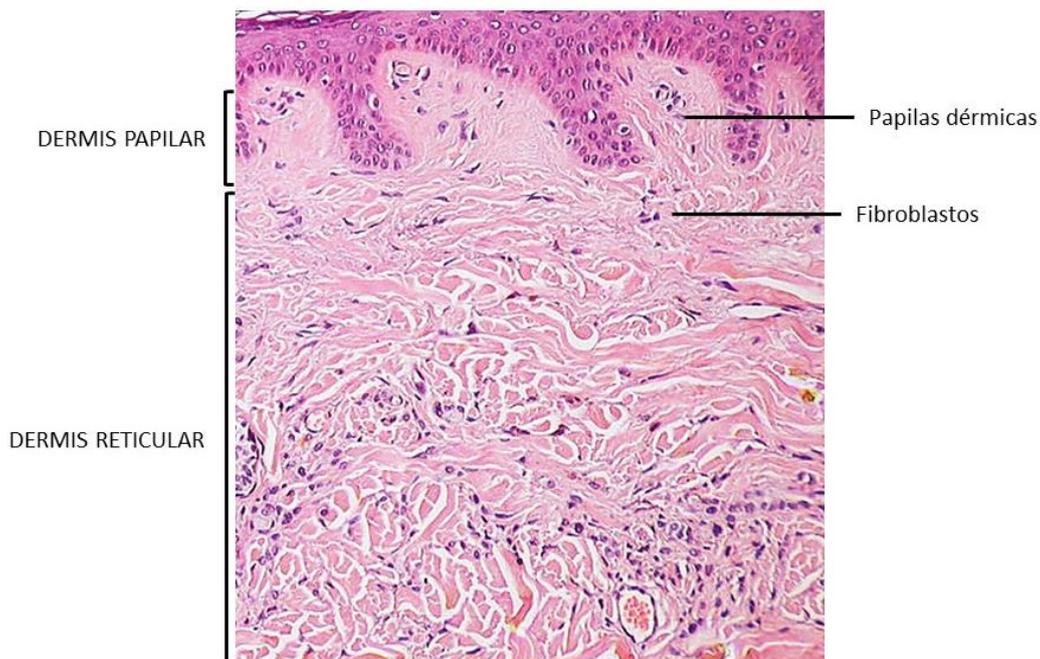


Figura 3. Corte histológico de la dermis. Figura adaptada de referencia [10]

A diferencia de la epidermis, los sistemas vascular y linfático invaden la dermis junto con apéndices como folículos pilosos, terminaciones nerviosas y glándulas secretoras. El tipo de célula principal de la dermis es el fibroblasto. El tejido conectivo de la dermis incluye fibroblastos y matriz extracelular (MEC). La MEC está formada por colágenos,

glicoproteínas, proteoglicanos (PG) y glicosaminoglicanos (GAG). Entre los marcadores de la MEC se encuentra la decorina (DCN), un PG que desempeña un papel importante en la fibrillogénesis del colágeno y la regulación directa del crecimiento celular [11]. Por otra parte, los fibroblastos son las células encargadas de producir las proteínas de la matriz extracelular como el colágeno la fibronectina y elastina que contribuyen a la sustancia principal de la dermis y son responsables de la elasticidad y resistencia a la tracción de la piel. Entre los colágenos que se encuentran en la dermis hay, fundamentalmente, colágeno tipo I (75-85%), tipo III (15%) y tipo V (2-4%), aunque también existen los tipos IV, VI y VII. El colágeno tipo I es el más abundante y se encuentra organizado en una densa red ortogonal en la dermis reticular. La fuerza tensora de la dermis se debe principalmente a este colágeno tipo I y, proporcionalmente en menor medida, al colágeno tipo III. Las fibras de colágeno tipo III, anteriormente denominadas reticulina, se encuentran principalmente situadas en la dermis papilar [3]. Los colágenos fibrosos son específicamente degradados por las metaloproteinasas (MMP), una familia de enzimas cuya función principal es degradar matriz extracelular. Cada MMP degrada distintos componentes, por ejemplo, la MMP1 (colagenasa) escinde los tipos de colágeno I, II y III, mientras que la MMP9 (gelatinasa) degradan el colágeno de los tipos IV, V y la gelatina [12].

1.1.3 Hipodermis

Finalmente, la capa más profunda de la piel es la hipodermis, también conocida como tejido celular subcutáneo o panículo adiposo, y constituida por adipocitos, células encargadas de fabricar y almacenar grasas [3]. Además del tejido adiposo, esta capa contiene apéndices como los folículos pilosos, las neuronas sensoriales y los vasos sanguíneos. Su principal función es el aislamiento térmico y la protección frente a los traumatismos de los órganos internos [2].

1.2 ESPECTRO DE RADIACIÓN SOLAR

Las radiaciones emitidas por el sol se desglosan en la Figura 4. Estas, deben penetrar la capa de ozono hasta llegar a la superficie terrestre. Así pues, la radiación que llega a la tierra está compuesta por aproximadamente un 9% de radiación ultravioleta (UV), un 50% de luz visible y un 40% de radiación infrarroja (IR)[13].

La gama completa de rayos UV está compuesta por UVC (100–290 nm), que son detenidos por la capa de ozono, UVB (290–320 nm) y UVA (320–400 nm). Dentro de la UVA, se incluyen la UVA2 o de onda corta (320–340 nm) y UVA1 o de onda larga (340–400 nm). Los rayos ultravioleta que pueden alcanzar la superficie terrestre son una combinación de rayos UVB y UVA, siendo los más energéticos los UVB, ya que a menor longitud de onda, más energética la radiación [14]. Los rayos UVA representan la gran mayoría de los rayos UV recibidos en la tierra (alrededor del 95%), pero la relación UVA/UVB varía según los factores orbitales y ambientales. Los factores orbitales incluyen latitud, estación y hora del día. El ángulo de elevación solar, el ángulo entre el horizonte y el sol influyen en gran medida en la irradiación UV: cuanto más alto es el sol, mayor es el contenido de UVB. Entre los factores ambientales que afectan la irradiación ultravioleta se incluyen las nubes y el espesor de la capa de ozono, que influyen en gran medida en la cantidad de UVB que llega al nivel del suelo, así como en los contaminantes, aerosoles o el reflejo de los rayos ultravioleta del suelo. Debido a sus propiedades energéticas, los rayos UVA se ven menos afectados por estos factores orbitales y ambientales y varían en menor medida que los UVB. Por tanto, la relación UVA/UVB depende en gran medida de todos los factores citados anteriormente [15]. Las altas propiedades de penetración del UVA hacen que puedan atravesar hasta la dermis profunda, mientras que los UVB solo alcanzan la epidermis [14].

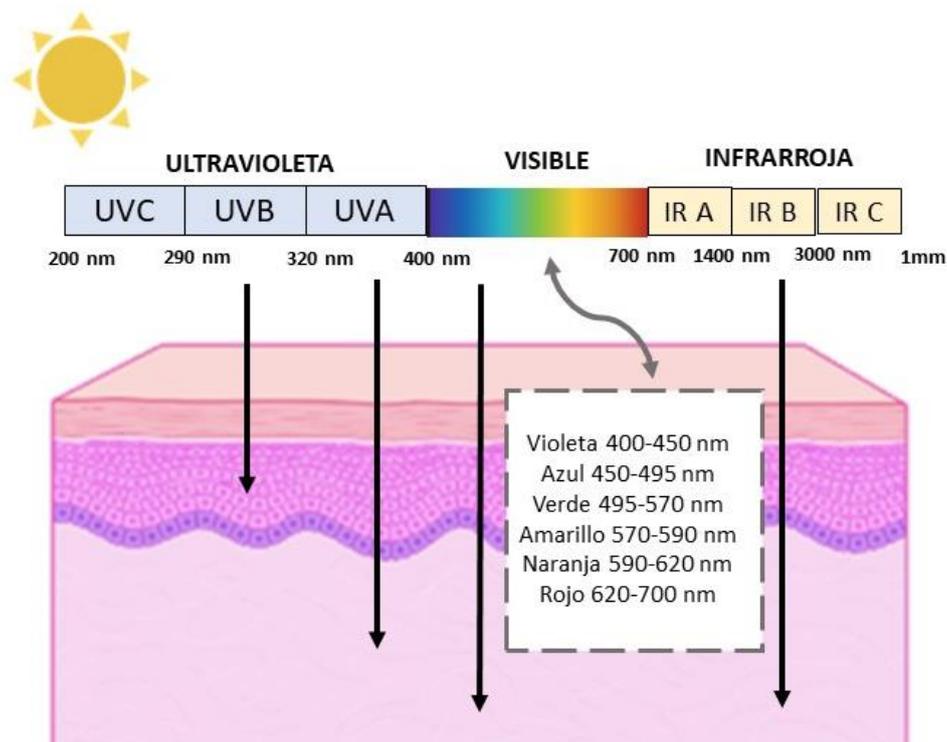


Figura 4. Longitudes de onda del espectro solar y su penetración en las capas de la piel. *Figura creada con Biorender.*

Por otra parte, se encuentra el espectro de la luz visible (VIS), que compone las longitudes de onda entre los 400 y 700 nm (Figura 4). Es la parte de la radiación electromagnética responsable de la iluminación y es visible para el ojo humano. Cada color de luz representa una longitud de onda diferente, con el azul en el extremo más corto del espectro y el rojo en el extremo más largo [13]. Las longitudes de onda comprenden el azul (400–495 nm), verde (495–590 nm) y rojo (590–700 nm). El VIS penetra en las partes más profundas de la dermis llegando a los diferentes tipos de células de la piel [16].

Por último, se encuentra La radiación infrarroja (IR) que consta de longitudes de onda de 700 nm a 1 mm y se subdivide en tres regiones de longitud de onda creciente, IR-A (700–1400 nm), IR-B (1400–3000 nm) e IR-C (3000 nm–1 mm). La radiación IR-A puede penetrar las tres capas de la piel y es la principal causante del efecto térmico [17].

1.3 EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA RADIACIÓN SOBRE LA PIEL

1.3.1 Estrés Oxidativo

Los rayos UV son los principales iniciadores de la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en la piel. La generación de ROS después de la irradiación con UVA y UVB requiere la absorción de fotones por moléculas fotosensibilizadoras endógenas, como citocromos, riboflavina y porfirina. El fotosensibilizador excitado reacciona posteriormente con el oxígeno, lo que da como resultado la generación ERO [18]. Las principales especies reactivas del oxígeno producidas son los radicales hidroxilo (HO), superóxido (O_2^-), oxígeno singlete (O^2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y peróxidos orgánicos (ROOH). Además del daño directo a moléculas como lípidos, aminoácidos y ADN, las ERO pueden activar respuestas celulares enzimáticas y no enzimáticas, con el potencial de modificar otros procesos que terminan interfiriendo con expresión génica [19]. El daño inducido por espectro UV conduce también a la disfunción mitocondrial que posteriormente puede aumentar la producción de ERO. Esto conduce a un círculo vicioso continuo en el que la generación de ERO puede provocar más daño en el ADN mitocondrial [20].

Los antioxidantes son sustancias que se combinan para neutralizar las ERO evitando el daño oxidativo de las células y los tejidos. El sistema antioxidante cutáneo consta de sustancias enzimáticas y no enzimáticas. Entre los antioxidantes enzimáticos se pueden destacar la glutatión peroxidasa 1 (GPX1), la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD) [19]. Otro de los contribuyentes al potencial antioxidante de la célula es el tripéptido glutatión (GSH) que actúa como antioxidante gracias a su grupo tiol. El GSH es oxidado por radicales de oxígeno y forma un dímero con otro GSH activado mediante la formación de un enlace disulfídico (GSSG), convirtiéndolo en un desintoxicante de ERO [21]. Por otra parte, en respuesta a la presencia excesiva de ERO, se activan una variedad de factores de transcripción, incluido el factor nuclear kappa B (NF- κ B), la proteína activadora 1 (AP-1), el factor nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf2) y la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK).

El factor de transcripción Nrf2 es un importante transactivador de genes citoprotectores en respuesta al estrés oxidativo (Figura 5). Bajo condiciones fisiológicas normales, Nrf2 se encuentra inactivo en el citoplasma y unido a su represor la proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (keap1) que impide la traslocación de Nrf2 al núcleo y promueve su degradación [22]. Ante un estímulo oxidativo, Nrf2 se activa y se

separa de Keap1 para viajar al núcleo celular, donde se une a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) presentes en los promotores de los genes para inducir la detoxificación de fase II. La activación de Nrf2 induce la expresión de las principales enzimas de defensa antioxidante, que incluyen NAD(P)H quinona oxidoreductasa (NQO1), encargada de desactivar quinonas reactivas, glutatión S-transferasas, ferritina, peroxirredoxina y hemoxygenasa 1 (HO1) que produce la bilirrubina antioxidante altamente efectiva y estimula la producción de ferritina, reduciendo así la cantidad de hierro libre [23]. El aumento del nivel de HO1 puede elevar los niveles celulares de hierro que pueden promover una mayor generación de ROS [24]. Entre las rutas activadas por Nrf2, la activación de NF- κ B y AP-1 contribuye a la inducción de metaloproteinasas por parte de los fibroblastos dérmicos, dando lugar a la degradación de la matriz extracelular [25].

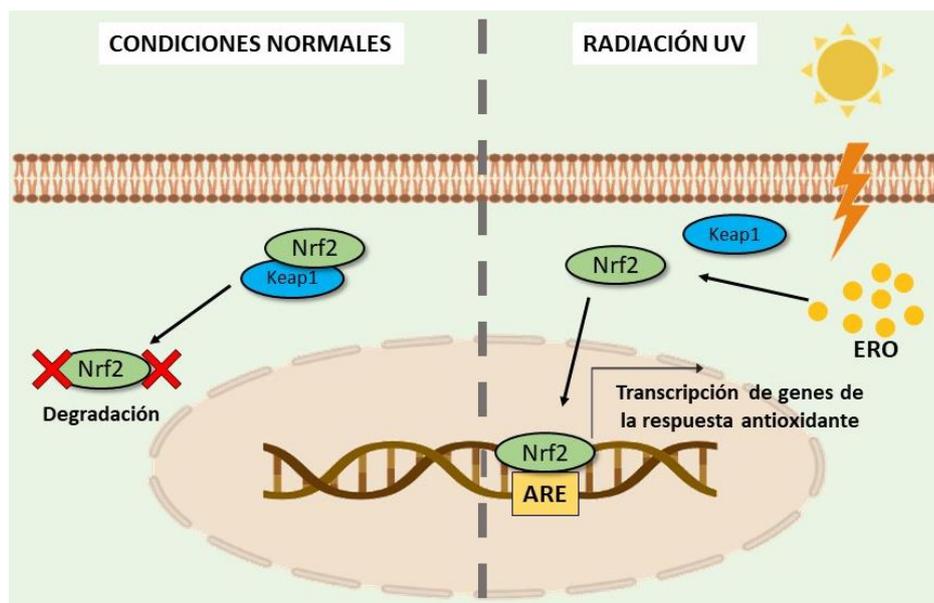


Figura 5. Activación de la ruta de transcripción de Nrf2. Figura creada con Biorender. Abreviaturas: ERO: Especies reactivas de oxígeno. Nrf2: factor nuclear derivado de eritroide 2, Keap1: proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch. ARE: Elementos de respuesta antioxidante.

1.3.2 Inflamación

La radiación activa la respuesta inflamatoria en la piel y está mediada principalmente por vías de señalización NF- κ B y STAT3. El eritema solar es una respuesta inflamatoria de la piel que aparece a las pocas horas de la exposición solar y alcanza su máxima

intensidad a las 12-24 horas (Figura 6). En casos extremos de exposición puede llegar a convertirse en una quemadura solar de 1º o 2º grado superficial, con formación de ampollas. Este tipo de reacción se utiliza como sistema de medida del efecto biológico de los rayos ultravioleta y ha hecho definir el concepto de dosis eritematosa mínima (DEM) como la mínima dosis de exposición a una determinada banda de luz que provoca eritema uniforme y con límites bien definidos en la piel.

La reacción inmediata inflamatoria frente al daño solar incluye la liberación de citocinas inflamatorias por parte de los queratinocitos, incluyendo las IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), entre otros factores estimulantes. La IL-1 está producida constitutivamente por queratinocitos en el estrato córneo [26] y se libera como respuesta primaria a varios estímulos. También induce la liberación de mediadores secundarios, como IL-6 e IL-8. La IL-6 estimula la proliferación de queratinocitos y se estudia en enfermedades asociadas a la hiperplasia epidérmica y en la cicatrización de heridas, mientras que IL-8 promueve la migración de células dendríticas y el reclutamiento de monocitos y neutrófilos como pasos clave en la fase de inicio de la inflamación de la piel [27, 28]. Estas citoquinas secundarias, desencadenan la inducción de otras citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y sus receptores, con amplias implicaciones para la respuesta inflamatoria. Otros efectos inducidos por la radiación, como las lesiones en el ADN y la liberación de ERO, también contribuyen a la amplificación de la respuesta inflamatoria [24].

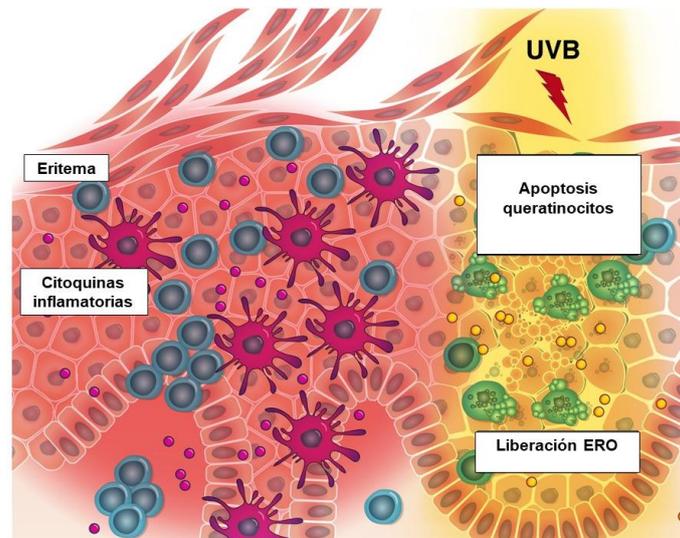


Figura 6. Reacción eritematosa en la epidermis tras exposición a UVB. Figura adaptada de referencia [29]

1.3.3 Fotoenvejecimiento

El fotoenvejecimiento se caracteriza por una serie de cambios en la piel inducidos por la exposición a la luz y los rayos ultravioleta. Tanto los rayos UVA como los UVB parecen estar implicados en el proceso de fotoenvejecimiento, aunque los rayos UVA son los principales contribuyentes porque penetran más profundamente en la dermis, son más abundantes e inducen un incremento en el estrés oxidativo que daña la piel. Los cambios microscópicos en la piel fotodañada afectan la epidermis y la dermis y se pueden observar en la Figura 7. Los cambios epidérmicos incluyen atrofia y adelgazamiento de la capa espinosa y aplanamiento de la unión dermoepidérmica (pérdida de las crestas epidérmicas), o engrosamiento epidérmico y acantosis. Por otra parte, en la dermis, hay una degradación excesiva de la matriz debido al aumento de las MMP y una destrucción de las fibras de colágeno y elastina, denominada como elastosis solar. La elastosis se caracteriza por una deposición de masas de tejido elástico anormalmente engrosado y fragmentado. Se ha sugerido que las alteraciones y deficiencias de colágeno, el principal componente estructural de la piel, son la causa de las arrugas cutáneas observadas tanto en la piel fotoenvejecida como en la envejecida naturalmente [17, 30].

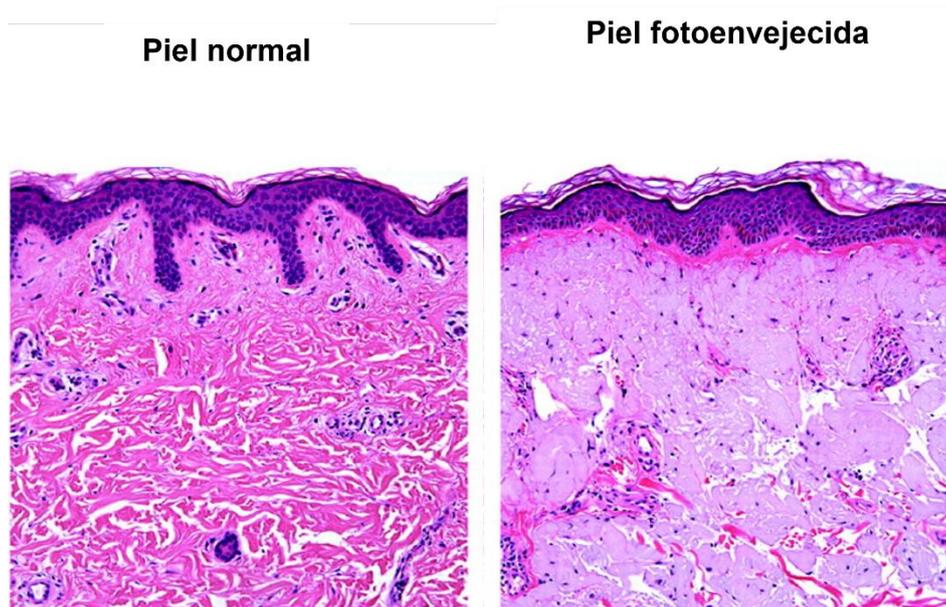


Figura 7. Cortes histológicos de piel normal y envejecida. Figura adaptada de referencia [31].

1.3.4 Fotocarcinogénesis

El riesgo de carcinogénesis cutánea después de exposiciones repetidas a la luz UV está bien establecido. La radiación UVB daña directamente el ADN. Si este daño en el ADN no se repara adecuadamente, puede dar lugar a mutaciones, daño mitocondrial, cascada inflamatoria, inmunosupresión, oxidación de proteínas y lípidos y fotoenvejecimiento [32].

La radiación UVB es la que más contribuye a la fotocarcinogénesis. Frente a esta exposición, la piel activa mecanismos de protección para reducir el daño. Entre los mecanismos se encuentran una mayor producción de melanina que se transfiere a los queratinocitos para formar un escudo sobre el ADN nuclear y un mayor grosor del estrato córneo para reducir la transmisión de rayos UV a través de la piel. No obstante, las bases de ADN absorben directamente fotones dentro del rango UVB, lo que da lugar a la formación de lesiones. Las lesiones más frecuentes son los dímeros ciclobutánicos de pirimidina (CPD), que se forman principalmente entre los enlaces 5 y 6 de las pirimidinas de timina y citosina adyacentes. La forma más común de CPD son los dímeros de timina (T-T), que dan lugar a mutaciones. Por otra parte, los dímeros de timina-citosina y los dímeros de citosina-citosina son altamente mutagénicos. La radiación UV también daña indirectamente el ADN a través de la absorción de fotones

por cromóforos. La energía de los fotones absorbidos puede transferirse al ADN en una reacción de fotosensibilidad indirecta, y contribuir a la formación de dímeros de pirimidina [32]. Asimismo, el daño al ADN también puede darse de forma indirecta mediante estrés oxidativo. La exposición a la radiación UV aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), que se dirigen principalmente a la guanina en el ADN. Esta reacción genera una fotolesión por oxidación dando lugar al fotoproducto 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-OHdG). La 8-OHdG se utiliza como biomarcador del daño del ADN por estrés oxidativo [33].

Las mutaciones inducidas por el daño solar suelen afectar al gen p53. En circunstancias normales, p53 responde al daño del ADN bloqueando la progresión del ciclo celular. Tras la radiación UV los niveles génicos de p53 aumentan y se produce su activación. Los niveles elevados de p53 conducen a la inducción de p21 (también conocida como WAF1 o CIP1), que es responsable de la inhibición de la apoptosis y de la detención del ciclo celular en la fase G1 a través de las quinasas dependientes de ciclina (CDK). Al inhibir la progresión del ciclo celular, se activan los mecanismos de reparación del ADN. En los casos en los que el daño es mayor y no puede repararse, p53 induce a la apoptosis celular. Por tanto, cuando las mutaciones afectan a p53, el gen mutado pierde su capacidad para inducir la apoptosis en los queratinocitos dañados, y como resultado estas células pueden convertirse en cancerosas y dar lugar al desarrollo de cáncer de piel [34, 35].

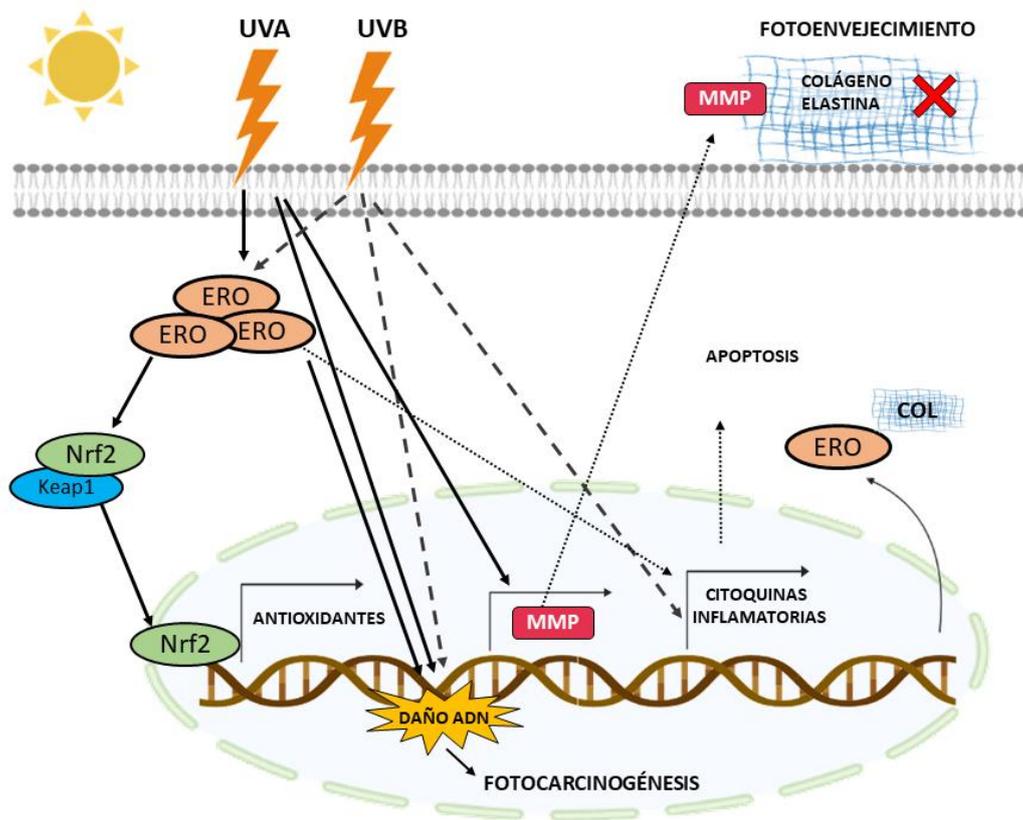


Figura 8. Principales efectos de la radiación ultravioleta en la piel. *Figura creada con Biorender.* Abreviaturas: ERO: Especies reactivas de oxígeno, MMP: Metaloproteinasas, COL: Colágeno. Nrf2: factor nuclear derivado de eritroide 2, Keap1: proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch.

Como se observa en la Figura 8, los efectos producidos por la radiación, estrés oxidativo, inflamación, fotocarcinogénesis y fotoenvejecimiento, se han estudiado en profundidad los últimos años para intentar determinar qué radiaciones del espectro contribuyen más a los efectos solares dañinos. A continuación, se describen los efectos específicos de cada luz solar.

1.3.5 Efectos biológicos de la radiación ultravioleta en la piel

La exposición solar ultravioleta (UV) es uno de los factores ambientales más importantes que afectan la fisiología de la piel. La exposición de la piel humana a los rayos UV solares puede tener consecuencias a corto y largo plazo. Aunque los rayos UVB muestran efectos beneficiosos como la producción de varios péptidos

antimicrobianos y son responsables de la producción de vitamina D, son más energéticos que los rayos UVA, y, por tanto, pueden dañar directamente el ADN de los queratinocitos induciendo la mutagénesis. La radiación UVB es, a largo plazo, la principal contribuyente de la fotocarcinogénesis. Los rayos UVB inducen una cascada de citocinas, mediadores vasoactivos y neuroactivos en la piel que, en conjunto, provocan una respuesta inflamatoria y provocan eritema y quemaduras solares. Si la dosis de UV supera un umbral de respuesta al daño, los queratinocitos activan las vías apoptóticas y mueren. Dichos queratinocitos apoptóticos pueden identificarse histológicamente por sus núcleos picnóticos y se conocen como células quemadas por el sol, del inglés “sunburn cells” [36]. Por otra parte, los rayos UVA penetran más profundamente en la piel y son los principales responsables de la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y, en menor medida que los rayos UVB, también pueden generar daños en el ADN. Pueden llegar a la dermis profunda, inducir daño dérmico y, a largo plazo, son los principales causantes del fotoenvejecimiento [15].

1.3.6 Efectos biológicos del espectro visible en la piel

La terapia LED es hoy en día un procedimiento cosmético aprobado por la Administración de fármacos y Alimentos de los EE. UU. (FDA), por su capacidad de modular el estrés oxidativo, inducción de factores de transcripción, alteración de la síntesis de colágeno, estimulación de la angiogénesis y aumento flujo sanguíneo. La luz LED se ha empleado como terapia frente al fotoenvejecimiento y frente al acné, así como en el tratamiento de la psoriasis y rosácea [37–41]. Aunque se haya usado el espectro VIS en terapia durante mucho tiempo, las investigaciones más recientes confirman que el VIS artificial induce estrés oxidativo y daños tisulares causando signos de fotoenvejecimiento temprano [42, 43]. Desde que nos convertimos en una sociedad industrializada, hemos introducido luces artificiales para extender el tiempo de “luz del día”, impactando en nuestro ritmo circadiano natural. El ritmo circadiano es un mecanismo conservado que nos ha ayudado a evolucionar y ajustarnos a nuestro entorno para poder sobrevivir. La alteración del ritmo circadiano por la contaminación lumínica tiene efectos en la salud. A este factor se le suma la exposición prolongada a

la luz LED de los dispositivos electrónicos. Estos dispositivos suponen otra fuente de luz, principalmente azul [16]. En concreto, la exposición a la luz azul artificial induce estrés oxidativo, puede alterar las actividades de las metaloproteinasas, disminuir la producción de colágeno, ejerce efectos antiproliferativos e interrumpe la barrera de permeabilidad epidérmica [44]. También induce la liberación de mediadores inflamatorios (IL-1 α , IL-6, IL-8 y TNF- α) [16]. No obstante, cabe destacar que las exposiciones a la luz azul a corto plazo no causan ningún efecto perjudicial significativo en la piel [45].

1.3.7 Efectos biológicos de la radiación infrarroja en la piel

La radiación infrarroja (IR) también se ha empleado en la práctica dermatológica, aunque sus efectos sólo se conocen en parte. A las dosis empleadas en terapias para el tratamiento de la queratosis actínica y el acné no causa daño en el ADN dérmico y epidérmico, inflamación o signos de fotoenvejecimiento, aunque si induce el aumento de la vacuolización de los queratinocitos epidérmicos [46]. Dado que casi la mitad de la energía solar que llega a la superficie de la tierra está en el rango IR, se espera que tenga efectos biológicos significativos en la piel humana. El calor es una forma de energía que puede transmitirse por radiación IR, lo que provoca un aumento de la temperatura de la piel. Se ha observado que la temperatura de la piel humana puede aumentar a más de 40 °C bajo la irradiación IR directa debido a la conversión de IR en calor. Existe evidencia clínica que indica que la exposición crónica al calor de la piel humana puede producir alteraciones [17].

Entre los efectos moleculares, se ha visto que la IR sobre la piel induce la producción de citoquinas inflamatorias en fibroblastos dérmicos, que a su vez regulan el metabolismo de las proteínas de la matriz extracelular en la piel humana. La exposición de la piel humana a la radiación IR estimula la expresión de MMP-1 y disminuye la expresión de procolágeno tipo I *in vivo*, factores que pueden conducir al envejecimiento prematuro de la piel, al igual que la radiación UV. Además, la energía térmica, que aumenta la temperatura de la piel, también aumenta las metaloproteinasas MMP1, 3 y 12, y modula la síntesis de elastina y fibrilina, lo que da

como resultado el desarrollo de elastosis solar. El choque térmico agudo en la piel humana estimula la formación de nuevos vasos, recluta células inflamatorias y causa daño oxidativo en el ADN, por lo que en base a estas observaciones, se puede concluir que la radiación IR y el calor son estímulos físicos importantes que pueden causar envejecimiento en la piel humana [17, 18].

1.4 PROTECTORES SOLARES

A efectos del artículo 1, apartado 1, de la Directiva 76/768/CEE del Consejo, de 27 de julio de 1976, los protectores solares son productos cosméticos cuya función es proteger la piel frente a las radiaciones solares [47]. Estos productos, además de incluir filtros ultravioleta, contienen otras sustancias que pueden ser emolientes, preservativos, emulsificadores, fragancias y compuestos colorantes [35].

El protector solar se comercializó por primera vez en los Estados Unidos en 1928 y se ha expandido en todo el mundo como parte integral de la estrategia de fotoprotección. Se ha descubierto que previene y minimiza los efectos negativos de la luz ultravioleta en función de su capacidad para absorber, reflejar y dispersar los rayos solares [35]. El nivel de protección solar se ha estimado tradicionalmente mediante pruebas *in vivo*, como el factor de protección solar SPF, que especifica la potencia de protección contra el eritema inducido por UVB después de una sola exposición a la radiación solar simulada, según lo determinado por la comisión europea y la FDA. Por tanto, el SPF se define como la energía UV requerida para producir una dosis mínima de eritema (DEM) en la piel tras la aplicación de 2 mg/cm² de la formulación del producto de protección solar, dividida por la energía UV requerida para producir un DEM en la piel sin protección solar [48]. La DEM en la piel humana se define como la dosis UV más baja que produce eritema perceptible en la zona de exposición UV, entre 16 y 24 horas después de la exposición [49]. EL SPF se etiqueta en cifras hasta 50 y si está por encima, como SPF50+. Por otro lado, en 1996, la Asociación de la Industria Cosmética de Japón (JCIA) desarrolló el método de oscurecimiento persistente del pigmento (PPD) para evaluar la eficacia de los protectores solares contra los rayos UVA, método que ha sido aprobado por la Asociación Europea de la Industria

Cosmética (COLIPA) [35]. El método consiste en evaluar el oscurecimiento inmediato del pigmento como resultado de la fotooxidación de la melanina preexistente y de sus precursores, entre 2 y 24 h después de la exposición a UVA artificial en voluntarios con fototipos de piel tipo III y IV [48, 50]. El método PPD se etiqueta como PA+, con hasta 3 símbolos positivos en función del grado de protección. En Europa, los productos deben alcanzar una proporción de 1:3 de factor de protección UVA:SPF [51]. No obstante, pese a la existencia de ambos protocolos, se ha señalado que no reflejan el amplio espectro de fotoprotección porque no tiene en cuenta la importancia del impacto de todos los tipos de radiación [52, 53].

1.4.1 Filtros ultravioleta

Los filtros se pueden clasificar entre inorgánicos y orgánicos, en función de sus mecanismos de acción (Figura 9). Los inorgánicos absorben la radiación UV, pero su principal mecanismo de acción es la dispersión y reflexión de la radiación UV incidente, mientras que los filtros orgánicos absorben la radiación ultravioleta de alta energía. Los filtros orgánicos contienen cromóforos, moléculas aromáticas conjugadas con grupos carbonilo, capaces de absorber la radiación incidente y distribuirla como calor o luz. La mayoría de los filtros inorgánicos absorben todo el espectro de radiación UVB, pero los filtros UVA no cubren todo el espectro, sino que pueden ser más específicos del rango UVA1 o UVA2. También existen los protectores solares de amplio espectro, que son capaces de absorber tanto radiación UVA como la UVB. Por lo general, en un producto se combinan varios filtros con la finalidad de lograr una protección de amplio espectro y un alto factor de protección solar [54].

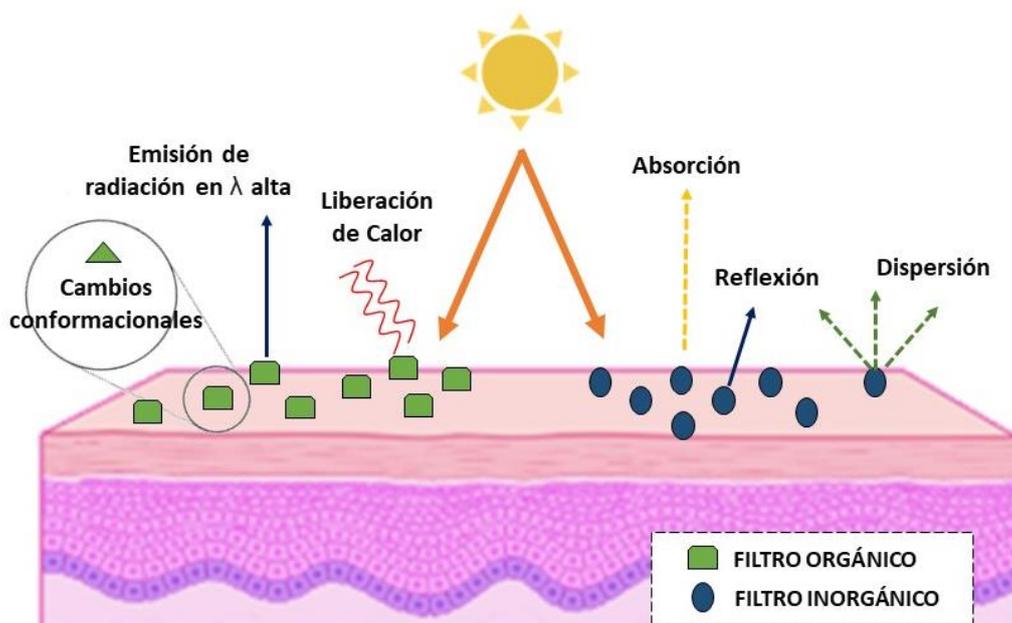


Figura 9. Mecanismo de acción de los protectores solares orgánicos e inorgánicos. Figura creada con Biorender.

En la Unión Europea, los filtros UV utilizados en productos de protección solar están regulados como ingredientes de productos cosméticos [55]. Actualmente, existen 32 filtros aprobados por la unión europea para su uso en la formulación de protectores solares. En la tabla 1 se muestra la lista de filtros adaptada del Anexo VI del Reglamento (CE) nº 1223/2009 del Parlamento Europeo [56].

Tabla 1. Lista de filtros solares aprobados por la Comisión Europea. Adaptada de la lista de filtros UV permitidos en productos cosméticos del Anexo VI del Reglamento (CE) nº 1223/2009 del Parlamento Europeo [56].

Nombre del glosario de ingredientes comunes	Nombre químico/ IUPAC	Concentración final máxima
METOSULFATO DE BENZALCONIO DE ALCANFOR	N,N,N-trimetil-4-(2-oxoborn-3-ilidenmetil) anilinio metilsulfato	6%
HOMOSALATO	Ácido benzoico, 2-hidroxi-, 3,3,5-trimetilciclohexil éster / Homosalato	10%
BENZOFENONA-3	2-hidroxi-4-metoxibenzofenona/oxibenzona	6%
ÁCIDO FENILBENZIMIDAZOL SULFÓNICO	2-fenilbencimidazol-5-sulfónico y sus sales de potasio, sodio y trietanolamina / Ensulizol	8% (como ácido)
ÁCIDO SULFÓNICO TEREPTALILIDENO DICAMFORO	3,3'-(1,4-fenilendimetileno) bis (7,7-dimetil-2-oxobiciclo-[2.2.1] hept-1-ilmetanosulfónico) y sus sales / Ecamsule	10% (como ácido)

METOXIDIBENZOILMETANO DE BUTILO	1-(4-terc-Butilfenil)-3-(4-metoxifenil) propano-1,3-diona/Avobenzona	5%
ÁCIDO SULFONICO DE BENZILIDENO ALCANFOR	ácido alfa-(2-oxoborn-3-ilideno) tolueno-4-sulfónico y sus sales	6% (como ácido)
OCTOCRILENO	Éster 2-etilhexílico del ácido 2-ciano-3,3-difenilacrílico / octocrileno	10% (como ácido)
ALCANFOR DE POLIACRILAMIDOMETILBENCILIDENO	Polímero de N-((2 y 4)-[(2-oxoborn-3-ilideno)metil]bencil)acrilamida	6%
METOXICINAMATO DE ETILHEXILO	4-metoxicinamato de 2-etilhexilo/octinoxato	10%
PEG-25 PABA	Etil-4-aminobenzoato etoxilado	10%
ISOAMYL P-METOXICINAMATO	Isopentil-4-metoxicinamato / Amiloxato	10%
ETILHEXIL TRIAZONA	2,4,6-trianilino-(p-carbo-2'-etilhexil-1'-oxi)-1,3,5-triazina	5%
DROMETRIZOL TRISILOXANO	Fenol, 2-(2H-benzotriazol-2-il)-4-metil-6-(2-metil-3-(1,3,3,3-tetrametil-1-(trimetilsilil)oxi)-disiloxanil) propilo	15%
DIETILHEXIL BUTAMIDO TRIAZONA	Ácido benzoico, 4,4-[[[6-[[[(1,1-dimetiletil) amino]carbonil]fenil]amino]-1,3,5-triazina-2,4-diil]diimino} bis-, bis (2-etilhexil) éster / iscotrizinol	10%
4-METILBENCILIDENO ALCANFOR	3-(4'-Metilbencilideno)-dl-alcanfor / Enzacameno	4%
SALICILATO DE ETILHEXILO	Salicilato de 2-etilhexilo / octisalato	5%
ETILHEXIL DIMETIL PABA	4-(dimetilamino) benzoato de 2-etilhexilo / padimato O	8%
BENZOPHENONE-4; BENZOPHENONE-5	Ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfónico (benzofenona-5) y su sal de sodio / Sulisobenzona	5% (como ácido)
METILENO BIS-BENZOTRIAZOLILO TETRAMETILBUTILFENOL	2,2'-Metileno bis(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenol) / Bisoctrizol	10%
METILENO BIS-BENZOTRIAZOLYL TETRAMETILBUTILFENOL (NANO)	Metileno Bis-Benzotriazolil Tetrametilbutilfenol (nano)	10%
TETRASULFONATO DE FENIL DIBENZIMIDAZOL DISÓDICO	Sal sódica del ácido 2,2'-bis(1,4-fenileno)-1H-benzimidazol-4,6-disulfónico / Bisdisulizol disódico (USAN)	10% (como ácido)
BIS-ETILHEXILOXIFENOL METOXIFENIL TRIAZINA	2,2'-(6-(4-Metoxifenil)-1,3,5-triazina-2,4-diil) bis(5-((2-etilhexil) oxi)fenol) / Bemotrizinol	10%
POLISILICONA-15	dimeticodietilbenzalmalonato	10%
DIÓXIDO DE TITANIO	Dióxido de titanio	25%
DIÓXIDO DE TITANIO (NANO)	Dióxido de titanio (nano)	25%
BENZOATO DE DIETILAMINO HIDROXIBENZOILO HEXILO	Ácido benzoico, 2-[4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoil]-, hexilester	10%
TRIS-BIFENIL TRIAZINA / TRIS-BIFENIL TRIAZINA (NANO)	1,3,5-triazina, 2,4,6-tris(1,1'-bifenil)-4-il-, incluso como nanomaterial	10%
ÓXIDO DE ZINC	Óxido de zinc	25%
ÓXIDO DE ZINC (NANO)	Óxido de zinc (nano)	25%
FENILENO BIS-DIFENILTRIAZINA	3,3'-(1,4-Fenileno) bis(5,6-difenil-1,2,4-triazina)	5%

ETOXIETILCIANACETATO DE METOXIPROPILAMINO CICLOHEXENILIDENO	(2Z)-2-ciano-2-[3-(3-metoxipropilamino) ciclohex-2-en-1-ilidenacetato de 2-etoxietilo	3%
--	---	----

Los bloqueadores solares inorgánicos más utilizados actualmente son el dióxido de titanio (TiO₂) y óxido de zinc (ZnO). Este tipo de bloqueadores físicos ofrecen protección amplia frente a los rayos UVA y UVB y son populares por su menor penetración en la epidermis viva y, por lo que tienen un menor riesgo de inducir reacciones alérgicas por contacto, haciéndolos más adecuados para pieles sensibles. Su capacidad de dispersar la luz da como resultado formulaciones con tendencia a dejar un tono blanquecino en la piel haciéndolos menos agradables cosméticamente [57, 58]. El óxido de zinc protege contra una amplia gama de rayos UVA, incluidos los rayos UVA 1, es muy fotoestable y no reacciona con otros filtros UV. Es más efectivo que el dióxido de titanio para la protección UVA; sin embargo, es menos eficaz contra la radiación UVB. El dióxido de titanio protege contra los rayos UVA 2 y UVB, pero no protege contra los rayos UVA 1, como lo hace el óxido de zinc [59]. Actualmente, varios de los protectores solares que hay en el mercado tienen filtros inorgánicos con formas micronizadas o nanopartículas que pueden llegar hasta a ser de un tamaño de 100 nm [60].

Entre los bloqueadores orgánicos más usados se encuentran, en primer lugar, el octocrileno, un filtro UVB soluble en aceite, muy seguro y asociado con una menor probabilidad de irritación, fototoxicidad y potencial fotoalérgico. Cuando se combina con otros absorbentes de UV, puede aumentar la fórmula SPF y la fotoestabilidad, como en el caso de su combinación con el metoxidibenzoilmetano de butilo (avobenzona). En segundo lugar, la avobenzona, presenta una alta eficacia frente a los rayos UVA y es ampliamente utilizada en el comercio actual, aunque, desafortunadamente, es propensa a la fotoinestabilidad. En tercer lugar, se encuentran los salicilatos y triazinas. Los derivados de salicilato son filtros fotoestables que bloquean principalmente los rayos UVB y tienen un largo historial de uso. Son excelentes solubilizantes para filtros UV cristalinos como la avobenzona; sin embargo, la eficiencia de absorción de estos filtros es bastante baja. El homosalato es uno de los salicilatos más comunes y se usa para aumentar los efectos de otros filtros UVB,

disminuyendo la fotodegradación. Las triazinas por su parte, son solubles en grasa, fotoestables y facilitan la disipación de la radiación como calor intramolecular. Por otra parte, se encuentran los cinamatos, de los cuales el más común es el metoxicinamato, un absorbente de UVB ampliamente utilizado, cuya eficacia puede aumentar cuando es encapsulado en microesferas de polimetilmetacrilato. Sin embargo, uno de los mayores inconvenientes que tiene es su incompatibilidad con la avobenzona. No obstante, se está reduciendo el uso de los metoxicinamatos, y de otros filtros como el homosalato por su efecto como disruptores endocrinos. Por último, en desuso se encuentran filtros como los para-amino benzoatos (PABA), que fueron uno de los primeros filtros UV que aparecieron en EE. UU y las benzofenonas, como la benzofenona-3 que absorbe principalmente UVB y UVA2, considerándose un filtro de amplio espectro. Recientemente se ha comprobado que distintos filtros como el octocrileno, la benzofenona-3, el 3-bencilideno alcanfor y las nanopartículas de TiO₂ pueden causar daños al medio ambiente marino, debido a su uso generalizado en los centros turísticos. Entre los efectos negativos se incluyen la bioacumulación de filtros en especies diferentes, cambios hormonales y alteración endocrina en peces, desarrollo anormal en erizos de mar y blanqueamiento de corales. Por ello, algunos protectores solares que contienen filtros UV como benzofenona-3 se prohibieron en Hawai desde el 1 de enero de 2021 por su presunto daño a los arrecifes de coral y la vida marina [51, 59–65].

Cabe destacar que no existe un solo filtro solar disponible en la actualidad que por sí solo pueda proporcionar una protección de amplio espectro y alto SPF sin inconvenientes estéticos. Los productos de protección solar requieren la combinación correcta de filtros en la formulación para obtener una alta eficacia en la protección UV y una estética óptima para mejorar su rendimiento. En ocasiones, se incluyen en la formulaciones compuestos potenciadores con la finalidad de aumentar la eficacia del protector alcanzando un mejor rendimiento del filtro UV a menores concentraciones [66]. Esto permite disminuir el efecto medioambiental sin reducir la protección de la piel frente a la radiación solar. La tendencia del mercado es utilizar cada vez más este tipo de potenciadores, para ser lo más ecosostenibles posibles y reducir el impacto sobre la vida marina.

1.4.2 Productos biológicos empleados en fotoprotección.

En los últimos años, se ha incluido agentes antioxidantes, osmolitos y enzimas reparadoras del ADN, que ayudan a limitar el daño de la piel inducido por la radiación solar. Es por ello que la fotoprotección de sustancias naturales ha ganado una atención considerable debido a su amplia gama de actividades biológicas [24]. Como el estrés oxidativo es uno de los efectos producidos por la exposición a la luz solar, la aplicación de antioxidantes es una estrategia práctica para la protección UV de la piel [67]. Algunos metabolitos de extractos botánicos poseen capacidades antioxidantes y de absorción de rayos UV. Entre los antioxidantes empleados se encuentran la vitamina C, vitamina E y extractos de plantas como compuestos fenólicos, carotenoides y flavonoides [39]. De hecho, una gran cantidad de productos botánicos han sido aprobados como agentes inactivos para conservar, emulsionar, humectar y suavizar la protección solar para proteger aún más la piel. Entre ellos se encuentran extractos de aloe vera, tomate, granada, té verde y pepino entre otros [25, 35, 68].

1.5 ACTIVACIÓN DE LA RUTA DE NRF2 EN FOTOPROTECCION

Como se ha introducido en anteriores apartados, el factor de transcripción Nrf2 orquesta los principales mecanismos de defensa celular, incluida la desintoxicación de fase II, la señalización inflamatoria, la reparación del ADN y la respuesta antioxidante, y la evidencia experimental de los últimos años, respalda el importante papel de Nrf2 en la piel. Por esta razón, Nrf2 se ha considerado como un objetivo molecular prometedor para la prevención farmacológica de patologías humanas resultantes de la exposición a tóxicos ambientales, incluido el daño inducido por los rayos UV solares y la carcinogénesis. Además, se ha visto el potencial de Nrf2 para modular el envejecimiento cronológico de la piel y el fotoenvejecimiento. Se ha observado que Nrf2 ejerce un papel protector frente a la inflamación, aumento de marcadores génicos y apoptosis inducidos por la exposición a UV y que protege tanto a los queratinocitos como a los fibroblastos cutáneos frente a los efectos citotóxicos de los rayos UVA y UVB [48, 69]. Además, en ratones *knock out* para el gen Nrf2 la

producción de citoquinas inflamatorias inducida por la radiación UVB, fue mayor que en los ratones *wild type*, lo que sugiere que Nrf2 juega un papel importante en la protección de la piel contra los marcadores proinflamatorios inducidos por UVB [70]. Por esta razón, la modulación farmacológica de Nrf2 se ha considerado como enfoque novedoso para la fotoprotección de la piel como por ejemplo mediante el uso del inductor de Nrf2 sulforafano, que suprime la inflamación aguda inducida por UVB y la reacción de quemadura solar en la piel murina [71].

1.5.1 Obacunona

La obacunona (OBA) es un compuesto limonoide triterpenoide natural que se encuentra principalmente en los cítricos y en otras plantas de la familia Rutácea (Figura 10). Es un potente agonista de Nrf2 y por tanto, se han asociado sus actividades biológicas con su actividad detoxificante de ERO [72].

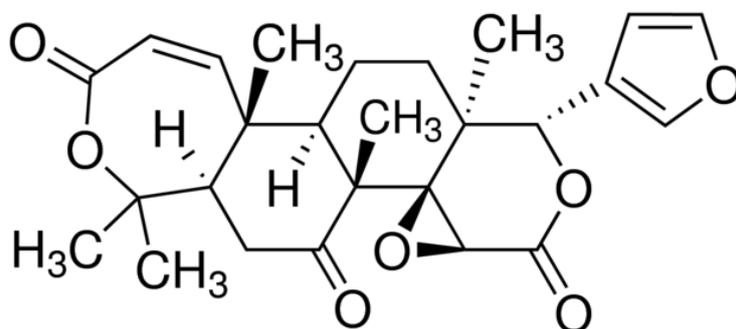


Figura 10. Estructura química de la Obacunona [73].

La Obacunona ha demostrado tener diversas actividades farmacológicas, incluidas actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antiproliferativas y antitumorales [74]. Entre ellas se ha observado que mejora la fibrosis pulmonar inducida por el peróxido de hidrógeno en células de adenocarcinoma, reduce los mediadores pro-inflamatorios en macrófagos activados por LPS y previene la quimiotaxis en macrófagos [75]. En cuanto a sus efectos antitumorales, se ha observado que atenúa la colitis experimental en ratones mediante la modulación de las cascadas de señalización de TLR4/NF- κ B, además de inhibir la proliferación de varias líneas celulares de carcinoma de colon [76]. Un estudio reciente informó que en células de epitelio de retina la

obacunona activó la cascada Nrf2 para proteger las células frente a la lesión oxidativa inducida por la radiación solar. En este estudio, la obacunona inhibió potentemente la acumulación de ERO, la peroxidación lipídica, apoptosis y el daño al ADN, inducidos por la exposición de las células del epitelio de retina a la radiación UV, y todo ello, mediante la activación de la ruta de señalización de Nrf2 [77].

1.6 MODELOS ORGANOTÍPICOS DE PIEL PARA LA EXPERIMENTACIÓN COSMÉTICA IN VITRO

En el proceso de desarrollo de nuevas formulaciones cosméticas, se presta especial atención al potencial de irritación de la piel. Por esta razón, la evaluación del potencial irritante de cualquier producto químico o producto utilizado en la industria farmacéutica o cosmética es un requisito [78]. Durante años, la evaluación de la irritación aguda se ha realizado mediante el modelo de experimentación en piel de conejo conocido como el test Draize [79], en base a las directrices de la guía 404 [80] de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD). No obstante, debido a las consideraciones éticas, en 2013 se prohibió la experimentación animal en cosméticos en la Unión Europea mediante la directiva 2003/15/CE. Desde entonces, los esfuerzos de la industria se han centrado en encontrar métodos *in vitro* para reemplazar así la experimentación en animales. [81]. En este contexto, se han propuesto como alternativas, el desarrollo de tejidos 3D artificiales de epidermis o de piel completa que presentan una arquitectura histológica similar a la de la piel humana y , por tanto, se pueden emplear para la medida de parámetros relacionados con la eficacia o seguridad [82]. El Laboratorio de Referencia para la Validación de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal de la Unión Europea (EURL-ECVAM) se ha dedicado a evaluar modelos de epidermis humana reconstruida con el fin de desarrollar y validar alternativas *in vitro* [83]. Todos los métodos validados se encuentran recogidos en las guías de la OECD, que se va actualizando a medida que se evalúan nuevos modelos. Entre los métodos validados se encuentran el uso de modelos de piel para ensayos de corrosión, irritación, fototoxicidad, genotoxicidad y

sensibilización [78], sin embargo, los organismos evaluadores no han validado ningún ensayo de fotoprotección en modelos de piel 3D.

Los pasos básicos de los que consta la reconstrucción de un modelo de piel artificial se ilustran en la Figura 11.

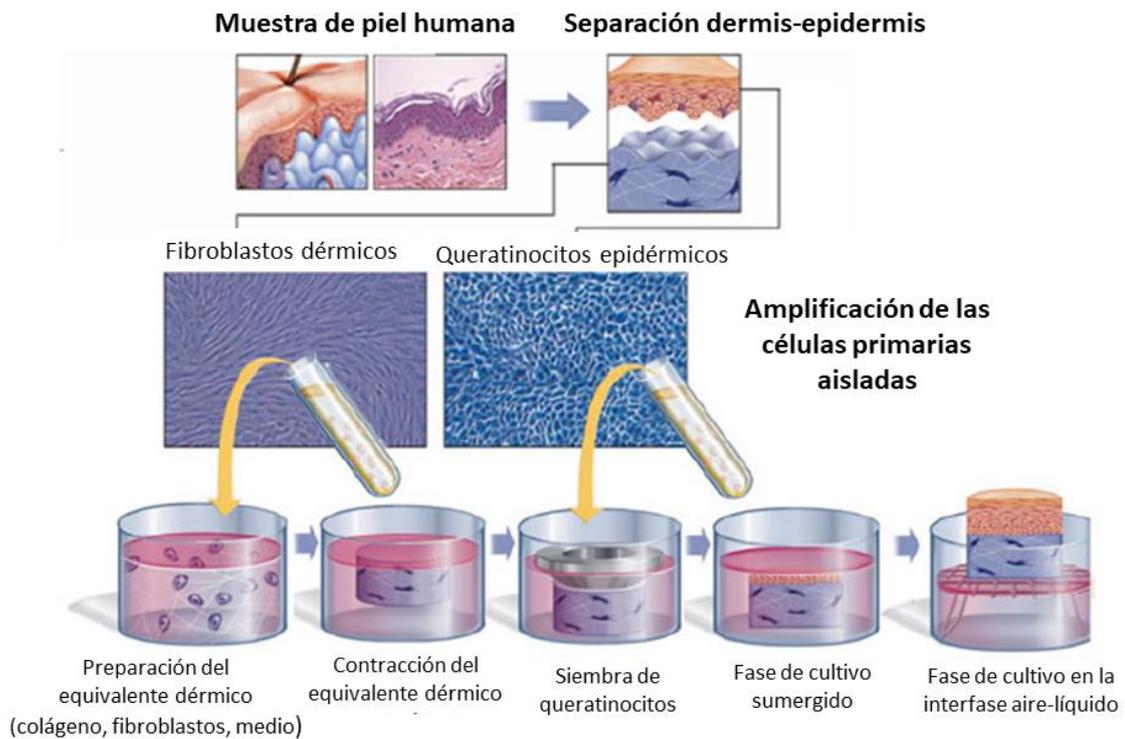


Figura 11. Pasos en la reconstrucción de un modelo 3D de piel completa *in vitro*. *Figura adaptada de referencia [84]*

En primer lugar, se aíslan y amplifican los queratinocitos y fibroblastos a partir de una biopsia de piel. Después, se prepara un equivalente dérmico mezclando colágeno tipo I en una solución de fibroblastos dérmicos en medio de cultivo específico. Este gel se vierte sobre la placa de cultivo y se incuba hasta que se produzca su contracción. Una vez la matriz se contrae, se siembran los queratinocitos epidérmicos en la parte

superior del equivalente dérmico, algunos métodos experimentales, emplean un anillo entre las dos capas para controlar la densidad celular. Este cultivo se mantiene en fase de inmersión hasta que el epitelio cubra el sustrato dérmico. Posteriormente, todo el cultivo se eleva a la interfase aire-líquido, alimentado por capilaridad para promover el proceso de estratificación y diferenciación epidérmica. Al final de esta fase se forma el estrato córneo [85]. Durante la fase de inmersión, es posible agregar otros tipos celulares como melanocitos o precursores de las células de Langerhans, según el modelo que se vaya a producir [84].

Pese al desarrollo de estos modelos y la validación de otros protocolos por la OECD, no se han implementado métodos alternativos para la determinación de la fotoprotección de productos cosméticos. Las únicas pruebas estandarizadas para evaluar la eficacia de los fotoprotectores son las pruebas *in vivo* de la determinación del SPF y el PPD. Dichos métodos, no permiten evaluar la protección a nivel molecular ni la relevancia clínica para la salud humana [86]. En este sentido, los modelos 3D de piel humana suponen un valor añadido, ya que su estructura altamente organizada similar a la observada *in vivo*, simula la intercomunicación entre los tipos celulares presentes (queratinocitos y fibroblastos) y la intercomunicación célula-matriz extracelular [78]. La reproducción de este microambiente es importante, ya que las interacciones celulares regulan varios mecanismos, como la viabilidad, la proliferación, la diferenciación, la morfología, la síntesis de proteínas y la expresión del genoma [87]. Además, debido a la posibilidad de aplicar productos tópicamente sobre su superficie se pueden mimetizar las condiciones de fotoprotección *in vivo* exponiendo los modelos a fuentes de luz artificial, para así poder evaluar tanto los efectos biológicos tempranos, como los efectos biológicos tardíos, que son difíciles evaluar en humanos por razones éticas [88]

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

La hipótesis propuesta en este trabajo se basa en los siguientes hallazgos:

- No se han establecido los espectros de acción para muchos de los efectos de la luz solar en la piel humana y los mecanismos fisiológicos de la fotoprotección no se comprenden completamente [89].
- Actualmente, existe una necesidad creciente de estandarización y evaluación de los eventos biológicos y los mecanismos moleculares provocados por los rayos UVA y UVB, lo cual es importante para la terapia clínica y la aplicación cosmética en el futuro [67].
- El aumento de exposición a la luz azul por los dispositivos electrónicos altera el ritmo circadiano [90].
- Los estudios demuestran efectos dañinos de la radiación infrarroja en la piel *in vivo* y se ha sugerido el desarrollo de protectores solares que la protejan frente al IR-A [91].
- El método SPF, cuya determinación se realiza sobre la base de una reacción eritematosa aguda, no predice adecuadamente el nivel de protección frente a otros daños biológicos [92].
- El estrés oxidativo desempeña un papel patogénico en las enfermedades inflamatorias crónicas, lo que lleva a un deterioro visible de la piel. Por lo tanto, la aplicación de antioxidantes naturales es una estrategia práctica para la protección UV de la piel [93–96].
- La activación de la ruta antioxidante de Nrf2 es beneficiosa en procesos de pigmentación y fotoenvejecimiento de la piel [18].

- La Obacunona, activador natural de Nrf2, protege a las células de epitelio de retina frente a la lesión oxidativa inducida por la radiación solar [77].

Por tanto, se establece la siguiente hipótesis:

Todas las luces del espectro solar, incluidas la luz azul y la infrarroja, impactan de forma negativa sobre la homeostasis de la piel. Los modelos artificiales de piel 3D son una herramienta con potencial para la estandarización de protocolos que evalúen la fotoprotección a nivel molecular, tanto de activos fotoprotectores, como la obacunona, así como de formulaciones cosméticas. Se postula que la complementación de las formulaciones fotoprotectoras con activos biológicos naturales y antioxidantes, es una buena estrategia para mejorar el rendimiento de protección y para mitigar los daños cutáneos causados por la luz solar.

2.2 OBJETIVOS

Con el fin de evaluar la validez de la hipótesis planteada, se establecen los siguientes objetivos:

- Caracterizar dos modelos distintos de piel 3D: SkinEthic™ RHE y 3D Phenion® Full-Thickness (Phenion®-FT).
- Estudiar los daños inducidos por cada una de las luces del espectro solar en el modelo de piel 3D que más se asemeje a la piel *in vivo* y compararlo con los resultados obtenidos en queratinocitos primarios en monocapa.
- Establecer los marcadores biológicos relevantes para la determinación de un protocolo de fotoprotección en Phenion®-FT.
- Evaluar la eficacia y fotoprotección de formulaciones cosméticas de RNB, por su acción sobre los marcadores moleculares establecidos, en tejidos de piel artificial Phenion®-FT expuestos a la luz solar completa, Ultravioleta-A, luz azul e infrarroja.
- Determinar qué formulaciones cosméticas de RNB ejercen una mejor fotoprotección y establecer si el nivel de protección a nivel biológico es dependiente del SPF de la formulación.
- Evaluar la capacidad fotoprotectora frente a la luz solar completa, del compuesto natural antioxidante Obacunona.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Composición de las formulaciones cosméticas de RNB

Para los experimentos de fotoprotección, se evaluaron formulaciones cosméticas en distintas formas farmacéuticas. Entre ellas se incluyeron un aerosol solar SPF 20 (C1), un superfluido facial SPF 50+ (C2), una crema rica de día SPF 20 (C3), un fotoprotector SPF 50+ (C4) y una loción solar SPF 30 (C5). Cada uno de los filtros incluidos en la composición de las formulaciones se puede observar en la tabla 2, así como sus activos biológicos. Entre los filtros químicos presentes en estas formulaciones se encuentra el Butil metoxidibenzoilmetano (avobenzona) cuyo uso, como se ha explicado anteriormente, es bastante común; el bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina, un absorbente de amplio espectro, altamente fotoestable que ayuda a prevenir la fotodegradación de otros activos como la avobenzona [97]; el octocrileno, que absorbe principalmente la radiación UVB y las longitudes de onda cortas de los UVA y tiene propiedades resistentes al agua [98]; la polisilicona-15, un absorbente UVB insoluble en agua y es el primer filtro polimérico que consta de cromóforos unidos a una columna vertebral de silicona [99]; la etilhexil triazona, un filtro UVB soluble en aceite que, debido a su insolubilidad en agua y afinidad con la queratina de la piel, está especialmente indicado para productos resistentes al agua [100]; El ácido fenilbenzimidazol sulfónico, un filtro soluble en agua que ofrece protección contra la radiación UVB y UVA de corto alcance. En combinación con otros filtros, ejerce mejor protección contra los rayos UVA; El tetrasulfonato de fenil dibenzimidazol disódico, que protege frente a los rayos UVA II y es soluble en agua [101]. Además, se incluye el potenciador trimetoxibencilideno pentanediona, que actúa como fotoestabilizador y potenciador de SPF. Es un excelente fotoestabilizador para la avobenzona y proporciona un refuerzo del 50% de SPF in vivo tanto en protectores solares orgánicos como inorgánicos [89].

Tabla 2. Composición de las formulaciones de RNB.

		Aerosol solar SPF 20	Superfluido 50+ facial	Crema rica Día SPF 20	Fotoprotector 50+	Loción solar SPF 30
		Composición Formulación 1 (C1)	Composición Formulación 2 (C2)	Composición Formulación 3 (C3)	Composición Formulación 4 (C4)	Composición Formulación 5 (C5)
FILTROS SOLARES	METOXIDIBENZOILMETANO DE BUTILO (Nº CAS 70356-09-1)	x	x	x	x	x
	BIS-ETILHEXILOXIFENOL METOXIFENIL TRIAZINA (Nº CAS 187393-00-6)				x	
	OCTOCRILENO (Nº CAS 6197-30-4)	x	x	x	x	x
	POLISILICONA-15 (Nº CAS 207574-74-1)		x			
	ETILHEXIL TRIAZONA (Nº CAS 88122-99-0)		x	x	x	x
	ÁCIDO FENILBENZIMIDAZOL SULFÓNICO (Nº CAS 27503-81-7)	x	x		x	x
	TETRASULFONATO DE FENIL DIBENZIMIDAZOL DISÓDICO (Nº CAS 180898-37-7)			x		
POTENCIADOR	TRIMETOXIBENCILIDENO PENTANEDIONA (Nº CAS 945558-97-4)		x			
ACTIVOS BIOLÓGICOS	EXTRACTO CELULAS MADRE VEGETALES			x		
	ALANTOINA	x		x		x
	CARNOSINA	x	x	x	x	x
	PANTENOL	x	x	x		x
	ALOE VERA	x				x
VITAMINA C	x	x	x		x	

3.1.2 Reactivos empleados

Tabla 3. Tabla de reactivos

Reactivo	Casa comercial	Referencia
Ácido acético glacial	Panreac	361008
Ácido clorhídrico (HCl)	Panreac	131020
Albúmina de suero bovino (BSA)	Sigma-Aldrich	A7906
Anfotericina B	Lonza Group LTD	17-836E
ARN interferente control negativo	Ambion	AM4611
Cóctel inhibidor de proteasa	Sigma	P8340

Dodecilsulfato sódico (SDS)	Sigma-Aldrich	L3771
PBS	Thermo Fisger Scientific	17-513F
DPX	Panreac	255254
GE Healthcare Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	Thermo Fisher Scientific	10308449
EGTA (ácido etilenglicol tetraacético)	Sigma	E3889
Etanol absoluto	Panreac	361086
Formaldehido 3.7-4%	Panreac	143091
Kit Pierce™ BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific	23225
Marcador de peso molecular Amersham High-Range Rainbow	GE Healthcare	RPN756E
Opti-MEM	Thermo Scientific	11058021
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	Sigma	RP7626
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems	4369016
Tween20	Sigma-Aldrich	P1379
Xileno	Merck	481769
Kit de detección de la apoptosis celular Annexin V- FITC	Abcam	ab14085
Medio Keratinocyte Growth Medium (KGM-2)	PromoCell	C-20111
3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)- 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)	Sigma-Aldrich	88417-1G
Dimetilsulfoxido (DMSO)	Sigma-Aldrich	D8418
CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay	Invitrogen	C20300
Isopropanol	Panreac, Applichem	131090
20,70- diclorodihidrofluoresceína Diacetato (CM-H2DCFDA)	Invitrogen	C6827
Accutasa	PromoCell	C-41310
Staining Buffer Tampón para citometría	Invitrogen	00-4222-26

Tripsina	Biowest	X0930-100
Human IL-6 DuoSet ELISA	R&D	DY206-05
Human IL-8 DuoSet ELISA	R&D	DY208
Human IL1-a DuoSet ELISA	R&D	DY200
Human Total MMP-1 DuoSet ELISA (nº Cat., R&D)	R&D	DY901B
Human Total MMP-9 DuoSet ELISA	R&D	DY911
Kit MagMAX™-96 Total RNA isolation	Thermo Fisher Scientific	AM1830
Kit Total RNA purification	Norgen Biotek	17250
Kit taqman para transcripción inversa	Thermo Fisher Scientific	N8080234
Geles de poliacrilamida Mini-PROTEAN® TGX™	Bio-Rad	4568024
Membranas de nitrocelulosa Trans-Blot® Turbo™ Transfer Pack	Bio-Rad	1704156EDU
2x Laemmli Sample Buffer	BIO-RAD	1610737
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	Sigma - Aldrich	ED2SC
Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino etanosulfónico (HEPES)	Sigma - Aldrich	H4034
Agua tratada con DEPC	Thermo Fisher Scientific	AM9906
Carbonato de litio	Sigma - Aldrich	101752913
Citrato	PanReac AppliChem	141808.1210
Cóctel inhibidor de proteasa	Sigma - Aldrich	P8340
Eosina	Sigma - Aldrich	HT110216
Hematoxilina	Sigma - Aldrich	GHS332
Lipofectamina™ 2000	Thermo Fisher Scientific	11668030
Master polymer plus detection system (peroxidase) (incl. dab chromogen)	Master diagnóstica	MAD-000237QK
Nonidet™ P 40 Substitute	Sigma - Aldrich	74385
Obacunona	selleckchem	S3784

Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium, No Phenol Red	Thermo Fisher Scientific	11520386
Parafina	Sigma - Aldrich	P3683
Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose w/l- glutamine w/o sodium pyruvate (DMEM)	Biowest	L0102-500
Fetal Calf Serum (FCS)	Amimed	2-01F00-I
Intracell Fixation and permeabilization kit for Flow Cytometry	Immunostep	INTRA-100

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Cultivos celulares y modelos 3D

En el siguiente trabajo se emplearon queratinocitos primarios de epidermis humana (NHEK) obtenidos de la casa comercial PromoCell (PromoCell, Heidelberg, Germany cat.C12005) (Figura 12A). Las células NHEK se cultivaron en medio de crecimiento de queratinocitos (KGM-2), suplementado con CaCl₂ y 5% de Penicilina y anfotericina y se mantuvieron en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% a 37 °C.

Se empleó también la línea celular transfectada KeratinoSens de Givaudan (Givaudan, Schweiz AG) (Figura 12B). Las células se sembraron en medio DMEM con 9,1% de suero fetal (FCS) y 50 mg/ml de geneticina.

Además, se utilizaron dos modelos de piel artificial de distinta complejidad estructural. En primer lugar, el modelo SkinEthic™ RHE (EpiSkin™, L'Oréal Lyon, Francia) (Figura 12 C) es una epidermis humana reconstruida *in vitro* a partir de queratinocitos humanos cultivados en la interfaz aire-líquido en un filtro de policarbonato inerte y con un medio químicamente definido. Este modelo es histológicamente similar a la epidermis humana *in vivo*.

En segundo lugar, se empleó el modelo de piel completa Phenion® Full-Thickness (Phenion®-FT Henkel, Düsseldorf, Alemania) (Figura 12E), que se compone de queratinocitos y fibroblastos derivados del mismo donante humano y se diferencia y estratifica de manera similar a la piel humana nativa, lo que incluye la generación de una capa córnea. Dichos tejidos se cultivan en la interfaz aire-líquido apoyados sobre un papel de filtro que absorbe el medio de cultivo por capilaridad, y se mantiene elevado sobre la placa Petri mediante un andamiaje específico (Figura 12D).

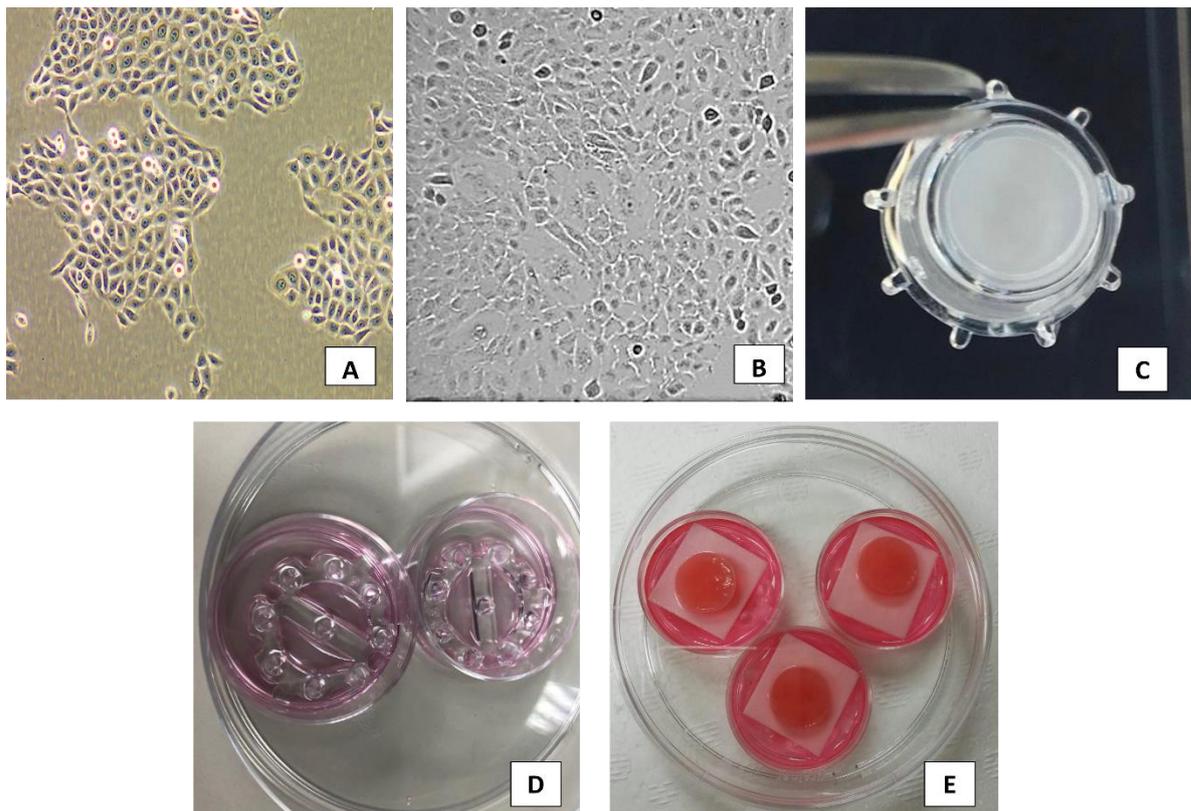


Figura 12. Cultivos celulares y modelos 3D. (A) Cultivo de células NHEK en monocapa. (B) Cultivo de células KeratinoSens en monocapa. (C) Pocillo con el modelo de epidermis reconstruida SkinEthic™ RHE. (D) Andamiaje del modelo Phenion® Full-Thickness. (E) Tejidos del modelo Phenion® Full-Thickness con el medio de cultivo en la base del andamiaje.

3.2.2 Tratamiento *in vitro* para ensayos de irritación en monocapa y en modelos de piel reconstruida

Para el ensayo de irritación en monocapa, los queratinocitos primarios NHEK se sembraron en placas de 24 pocillos con medio KGM-2 a una densidad de 5×10^4 células/pocillo. Se prepararon los irritantes dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0,2% y

ácido acético glacial a 0,2 y 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 90% el medio se reemplazó por los respectivos tratamientos y se incubaron durante 1 h a 37 ° C y 5% de CO_2 .

En el caso de los modelos de piel reconstruida, a la recepción de los modelos, los tejidos se manejaron de acuerdo con las indicaciones de los respectivos fabricantes. La prueba de irritación para el modelo SkinEthic™ RHE y Phenion-FT® se realizó según las directrices del protocolo de la OECD TG 439 [103]. Se aplicaron tópicamente como control la solución salina tamponada con fosfato (PBS), así como los irritantes SDS 5% y ácido acético 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se incubaron durante 42 minutos. Se empleó una malla de nylon en la parte superior de la epidermis para facilitar la distribución homogénea de los compuestos (Figura 13). Tras el período de exposición, los tejidos se lavaron con PBS y se les añadió medio fresco durante 42 h, a 37 ° C y 5% de CO_2 . Para el modelo Phenion® Full-Thickness, se empleó adicionalmente un método específicamente adaptado en base a las directrices del protocolo TG 439. Se aplicaron tópicamente el PBS, SDS 5% y ácido acético (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y se distribuyeron en la superficie epitelial con la ayuda de una malla de nylon durante 4 h. Seguidamente, los tejidos se lavaron con PBS y se les añadió medio fresco para ser incubados durante 24h.

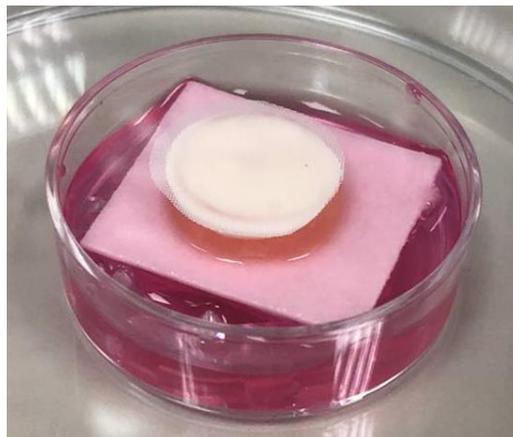


Figura 13. Protocolo de aplicación tópica de los irritantes mediante malla de nylon en Phenion®-FT.

En todos los casos, tras el período de incubación se recogieron, por una parte, los sobrenadantes de medio de cultivo y se almacenaron en alícuotas -80°C para el posterior análisis de mediadores proinflamatorios solubles y, por otra parte, se midió

la viabilidad celular mediante el ensayo MTT para la evaluación de la irritación cutánea *in vitro*.

3.2.3 Protocolos de irradiación en monocapa y modelo 3D

3.2.3.1 Luz solar completa, UVA y luz azul

Los queratinocitos primarios NHEK, se sembraron en placas de 24 o 6 pocillos y se incubaron durante 24-48h hasta alcanzar la confluencia deseada para el experimento (80%-90%). Previamente a la irradiación y en el caso de las células en monocapa y el modelo de epidermis SkinEthic™ RHE se eliminó el medio de cultivo y se sustituyó por PBS, mientras que en el caso del modelo Phenion®-FT se transfirió todo el andamiaje junto con el tejido 3D a una nueva placa con PBS. Los cultivos se irradiaron en finas capas de PBS para evitar la formación de productos fototóxicos. Los controles sin irradiar también se transfirieron a placas con PBS, pero se incubaron en un área protegida contra los rayos UV/LED para asegurar las mismas condiciones en todos los grupos. Para la irradiación de luz solar completa y UVA se empleó el Sistema Solar UVACUBE 400 (Figura 14A), una cámara de simulación solar cuyo espectro se puede adaptar con distintas combinaciones de lámparas y filtros. La lámpara empleada fue SOL 500 de Honle (Figura 14B), que simula el espectro de la luz solar natural con una uniformidad muy alta (Figura 14C). En el caso de la irradiación con luz UVA sola, el sistema se equipó con la lente de filtro H1. Para la luz azul, se utilizó el sistema LED CUBE 100IC (Figura 14D) de HONLE, una cámara compacta acoplada a la lámpara LED Spot 100 HP IC que opera a una longitud de onda constante de 405 nm. En todos los casos, se midió la dosis elegida con el radiómetro UVmeter *basic* (Honle) (Figura 14E). Tras la irradiación, se retiró el PBS para volver a añadir el medio de cultivo correspondiente de cada modelo, y se colocaron en el incubador a 37 °C y CO₂ al 5% durante 24h.

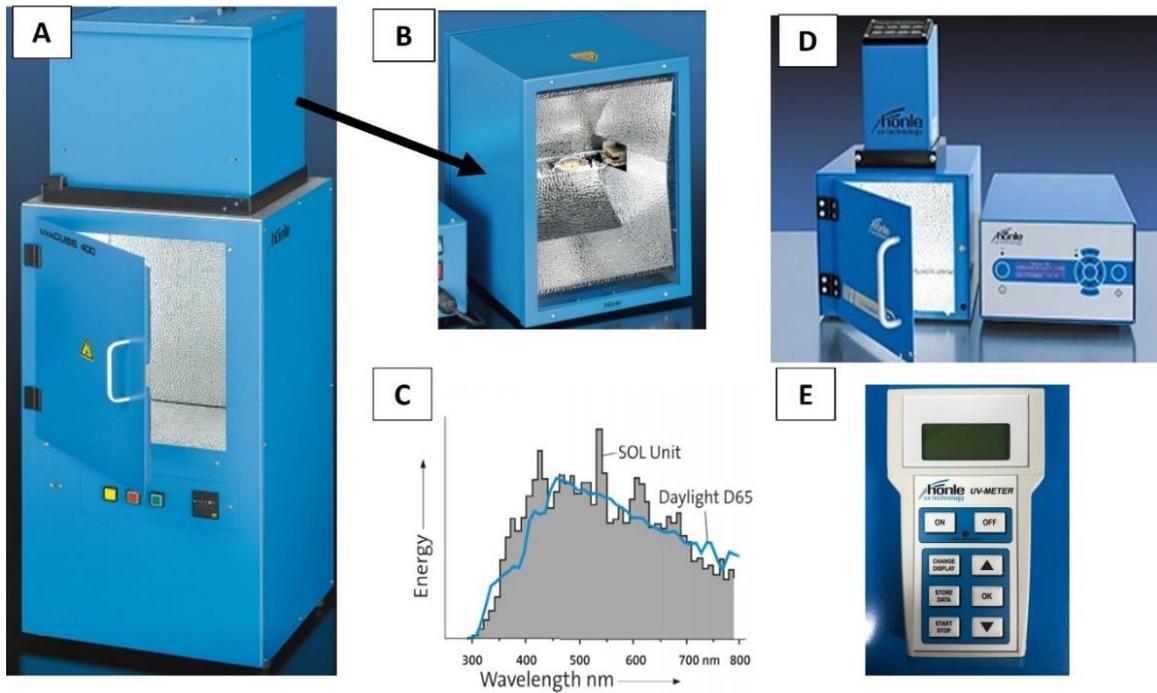


Figura 14. Equipos de luz artificial. (A) Cámara de simulación Solar UVACUBE 400. **(B)** Lámpara SOL 500. **(C)** Distribución del espectro de la lámpara SOL 500 en comparación con el espectro de la luz solar natural. **(D)** Cámara de irradiación de luz azul LED CUBE 100IC acoplada a la lámpara LED Spot 100 HP. **(E)** Radiómetro UVmeter basic. Todos los equipos se obtuvieron de la marca comercial Honle.

3.2.3.2 Infrarrojo

Siguiendo el mismo protocolo que para la luz UV y LED, la irradiación con luz infrarroja se llevó a cabo en PBS tanto en los queratinocitos primarios NHEK como en el modelo Phenion®-FT. Para la irradiación IR se utilizó el equipo Hydrosun 575 home (hydrosun) (Figura 15A), que reproduce la luz infrarroja de penetración profunda con longitudes de onda de 780 a 1400 nm. Este dispositivo simula la interacción del calor del sol y el efecto de filtro de la atmósfera terrestre. Para las dosis de irradiación, se midió el tiempo de exposición directa de cada modelo a la luz IR, y se controló la temperatura mediante una sonda térmica sumergible, que se colocó en un pocillo de la placa con PBS en el caso de los experimentos en monocapa (Figura 15B), mientras que en el modelo Phenion®-FT se insertó la sonda de temperatura en la unión dermoepidérmica y se registró la temperatura cada 5 minutos (Figura 15C). Tras la irradiación, se retiró el PBS para volver a añadir el medio de cultivo correspondiente de cada modelo, y se colocaron en el incubador a 37 °C y CO₂ al 5% durante 24h para posteriores análisis.

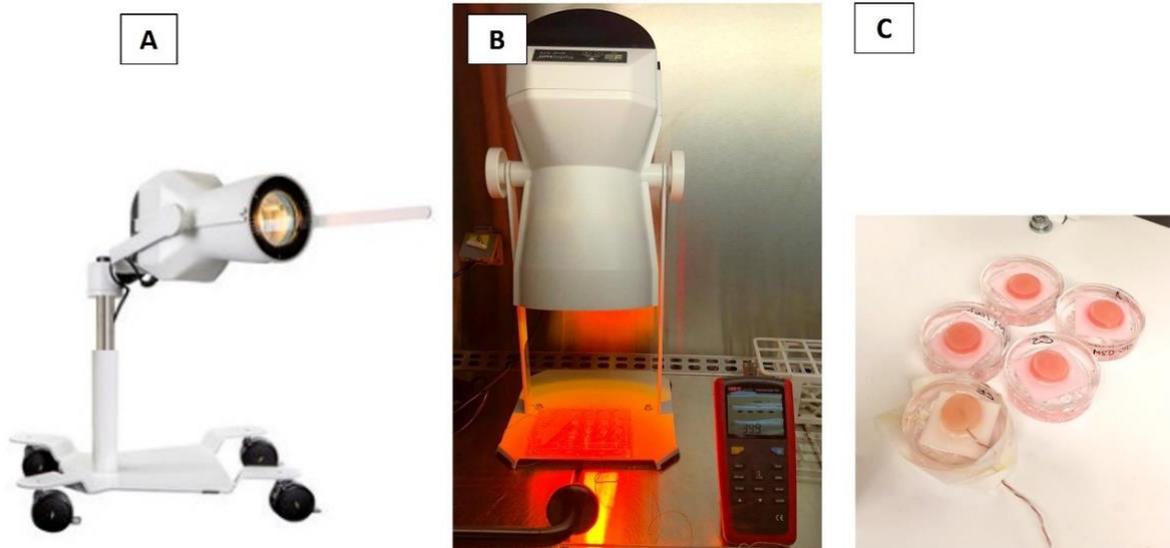


Figura 15. Equipo de luz infrarroja. (A) Sistema de irradiación Infrarroja (IR) Hydrosun 575 home (Hydrosun). **(B)** Protocolo de irradiación IR en queratinocitos NHEK con la placa conectada al termómetro sumergible. **(C)** Protocolo de irradiación IR en Phenion®-FT con la sonda del termómetro insertada en la unión dermoepidérmica.

En todos los casos, tras el período de incubación de 24h posirradiación, se recogieron, por una parte, los sobrenadantes de medio de cultivo y se almacenaron a -80°C para el análisis de mediadores proinflamatorios. Por otra parte, se midió la viabilidad celular mediante el ensayo MTT y la citotoxicidad celular con el ensayo LDH. Asimismo, se almacenaron los tejidos de piel reconstruida a -80°C para el análisis de expresión génica y proteica, y se fijaron en formaldehído para el posterior análisis histológico.

3.2.4 Protocolo de fotoprotección en monocapa y modelo 3D

3.2.4.1 Ensayo de fotoprotección de en monocapa

Para realizar el ensayo de fotoprotección en monocapa se sembraron queratinocitos primarios NHEK en placas de 24 o 6 pocillos en función del experimento a realizar y se cultivaron durante 24-48h hasta alcanzar la confluencia deseada (80%-90%). A continuación, se prepararon diluciones del fármaco Obacunona ($12,5 \mu\text{M}$, $25 \mu\text{M}$ y $50 \mu\text{M}$) en medio KGM-2 y se añadieron $300 \mu\text{l}$ o $1,5 \text{ ml}$ a los pocillos correspondientes. El fármaco se incubó durante 24h y se irradió siguiendo el protocolo explicado anteriormente, a una dosis de $5\text{J}/\text{cm}^2$ de luz solar completa. Tras irradiar, se retiró el

PBS y se incubaron las células en KGM-2 durante 24h en el incubador a 37 °C y CO₂ al 5% para el posterior análisis de marcadores.

3.2.4.2 Ensayo de fotoprotección en el modelo 3D Phenion®-FT

Con la finalidad de realizar el ensayo de fotoprotección, las formulaciones se pesaron según las directrices del método COLIPA y se aplicaron tópicamente 2mg/cm² sobre el tejido Phenion®-FT distribuidos con una espátula. A continuación, se dejó incubar los tejidos con las formulaciones durante 15 minutos previamente a la exposición solar. En el caso de la fotoprotección del compuesto natural obacunona, se diluyó en medio de cultivo a las concentraciones 25 µM y 50 µM y se incubaron 5 ml durante 24 h.

Tras la incubación, los tejidos se transfirieron a placas con 2 ml de PBS estéril y se irradiaron inmediatamente con 25 J/cm² de luz solar completa, 45 J/cm² de UVA, 90 J/cm² de luz azul o 45 minutos de radiación infrarroja. Se eligieron en todos los casos dosis superiores a la dosis mínima biológica, en función de los resultados obtenidos en los experimentos de las curvas de radiación.

Para irradiar con luz solar completa, se empleó un simulador solar *Sol 500* acoplado a la cabina *UVACUBE 400* (Honle) y se midió la dosis con el radiómetro UVA *UVmeter basic* (Honle). En el caso de la luz UV se emplearon la misma cabina y simulador solar, adaptados a la lente de filtro *Frame H1*, que elimina la luz UVB. Para la luz azul, se utilizó el sistema LED CUBE 100IC (Figura 13D) de HONLE y se midió la dosis con el radiómetro *UVmeter basic* (Honle) adaptado a una sonda de LED. En el caso de la luz infrarroja, se empleó la fuente Hydrosun 575 home (hydrosun) y se controló la temperatura con una sonda térmica en la unión dermoepidérmica.

Los controles sin irradiar también se transfirieron a 2 ml de PBS, pero se incubaron en un área protegida contra rayos UV para asegurar las mismas condiciones en todos los grupos. Tras la irradiación, los residuos de formulación en la epidermis de los tejidos se retiraron mediante lavados con PBS, y con la ayuda de una torunda húmeda. Seguidamente, los tejidos se volvieron a colocar en sus respectivas placas en el incubador a 37 °C y CO₂ al 5% con 5ml de medio ALI durante 24 h antes del análisis de marcadores.

3.2.5 Ensayo de viabilidad MTT

Al finalizar el tratamiento de los ensayos de irritación y 24h tras los experimentos de irradiación, se determinó la viabilidad celular con el ensayo colorimétrico MTT, que evalúa la viabilidad en función de la capacidad de las células para reducir el compuesto bromuro de Difeniltetrazolio (MTT) a su forma insoluble. El MTT es un compuesto perteneciente a la familia de sales de tetrazolio, soluble en agua y con color amarillo. Si la integridad de las células es buena, reducirán el MTT a formazán, un compuesto de color violeta e insoluble en agua, de tal manera que la capacidad de las células para reducir el MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular.

El protocolo varía en función de si se realiza en monocapa o en tejido 3D:

3.2.5.1 MTT en queratinocitos en monocapa

Se retiró el medio de cultivo, se añadieron 220 μ l de MTT 1 mg/ml directamente sobre la placa del cultivo celular y se incubó durante 3h a 37°C. Tras el tiempo de incubación, se eliminó la solución de MTT, se lavó el pocillo con DPBS, y se añadieron 200 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO) para extraer el formazán del interior de las células, durante 10 min y en agitación suave. A continuación, se midió la absorbancia a 570 nm con el espectrofotómetro Infinite 200 (Tecan) y se analizaron los datos con respecto a los valores de los controles no irradiados.

3.2.5.2 MTT en modelos 3D SkinEthic™ RHE y Phenion®-FT

Tras retirar el medio de cultivo, se sumergieron los tejidos en 2ml de MTT 1mg/ml 3h a 37 ° C. Tras el tiempo de incubación, los tejidos se sumergieron en PBS para lavar los restos de la solución de MTT y se colocaron en una placa nueva con 2ml de isopropanol durante 2h en agitación suave con la finalidad de extraer el formazán del tejido. Seguidamente, se transfirieron 100 μ l de cada extracción a una placa de 96 pocillos para la medición de la absorbancia a 570 nm con el espectrofotómetro *Infinite 200* (Tecan) y se analizaron los datos con respecto a los valores de los controles no irradiados.

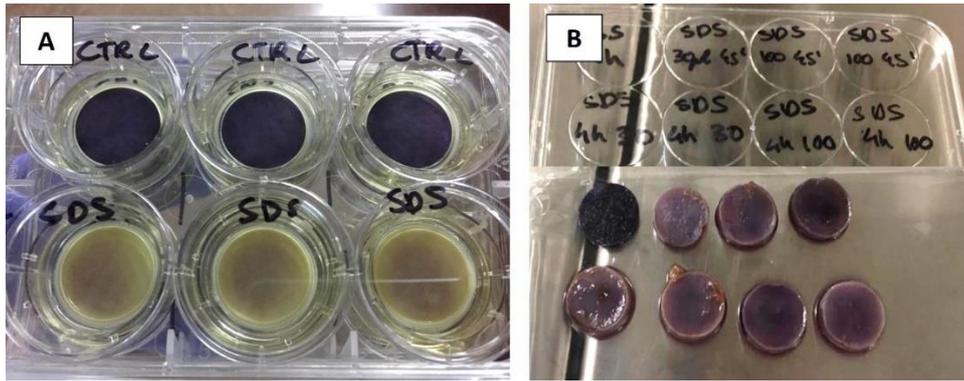


Figura 16. Ensayo MTT. (A) Ensayo de MTT tras incubación con compuestos irritantes en el modelo de epidermis SkinEthic™ RHE. **(B)** Ensayo de MTT tras incubación con compuestos irritantes en el modelo de piel completa Phenion®-FT.

3.2.6 Ensayo de citotoxicidad LDH

24h posirradiación, la citotoxicidad se evaluó tanto en monocapa como en modelo 3D mediante el kit CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay. El fundamento del kit emplea la liberación de la enzima citosólica lactato deshidrogenasa (LDH) al medio por parte de las células cuya membrana ha sido dañada. La LDH extracelular en los medios puede cuantificarse mediante una reacción enzimática acoplada en la que LDH cataliza la conversión de lactato a piruvato a través de la reducción de NAD⁺ a NADH. La diaforasa usa este NADH liberado para reducir la sal de tetrazolio (INT) a un producto rojo de formazán que se puede medir a 490 nm. El nivel de producción de formazán es directamente proporcional a la cantidad de LDH liberada en el medio, lo que es indicativo de citotoxicidad. Por tanto, tras tratar las células, el medio se transfirió a una placa nueva y se mezcló con el reactivo proporcionado por el kit. Tras incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, las reacciones se detuvieron agregando la solución de parada de reacción y se midió la absorbancia a 490 nm y 680 nm con el espectrofotómetro *Infinite 200* (Tecan)

3.2.7 Dímeros de timina en monocapa por citometría de flujo

Para evaluar la formación de dímeros de timina en monocapa, se empleó la citometría de flujo. Para ello se sembraron en frascos de 25cm² queratinocitos primarios NHEK y

se irradiaron en PBS con una dosis de 5 J/cm^2 de luz solar completa o UVA sola. En el caso del ensayo con formulaciones cosméticas, estas se incubaron al 0,1% durante 15 minutos antes de la irradiación. Inmediatamente después de la irradiación, los frascos se mantuvieron en oscuridad para evitar la reversión de los dímeros de timina y se lavaron con PBS para retirar los restos de la solución de cada cosmético al 0,1%. A continuación, se incubaron con acutasa durante 5 minutos para levantar las células del frasco. Seguidamente, se sometieron a un tratamiento de fijación y permeabilización con los reactivos del kit *Intracell Fixation and permeabilization* (immunostep), y se incubaron durante toda la noche con un anticuerpo primario capaz de detectar los dímeros de timina (Anti-Thymine Dimer antibody [H3] ab10347, abcam). Tras la incubación, se añadió el anticuerpo secundario (Anti-Mouse IgG H&L (FITC) ab6785, abcam), durante 1h, que va marcado con el fluoróforo FITC y que permite la detección en el citómetro. Finalmente, se realizó 1 lavado con PBS para resuspender las células en el tampón de análisis para citometría *Staining buffer* y se analizaron las muestras en el citómetro BD FACS Verse. Se analizaron un mínimo de 10000 células por condición, y el procesado y análisis de los datos se realizó con el software interno del citómetro.

3.2.8 Ensayo de liberación de especies reactivas de oxígeno en monocapa por citometría de flujo

El ensayo de especies reactivas de oxígeno (ERO) se realizó empleando la sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (CM-H₂DCFDA). Esta sonda resulta útil como indicador de ERO en células ya que reacciona ante la presencia de ERO dando lugar a un producto fluorescente que es detectable mediante citometría de flujo (Figura 17). Los queratinocitos NHEK se sembraron en placas de 6 y cuando alcanzaron una confluencia del 80% se incubaron con distintas concentraciones de obacunona (12,5 μM , 25 μM , 50 μM) durante 24h. Tras el período de incubación, se realizaron 3 lavados de PBS para retirar los restos de fármaco y se añadió la sonda CM-H₂DCFDA a una concentración de 2 μM y se incubó durante 15 min en oscuridad. Tras el tiempo de incubación, las células se irradiaron con 2.5 J/cm^2 de luz solar completa, en la cámara de simulación UVACUBE 400. Inmediatamente después de la irradiación, las células se

levantaron de la superficie de la placa con solución de acetasa y se resuspendieron en el tampón de citometría *staining buffer*. Para el análisis de las muestras se empleó el citómetro de flujo BD FACS Verse (BD Biosciences). Se analizaron un mínimo de 10000 células por condición, y el procesado y análisis de los datos se realizó con el software interno del citómetro.

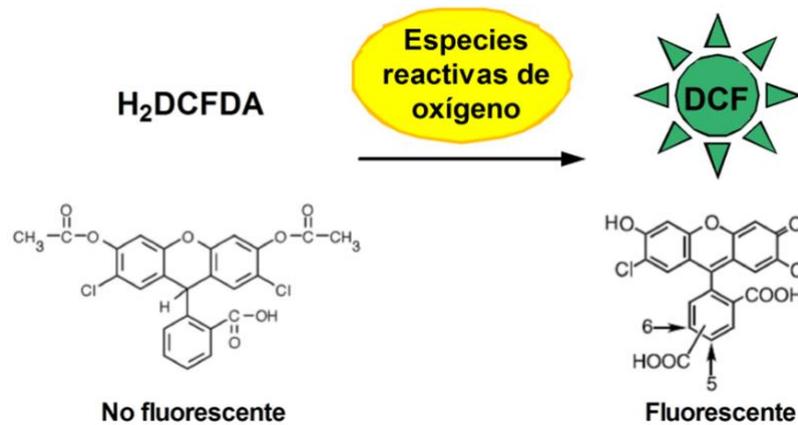


Figura 17. Reacción del 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA) a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). El H₂DCF-DA se hidroliza y oxida en presencia de O²⁻ y H₂O₂ dando lugar al DCF, compuesto fluorescente, por lo que sirve para monitorizar la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Figura creada con Biorender.

3.2.9 Ensayo de apoptosis en monocapa por citometría de flujo

El ensayo de apoptosis se realizó mediante el kit de tinción/detección de apoptosis con anexina V-FITC. Poco después de iniciar la apoptosis, las células trasladan las moléculas de fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana plasmática a la superficie celular. La fosfatidilserina en la superficie celular se detecta mediante tinción con un conjugado fluorescente de anexina V, una proteína que tiene una alta afinidad por la fosfatidilserina. El kit permite diferenciar la apoptosis de la necrosis cuando se añade, además de la Anexina V-FITC, el reactivo yoduro de propidio, un marcador de viabilidad que penetra en las células muertas o dañadas. Los queratinocitos NHEK, se sembraron en una placa de 96 oscura. Cuando alcanzaron una confluencia del 90%, se trataron durante 24h con las distintas concentraciones de obacunona (12,5 μM, 25 μM, 50 μM) y se irradiaron con 5 J/cm² de luz solar completa, en la cámara de simulación UVACUBE 400 y en una fina capa de PBS. 24h tras la irradiación se retiró el medio de las placas para conservarlo en una placa adicional y se les añadió tripsina

para levantarlas del pocillo. A todo el volumen de células y medio se añadieron 5µl de la Anexina V-FITC y yoduro de propidio, seguidos de 100µl de tampón de citometría, todos ellos proporcionados por el kit. La placa se analizó inmediatamente después de la adición de los reactivos, mediante citometría de flujo, utilizando el citómetro BD LSR Fortessa™ X-20 (BD Biosciences). Se analizaron un mínimo de 10.000 células para cada una de las condiciones. Los datos fueron analizados por el software FlowJo (TreeStar) que presenta los diagramas de la anexina V-FITC frente al yoduro de propidio. Los diagramas se dividen en cuatro cuartiles (Q), cada uno de los cuales corresponde a un estado celular: Q1 células necróticas (PI/FITC, +/-); Q2 células apoptóticas tardías (PI/FITC, +/+); Q3 células viables (PI/FITC, -/-) y Q4 células apoptóticas tempranas (PI/FITC, -/+). Los datos de los cuartiles tomados para la representación de la apoptosis celular fueron la suma del Q2 y el Q4, y los resultados se expresaron como la media de cada uno de ellos.

3.2.10 Cuantificación de proteínas liberadas al medio de cultivo mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

Los sobrenadantes de las células en monocapa y los modelos 3D se recogieron tras el debido tratamiento y se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Con la finalidad de determinar las diferencias de expresión de citoquinas y/o metaloproteinasas se analizó la liberación de IL-6, IL-8 y IL-1 α , así como de las metaloproteinasas MMP1 y MMP9 mediante los kits Human DuoSet ELISA. Estos kits permiten determinar cuantitativamente los niveles de citoquinas en el sobrenadante y se basan en la técnica de ELISA cuantitativo en sándwich, utilizando una placa que se incubaba previamente con el anticuerpo específico contra la proteína de interés (anticuerpo de captura). Así pues, tras la inmovilización del anticuerpo de captura en la placa (figura 18A), se incubaron por un lado concentraciones seriadas de la proteína estándar de interés, para establecer una recta patrón, y, por otro lado, con las muestras correspondientes (Figura 18B). Seguidamente se incubó durante 2h para facilitar la unión de la proteína al anticuerpo de captura. A continuación, se realizaron lavados para eliminar uniones inespecíficas y se añadieron 100 µL del anticuerpo secundario, conjugado con biotina durante 2h (Figura 18C). Se añadió a continuación el conjugado de estreptavidina-

peroxidasa de rábano (HRP), que se unió a la biotina del anticuerpo secundario aprovechando la alta afinidad biológica entre la biotina y la estreptavidina (Figura 18D). La emisión de señal en estos kits se basa en el hecho de que el anticuerpo secundario tiene asociado la HRP, enzima que modifica el sustrato 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB), dando lugar a un producto coloreado cuya intensidad será proporcional a la concentración de la proteína de interés. Por tanto, tras la incubación de la HRP se realizaron lavados y se incubó durante 30 minutos con TMB (Figura 18E). Las medidas de absorbancia fueron llevadas a cabo a una longitud de onda de 450 nm en el espectrofotómetro Infinite 200 (Tecan). Los datos de concentración de cada una de las citoquinas se extrapolaron a partir de la recta patrón.

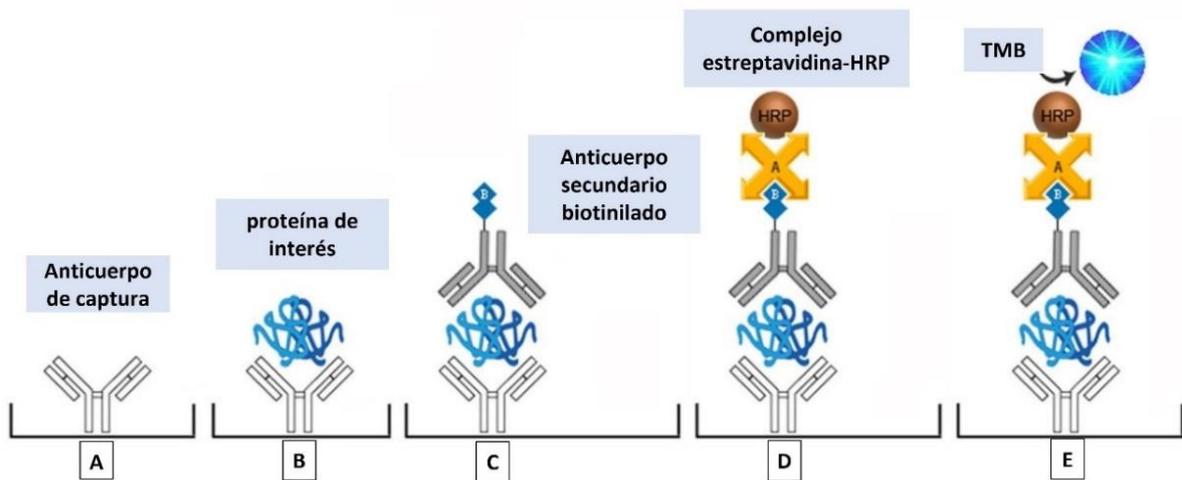


Figura 18. Esquema de la técnica de ELISA cuantitativo en sándwich. Figura adaptada de referencia [104].

3.2.11 Cuantificación de los niveles de Glutation (GSH)

Los queratinocitos NHEK, se sembraron en una placa de 96 oscura. Cuando alcanzaron una confluencia del 90%, se trataron durante 24h con las distintas concentraciones de obacunona (12,5 μM , 25 μM , 50 μM) y se irradiaron con 5 J/cm^2 de luz solar completa, en la cámara de simulación UVACUBE 400 y en una fina capa de PBS. Tras la estimulación, se procedió a realizar la cuantificación de glutatión (GSH) mediante el kit 'GSH-Glo™ Glutathione Assay' siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit está basado en la conversión del compuesto derivado de luciferina, Luc-NT, a luciferina en presencia de glutatión, catalizado por la enzima glutatión S-transferasa. La señal de

luciferina detectada por bioluminiscencia es proporcional a la cantidad de GSH presente en la muestra (Figura 19). Una vez pasado el tiempo de estimulación, se retiró el medio de la placa y se incubaron las células 30 minutos con el reactivo del kit que contiene el derivado de la luciferina y la enzima glutatión S-transferasa. Posteriormente, se añadió el reactivo de detección de la luciferina y se incubó durante 15 minutos más. Finalmente, se midió la luminiscencia con el luminómetro (LUMIstar Omega, BMG Labtech). La concentración de GSH se extrapola a partir de la curva estándar del kit.

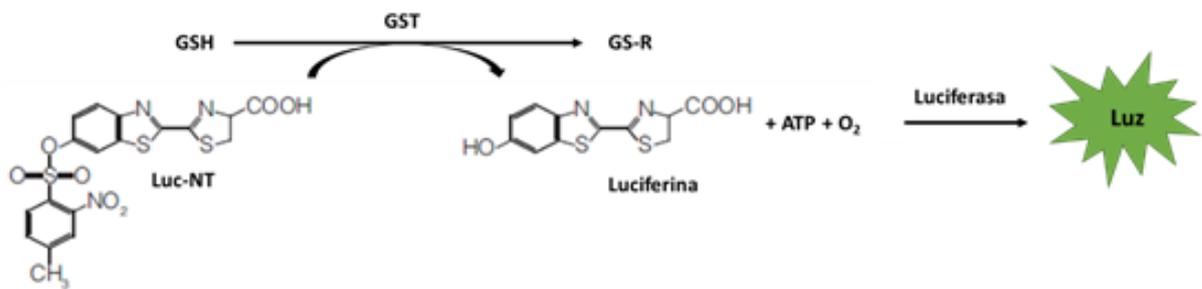


Figura 19: Reacción de conversión de un derivado de la luciferina a luciferina en presencia de GSH por la enzima GSH S-transferasa. Figura creada con Biorender. Abreviaturas: GSH: Glutatio, GST: GSH S-transferasa

3.2.12 Silenciamiento génico mediante ARN interferente

El ARN de interferencia (siARN) es un mecanismo de silenciamiento post-transcripcional de genes específicos, que se basa en que pequeñas moléculas de ARN complementarias a un ARN mensajero específico, conducen a su degradación, impidiendo su traducción a proteína (Figura 20B).

Para transfectar los siARN al interior celular es necesario cargarlos en liposomas capaces de fusionarse con la membrana celular. Así pues, se prepararon dos soluciones por separado: una solución con el siARN específico para NRF2 o el siARN control a una concentración de 50 nM, diluido en medio Opti-MEM®; y una solución de Lipofectamina 2000® 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ diluida en medio Opti-MEM®. El siARN control (-) se emplea para que las condiciones control estén tratadas de la misma manera que las condiciones silenciadas, y para ello se transfecta con este siARN(-) que no se espera

que se dirija específicamente a ningún ARN mensajero. Dichas soluciones se incubaron 5 minutos, se mezclaron suavemente y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se añadió sobre las células a una confluencia del 90% y en medio libre de antibióticos y se incubó durante 6 horas (Figura 20A). Pasado este tiempo se renovó el medio de cultivo y se inició el procedimiento experimental.

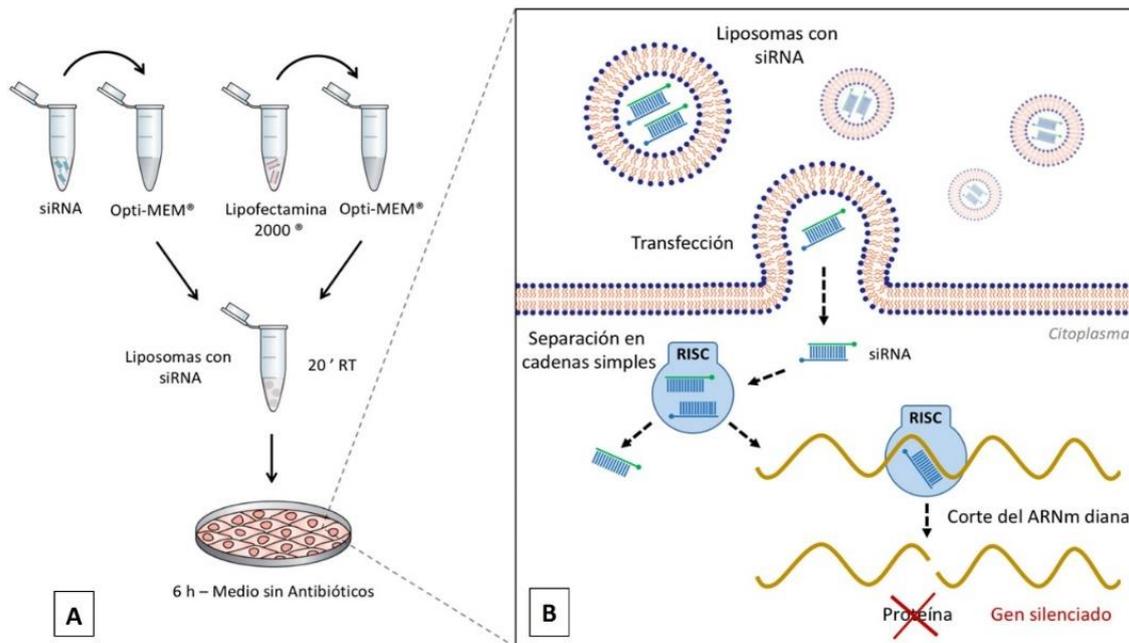


Figura 20. Silenciamiento génico mediante ARN interferente. (A) Protocolo para generar liposomas con siARN mediante Lipofectamina 2000®. (B) Mecanismo molecular de silenciamiento mediante siARN. Figura creada con biorender.

El mecanismo en el que se basa el silenciamiento está esquematizado en la Figura 20B. Cuando se cultivan las células en presencia de estos liposomas sus cubiertas lipídicas se fusionan con la membrana celular e introducen su contenido al citoplasma. Entonces el complejo RISC (Complejo de silenciamiento inducido por ARN) provoca el desapareamiento de las dos hebras del siARN y utiliza la hebra antisentido como guía para captar el ARNm complementario del gen de interés. Finalmente, el complejo RISC promueve el corte y posterior destrucción del ARNm diana, provocando la supresión de la expresión del gen.

6h tras la incubación, se retiró el medio con los liposomas y se realizó el tratamiento correspondiente. El silenciamiento transitorio mediante esta técnica tiene una

duración de 72h. Por tanto, las células silenciadas se trataron con Obacunona 25 μ M y 50 μ M durante 24h.

3.2.13 Prueba KeratinoSens®

Los Keratinosens son una línea celular de queratinocitos HaCat inmortalizados y transfectados de manera estable con el gen de la luciferasa, bajo el control transcripcional de un promotor constitutivo fusionado al de la respuesta antioxidante (ARE). La base del ensayo se muestra en la Figura 21. Nrf2 se encuentra unido a Keap1, y por lo tanto inactivado, en el citoplasma de las células. Tras la activación de Nrf2, esta unión se rompe y Nrf2 viaja al núcleo donde activa la transcripción de los genes regulados por la secuencia antioxidante ARE y de la luciferasa, dando lugar al aumento de la luminiscencia. Por tanto, el aumento de la luminiscencia indica la activación del factor de transcripción Nrf2.

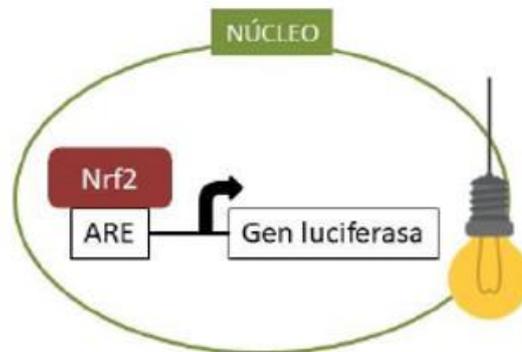


Figura 21. Inducción de la expresión de la luciferasa en la línea celular keratinoSens®. Figura creada con Biorender.

Las células se sembraron en placas opacas de 96 pocillos y se estimularon con Obacunona 50 μ M durante durante 48h. A continuación, se eliminó el medio y tras tres lavados con DPBS se añadieron 20 μ l de solución de lisis 1X e incubaron durante 20 min. Transcurrido ese tiempo se añadieron 50 μ l de sustrato y se midió la luminiscencia en el luminómetro (LUMIstar Omega, BMG Labtech). Los resultados se expresaron como la inducción de la actividad luciferasa máxima (Imáx) (lectura de la

luminiscencia de la condición experimental en estudio/lectura de la luminiscencia del control negativo).

3.2.14 Ensayo de expresión génica

3.2.14.1 Extracción y cuantificación de ARN

Esta técnica se empleó para determinar las diferencias de expresión a nivel de ARN, tanto en queratinocitos en monocapa como en los modelos de piel 3D. 24h posirradiación, el ARN total de las células NHEK se purificó utilizando el extractor automático KingFisher Duo Prime (Thermo Fisher Scientific) (Figura 22B) con el kit de extracción MagMAX™ 96 Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. El extractor automático emplea una solución de lisado de muestras a base de tiocianato de guanidinio que solubiliza rápidamente las membranas celulares y simultáneamente inactiva las nucleasas. Tras la homogeneización, las muestras se mezclan con perlas magnéticas que tienen una superficie de unión a ácidos nucleicos. A continuación, las perlas y los ácidos nucleicos unidos se capturan magnéticamente y se lavan para eliminar los restos celulares, las proteínas y otros contaminantes. Finalmente, el ácido nucleico se trata con DNasa y se purifica de la mezcla de reacción, para eluirlo en 50 µL de tampón bajo en sal. Para realizar dicho protocolo, se preparó una placa de 96 pocillos profundos (Figura 22A) con los reactivos requeridos por el extractor, así como las muestras lisadas con la solución proporcionada por el kit, y se colocó la placa en el equipo (Figura 22B), que realizó la extracción de manera automática.

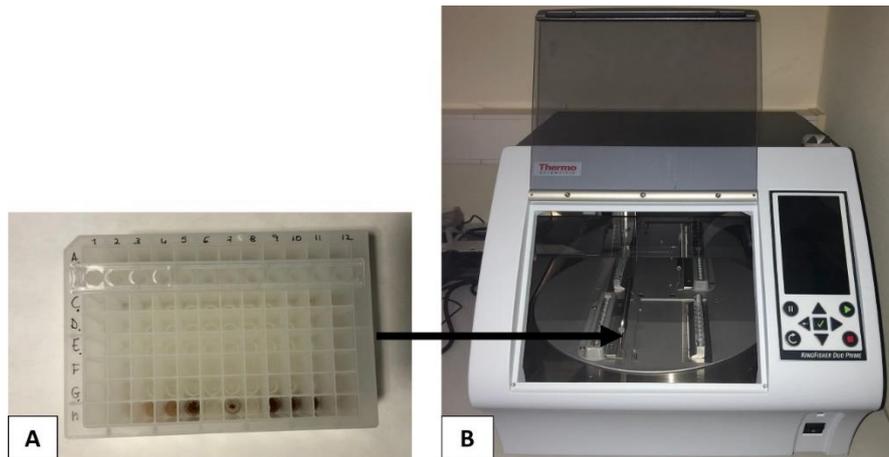


Figura 22. Equipo de extracción de ARN. (A) Placa de 96 de pocillos profundos cargada con las muestras y los reactivos del kit MagMAX™ 96 Total RNA Isolation Kit. (B) Extractor de ARN automático KingFisher Duo Prime.

En el caso de la extracción de ARN de los tejidos de piel 3D SkinEthic™ RHE y Phenion®-FT Los tejidos se recogieron 24 posirradiación y se empleó el kit de extracción por columnas *Total RNA purification* (Norgen Biotek), basado en la purificación de ARN mediante cromatografía en columna de centrifugación utilizando una resina como matriz de separación. Para ello se disgregaron los tejidos con el tampón RL proporcionado por el kit, en el sistema de homogenización tisular TissueLyser II (Qiagen) con bolas de hierro a una frecuencia de 30 Hz durante 3 minutos. Seguidamente se añadió etanol y se cargaron las muestras en una columna de centrifugación a la que el ARN queda adherido. Se realizaron lavados seriados para eliminar impurezas restantes, y el ARN total purificado se eluyó en la solución de elución proporcionada por el kit.

En todos los casos La pureza del ARN extraído y la concentración se confirmaron con un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific.).

3.2.14.2 Retrotranscripción

En la reacción de transcripción reversa o retrotranscripción (RT), la enzima transcriptasa inversa sintetiza ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) a partir de un ARN mensajero molde. Este paso fue necesario para realizar la

cuantificación de la expresión génica por PCR a tiempo real. Tomando en consideración la cuantificación del ARN extraído, se transformó un total de 300 ng de ARN en ADNc utilizando el kit TaqMan® para la transcripción inversa. Se realizó este proceso en un termociclador Veriti 96 well thermal cycler (Applied Biosystems) con los siguientes pasos (Figura 23A): incubación durante 10 minutos a 25°C, ciclo de 30 minutos a 42°C e inactivación de la enzima durante 5 minutos a 95°C. El ADNc sintetizado se almacenó a -20°C hasta su utilización.

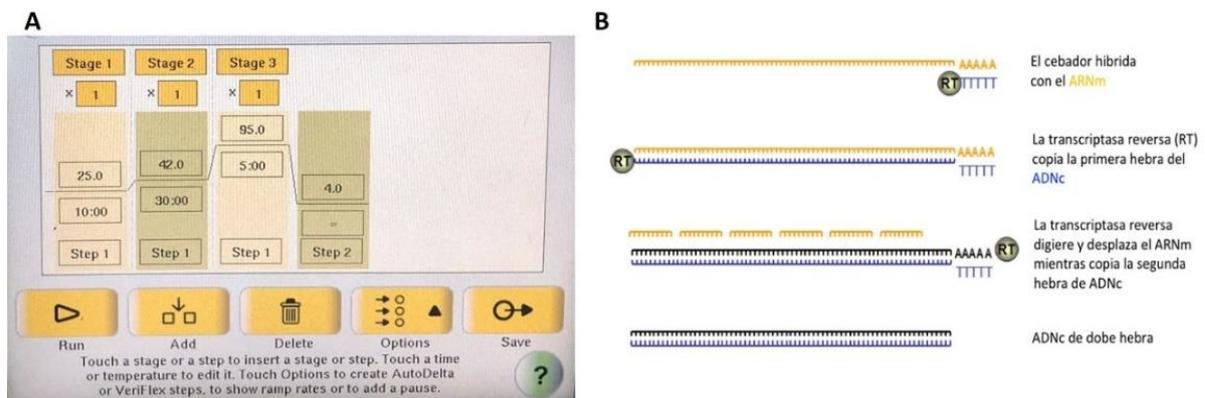


Figura 23. Esquemas de la retrotranscripción. (A) Esquema de los pasos de la transcripción inversa en un termociclador Veriti 96 well thermal cycler (Applied Biosystems). (B) Etapas de la reacción de transcripción inversa.

3.2.14.3 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT)

Tras la transcripción inversa, esta técnica se empleó para determinar las diferencias de expresión a nivel de ARN. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplifica selectivamente una región de ADN de interés utilizando oligonucleótidos como cebadores de la síntesis de ADN. Estos cebadores flanquean la región que se pretende amplificar. La reacción de amplificación consiste en la repetición de un ciclo de tres etapas a diferentes temperaturas. Cada repetición del ciclo produce un aumento exponencial en el número de copias de ADN de la región de interés. La variante denominada PCR a tiempo real (RT-PCR) constituye una forma precisa de detectar y cuantificar los niveles de ARN mensajero (ARNm). Los equipos de RT-PCR permiten la detección directa del producto de amplificación durante la reacción empleando lectores de fluorescencia. Para ello se utilizaron Ensayos de Expresión Génica

TaqMan[®], que son mezclas pre-formuladas de sondas y cebadores específicos para el gen de interés marcadas con fluorocromos. Los reactivos TaqMan[®] utilizan una sonda fluorogénica y la actividad de la Taq Polimerasa para detectar un producto de PCR específico a medida que se acumula durante la reacción, tal y como se detalla en la Figura 24.

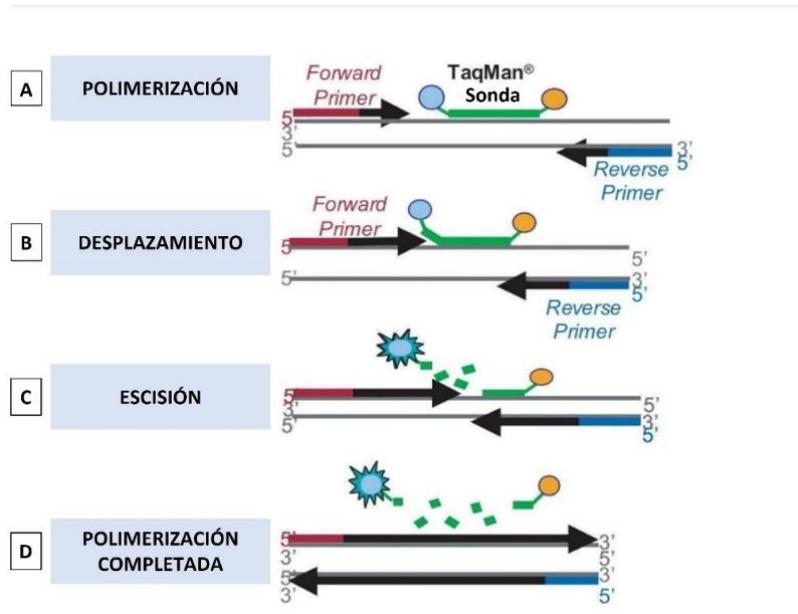


Figura 24. Sistema TaqMan[®] de cuantificación fluorométrica de la expresión génica. (A) Etapa de polimerización. (B) Etapa de desplazamiento. (C) Etapa de escisión. (D) Fin de polimerización. Figura adaptada de [105]

La sonda contiene un fluoróforo en el extremo 5' y un inhibidor de fluorescencia (quencher) en el extremo 3'. Este último absorbe la fluorescencia emitida por el fluoróforo mientras ambos permanecen unidos a la sonda próximos entre sí (Figura 24A). Durante los ciclos de la PCR, la sonda se hibrida con los productos de la PCR específicos para ella, y a medida que la polimerasa copia la cadena complementaria, el fluoróforo se escinde de la sonda (Figura 24B, C). La separación entre el fluoróforo y el quencher debido a la escisión de la sonda, provoca un aumento de la señal fluorescente que es proporcional a la cantidad de productos de amplificación que se genera en la mezcla de reacción (Figura 24D).

La existencia de estas sondas fluorogénicas permite la detección en tiempo real únicamente de los productos de amplificación específicos. En la Tabla 4 se enumeran

las Sondas de Expresión Génica TaqMan® utilizadas para el estudio de la expresión de los genes de interés en este trabajo.

Tabla 4. Sondas de Expresión Génica TaqMan® utilizados en la PCR a tiempo real.

<i>GEN</i>	<i>REFERENCIA</i>
<i>COL1A1</i>	Hs00164004_m1
<i>COL7A1</i>	Hs00164310_m1
<i>DCN</i>	Hs00754870_s1
<i>ELN</i>	Hs00355783_m1
<i>GAPDH</i>	4310884E
<i>GPX1</i>	Hs00829989_gH
<i>HO1</i>	Hs01110250_m1
<i>IVL</i>	Hs00846307_s1
<i>MMP1</i>	Hs00899658_m1
<i>MMP9</i>	Hs00234579_m1
<i>NQO1</i>	Hs00168547_m1
<i>NRF2</i>	Hs00975961_g1
<i>P21</i>	Hs01040810_m1
<i>P53</i>	Hs01034249_m1

Abreviaturas: *COL1A1*: Colágeno tipo 1 alfa 1, *COL7A1*: Colágeno tipo 7 alfa 1, *DCN*: Decorina, *ELN*: Elastina, *GAPDH*: Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, *GPX1*: Glutación peroxidasa 1, *HO1*: Hemo-oxigenasa 1, *IVL*: Involucrina, *MMP1*: Metaloproteínasa 1, *MMP9*: Metaloproteínasa 9, *NQO1*: NADPH quinona deshidrogenasa, *NRF2*: Factor nuclear eritroide 2, *P21*: inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1. *P53*: proteína supresora de tumores p53.

El proceso de PCR-RT se desarrolló en un termociclador *QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) usando TaqMan® Gene Expression Master Mix con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 2 minutos a 50°C seguido de 10 min a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C seguidos de 1 minuto a 60°C.

A partir de los datos de fluorescencia registrados se obtuvieron curvas de amplificación en las que se representa el logaritmo de la intensidad de fluorescencia frente al número de ciclos transcurridos. Para medir la expresión de un determinado gen se utilizó el ciclo umbral (Ct), ciclo en el que la fluorescencia supera el umbral o threshold. El threshold es la línea de corte que determina el inicio de la fase exponencial de la curva. Por encima de este umbral el nivel de fluorescencia se considera significativamente superior a la fluorescencia basal. Cuantas más copias haya de ARNm

de partida del gen estudiado, más ADNc se obtendrá en la transcripción reversa y antes comenzará la amplificación a ser exponencial. Por tanto, La cuantificación relativa de los distintos genes se realizó comparando sus Ct con el del control endógeno GADPH. El nivel de expresión génica se calculó después como la diferencia (ΔCt) entre el valor Ct del gen de interés y el valor Ct del control endógeno. Los cambios en la expresión de los distintos genes de interés se representaron como $2^{-\Delta Ct}$.

3.2.15 Ensayos de expresión protéica Western Blot

Las diferencias de los niveles de expresión protéica en los tejidos de piel 3D Phenion®-FT se analizaron mediante el análisis de western Blot 24h posirradiación. Las muestras se disgregaron en el sistema Tissuelyser II (Qiagen®) con bolas de hierro a una frecuencia de 30 Hz durante 3 minutos, empleando un tampón de extracción de proteínas compuesto por inhibidor de proteasas, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y buffer C (HEPES 1M, NaCl 4M, EDTA 0,5M, EGTA 0,1M, Glicerol y agua). A continuación, los disgregados se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 min y el sobrenadante se sometió a tres ciclos de choque térmico por congelación-descongelación con nitrógeno líquido. Después se añadió el detergente NP40 al 1% y se mantuvo en hielo durante 15 minutos. Finalmente se centrifugó a 10000 rpm 20 min a 4°C y se recogió el sobrenadante para determinar la concentración de proteína total mediante el kit *Pierce™ BCA Protein Assay Kit siguiendo las instrucciones del fabricante*. Este kit combina la reducción inducida por proteínas de Cu^{+2} a Cu^{+1} en un medio alcalino con la detección colorimétrica del catión cuproso (Cu^{+1}), utilizando un reactivo que contiene ácido bicinconínico. El producto de reacción de color púrpura exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm que es proporcional a las concentraciones de proteína.

Una vez cuantificada la concentración de proteína de cada muestra, se realizó la separación por electroforesis en base a su peso molecular. Se cargaron 15 μg de proteínas desnaturalizadas en presencia del tampón laemmli a 95°C 10 min, junto con el marcador de peso molecular Rainbow™, en geles de poliacrilamida Mini-PROTEAN® TGX™ (Figura 25A). Se aplicó una corriente eléctrica de 100V al gel durante 1 hora,

provocando que las proteínas migrasen a través (Figura 25B) y se transfirieron desde el gel a las membranas de nitrocelulosa Trans-Blot® Turbo™ Transfer Pack con el equipo de transferencia semi-húmeda Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Figura 25C). Posteriormente se incubaron las membranas con albúmina de suero bovino (BSA) al 5% durante 2 h se marcaron durante la noche a 4 ° C, con varios anticuerpos primarios. Tras la incubación, se lavó la membrana y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con HRP durante 1 hora. Los anticuerpos primarios y secundarios empleados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios para Western Blot.

Epítopo	Referencia	Dilución	Diluyente
P21	Novus Biologicals (NB100-1941)	1:500	BSA 5% / TBST
P53	Cell Signalling (18032)	1:1000	Leche 5% / TBST
<i>HRP - IgG (H+L) Ratón</i>	Thermo Sci. (SA1-200)	1:10000	BSA 5% / TBST

Abreviaturas: HRP: peroxidasa de rábano. TBST: solución salina tamponada con Tween20.

Las proteínas marcadas se detectaron mediante autoradiografía en cámara oscura. Para ello se usaron películas fotográficas que recogen la emisión de quimioluminiscencia inducida por el kit ECL plus al reaccionar el sustrato con la HRP del anticuerpo secundario (Figura 25D). La densitometría de las películas se midió mediante software Image J 1.42q. Los resultados se expresaron como ratios respecto a controles endógenos de GAPDH.

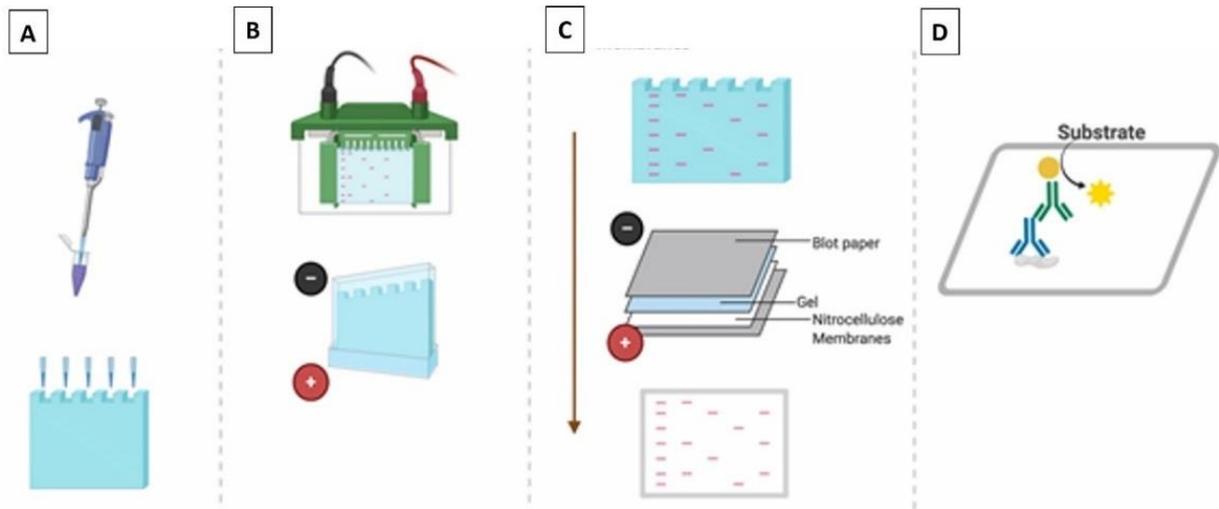


Figura 25. Esquema de la técnica western Blot. (A) Carga de las muestras y del marcador de peso molecular. (B) Separación de las proteínas en gel de poliacrilamida. (C) Tras la electroforesis las muestras quedan separadas a lo largo del gel, incluido el marcador. (D) Incubación de la membrana con anticuerpo primario, anticuerpo secundario y reacción de quimioluminiscencia. Figura adaptada de referencia [106].

3.2.16 Histología

3.2.16.1 Fijación y deshidratación del tejido

24 horas tras la irradiación, los tejidos Phenion-FT se cortaron en dos mitades simétricas (Figura 25A, B), se colocaron en casetes de inclusión, y se fijaron en Formaldehído 3.7-4% tamponado a pH7 a 4°C durante 24h. Los tejidos fijados se sometieron a una deshidratación en gradiente de alcoholes tal y como se muestra en la tabla 6:

Tabla 6. Protocolo de deshidratación de tejidos

Tratamiento	Tiempo	Repeticiones
<i>Etanol 50%</i>	60 minutos	x1
<i>Etanol 70%</i>	60 minutos	x2
<i>Etanol 90%</i>	60 minutos	X1
<i>Etanol 95%</i>	60 minutos	x2
<i>Isopropanol</i>	60 minutos	X2
<i>Xileno</i>	90 minutos	X2
<i>Parafina</i>	Toda la noche	

A continuación, se incluyeron los tejidos en moldes de parafina (Figura 26C) y se cortaron secciones de 5 μm de espesor con un micrótopo HM 340 E (Leica Geosystems) (Figura 26D) que se adhirieron a portaobjetos de vidrio. Dichas secciones se desparafinaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para evaluar la integridad de la arquitectura del tejido.

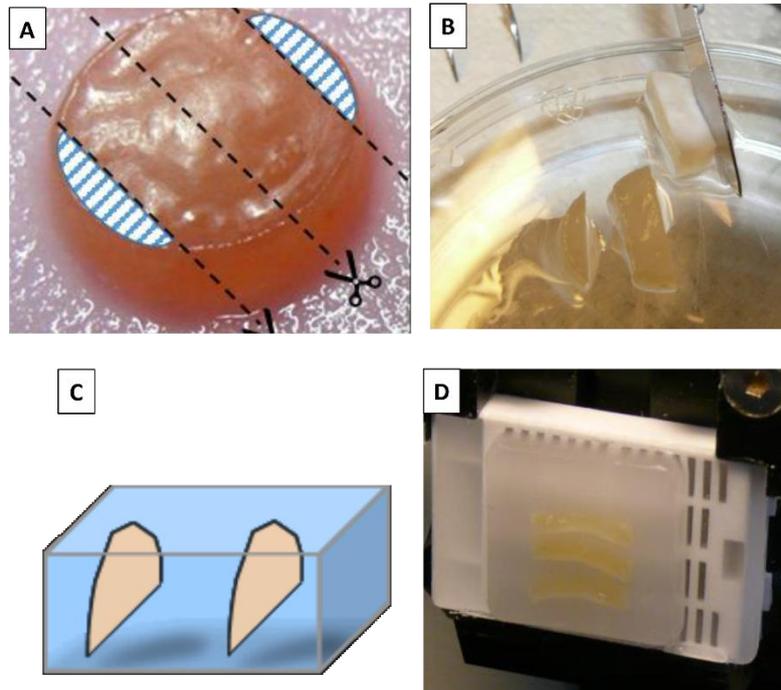


Figura 26. Manejo histológico de Phenion®-FT. (A) Guía de corte transversal del tejido Phenion®-FT. (B) Corte del tejido Phenion®-FT tras fijación con formaldehído. (C) Colocación de las piezas de tejido Phenion®-FT en el molde de parafinado. (D) Tejidos de Phenion®-FT incluidos en parafina listos para cortar en el microtopo.

3.2.16.2 Tinción hematoxilina-eosina

Para realizar la tinción con hematoxilina-eosina de los cortes de Phenion-FT® se siguió el esquema de tratamientos de la Tabla 7:

Tabla 7. Protocolo de tinción con Hematoxilina-Eosina.

Tratamiento	Tiempo	Repeticiones
Xileno	5 minutos	X2
Etanol 100%	5 minutos	X2
Etanol 96%	5 minutos	X2
Etanol 70%	2 minutos	X2

Etanol 50%	2 minutos	X2
Hematoxilina 1/2	2 minutos	x1
Agua corriente	Hasta eliminar exceso de hematoxilina	
Etanol 70%+ 0,25%HCl	10 segundos	X1
Carbonato de Litio	10 segundos	X1
Etanol 96%	10 segundos	X1
Eosina+ácido acético glacial 0,5%	1 minuto	X1
Agua corriente	Hasta eliminar exceso eosina	
Etanol 70%	1minuto	X1
Etanol 96%	1 minuto	X1
Etanol 100 %	2 minutos	X1
Xileno	2 minutos	X2

Al finalizar el proceso de tinción se dejaron secar los cortes teñidos y se cubrieron con el medio de montaje DPX con un cubreobjetos. Los cortes se visualizaron en un microscopio de luz visible vertical Leica DM6000B y se tomaron fotografías representativas de la epidermis y dermis de cada condición.

3.2.16.3 Inmunohistoquímica

Para el análisis inmunohistoquímico se empleó el kit comercial *Master polymer plus detection system*. Las secciones de tejido se desparafinaron e hidrataron según la descripción de la Tabla 8.

Tabla 8. Protocolo de desparafinado e hidratación del ensayo inmunohistoquímico.

Tratamiento	Tiempo	Número de repeticiones
Estufa 60°C	15 min	X1
Xileno	10 min	X2
Etanol 100%	5 min	X1
Etanol 95%	5min	X1
Etanol 70%	5 min	X1
Etanol 50%	5 min	X1
Agua	5 min	X1

A continuación, los portaobjetos se sumergieron en una cubeta con solución de citrato 10 mM y se hirvieron al baño maría durante 15 minutos para el desenmascaramiento antigénico. Después, se atemperaron las muestras y se sumergieron en una cubeta con agua mili-Q durante 5 min. Para el bloqueo de la peroxidasa endógena se usó la solución del kit y se permeabilizó la membrana celular con tritón 100 al 0,1% en PBS durante 10 min. Para el bloqueo de las uniones inespecíficas se usó BSA 5%, incubado durante una hora a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda. Se preparó el anticuerpo primario diluido en 0,1% BSA/PBS y se incubó durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron Cleaved Caspase-3 (ASP175) (#9664S, Cell Signaling) y Anti-thymine dimer clone H, (t1192, Sigma). Al día siguiente, se añadió el anticuerpo secundario proporcionado por el kit durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. El anticuerpo secundario está conjugado con la enzima peroxidasa, que, tras añadir el sustrato *DAB Chromogen concentrate*, da lugar a un precipitado de color marrón. De esta forma las zonas del tejido donde se haya unido el anticuerpo primario quedarán marcadas por el precipitado marrón. Tras el revelado de la reacción se realizó una contratinción con hematoxilina diluida ½ durante 2 minutos y se deshidrató el tejido siguiendo los pasos de la tabla 9. Finalmente, se procedió al montaje añadiendo DPX sobre la muestra y el cubreobjetos. Los cortes marcados fueron observados mediante el microscopio Nikon Eclipse TE200. En el caso de la inmunohistoquímica para Caspasa-3 Se representó el porcentaje de células positivas contando al menos tres muestras de cada grupo y examinando varios campos de cada sección del tejido de piel reconstruida para obtener un valor medio de cada condición.

Tabla 9. Protocolo de deshidratación del ensayo inmunohistoquímico.

<i>Tratamiento</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Número de repeticiones</i>
<i>Etanol 90%</i>	5 min	X2
<i>Etanol 100%</i>	5min	X2
<i>Xileno</i>	10 min	X2

3.2.17 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se resolvió considerando $p < 0.05$ como significativo. Cuando las comparaciones concernían a varios grupos los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (SD) de $n=3$ experimentos independientes. En este caso, el análisis estadístico se llevó a cabo mediante análisis paramétrico y las comparaciones múltiples se realizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) unidireccional seguido de la prueba post hoc de Bonferroni. Las comparaciones entre dos grupos fueron analizadas empleando una la prueba t-test no apareado para muestras independientes.

Por otra parte, el análisis de correlación se realizó aplicando la correlación de Pearson, asumiendo que las poblaciones siguen una distribución gaussiana. Se asignaron a la variable X las curvas de dosis de cada una de las luces del espectro, y a las variables Y, los valores obtenidos para cada biomarcador evaluado. El coeficiente de correlación de Pearson, r , cuantifica la magnitud de la correlación. Su valor varía desde -1 (relación inversa perfecta; si X sube, Y baja) hasta 1 (relación positiva perfecta; a medida que X sube, Y sube). Un valor de cero significa que no hay correlación en absoluto. La no aleatoriedad del coeficiente de correlación se consideró significativa cuando $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZACIÓN DE DOS MODELOS 3D DE PIEL

4.1.1 El tejido de piel artificial Phenion®-FT presenta mayor resistencia frente irritantes que el tejido de epidermis Skinethic™

En la determinación de la respuesta del modelo 3D SkinEthic™ a sustancias irritantes (Figura 27A), tras 42 minutos de exposición se observó una viabilidad menor del 10% para el SDS 5%, según las directrices del protocolo de la OECD Test No. 439 [103]. Los tejidos a los que se les había aplicado ácido acético a concentraciones 2 µg/µl y 20 µg/µl presentaron viabilidades superiores al 80%, mientras que la dosis de 200 µg/µl presentó una viabilidad inferior al 5%. Cuando se trataron con el mismo tiempo de incubación los tejidos Phenion®-FT se observó que las concentraciones de ácido acético 2 µg/µl y 20 µg/µl no disminuyeron la viabilidad de los tejidos, y la más alta, 200 µg/µl, alcanzó un 51% de viabilidad. En el caso del SDS 5% la viabilidad tisular fue de un 21%. Por ello, se decidió evaluar en los tejidos Phenion®-FT las mismas sustancias irritantes durante un tiempo de exposición más largo, de 4h. En ese caso, las dos concentraciones de ácido acético más altas, 20 y 200, redujeron la viabilidad hasta 53% y 6% respectivamente, mientras que en el caso del SDS 5% se mantuvo al 21%. Como puede observarse en la Figura 27B, empleando los mismos tiempos de exposición, el tejido Phenion®-FT presentó viabilidades mayores tras el contacto con las distintas sustancias irritantes, y fue necesario aumentar 5,7 veces el tiempo de exposición para conseguir un efecto irritante similar en ambos modelos 3D.

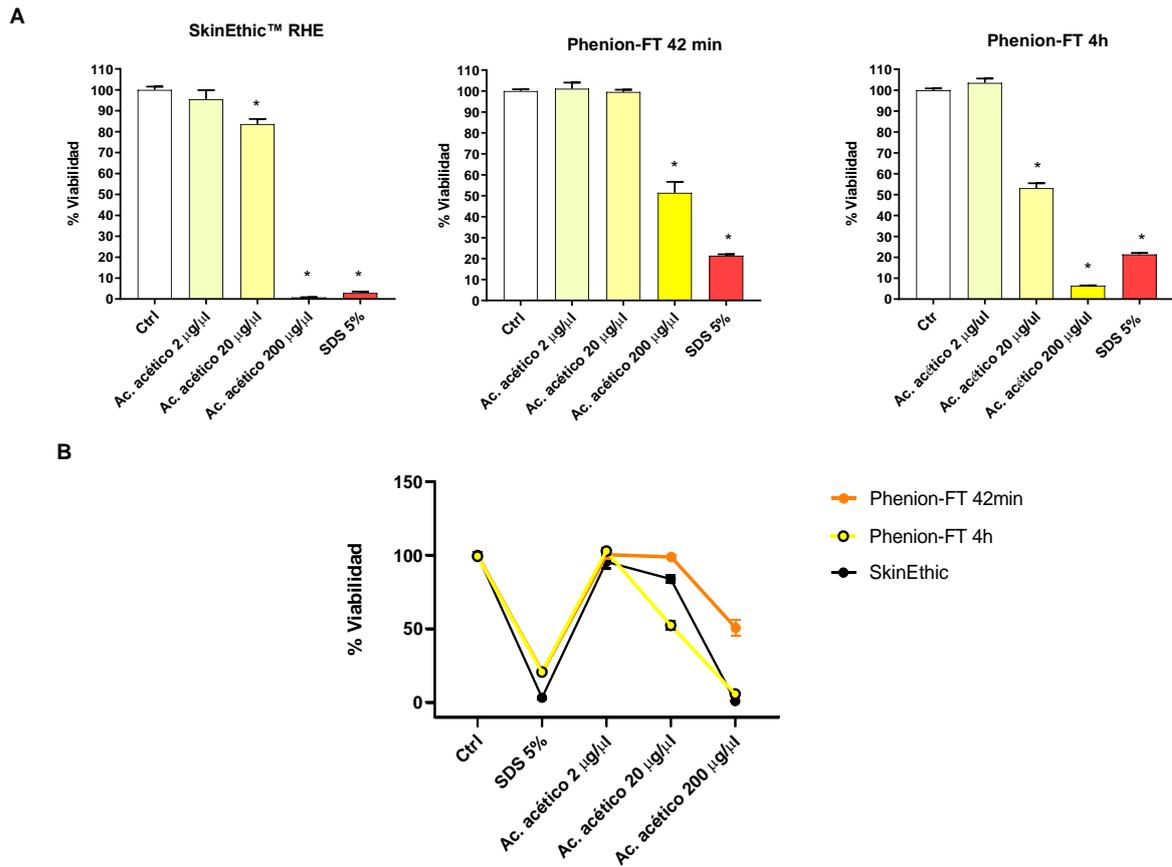


Figura 27. El tejido de piel 3D Phenion®-FT presenta mayor resistencia frente a los compuestos irritantes SDS y ácido acético que el tejido de epidermis artificial Skinethic™. (A) Ensayo de irritación en los tejidos de epidermis y epidermis + dermis SkinEthic™ y Phenion®. Los tejidos SkinEthic™ y Phenion® se incubaron con SDS 5% y ácido acético 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ durante 42 minutos o 4h y se realizó el ensayo de viabilidad MTT a las 42h o 24h respectivamente. (B) Gráfica comparativa del ensayo de irritación en los diferentes tejidos de piel artificial empleados. Todos los resultados están expresados como media \pm SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a control.

4.1.2 El tejido de piel artificial Phenion®-FT induce una mejor respuesta inflamatoria que el tejido de epidermis Skinethic™

Se cuantificaron los niveles de las citoquinas IL-1 α (Figura 28A), IL-6 (Figura 28B) e IL-8 (Figura 28C) liberadas al medio de cultivo tras la exposición al SDS 5% durante 42 minutos. Se observó, en primer lugar, un incremento de la producción de IL-1 α con respecto al control que fue de 10 veces en el caso del modelo SkinEthic™ y de 14 en el caso del modelo Phenion®-FT. Asimismo, se evaluaron las interleucinas IL-6 e IL-8, que no presentaron aumentos significativos con respecto al control tras tratar los tejidos

SkinEthic™ con SDS 5%, pero, sin embargo, en el caso de los tejidos Phenion®-FT aumentaron su liberación en 5 y 6 veces respectivamente en relación con el control.

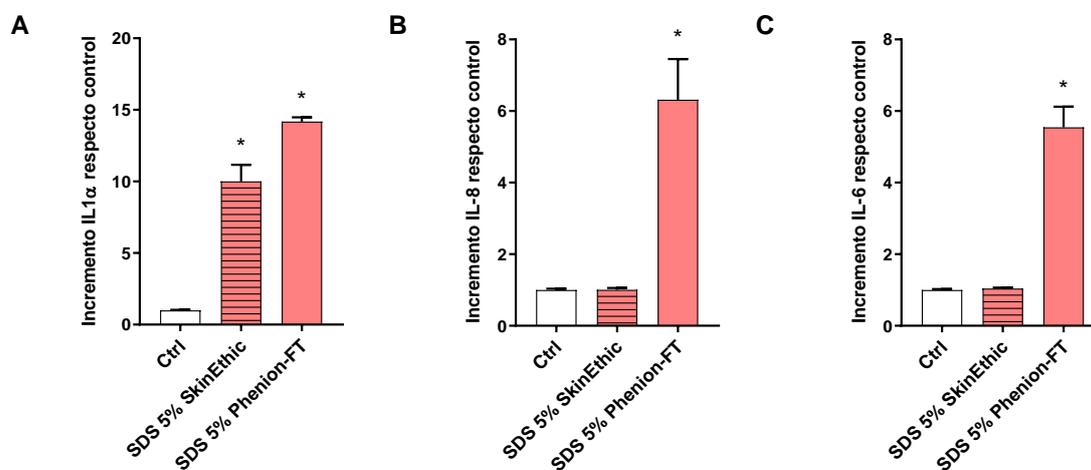


Figura 28. El tejido de piel artificial Phenion®-FT induce una mejor respuesta inflamatoria frente a los compuestos irritantes SDS y ácido acético que el tejido de epidermis Skinethic™. Los tejidos SkinEthic™ y Phenion® se incubaron con SDS 5% durante 42 minutos. 42h tras la exposición al irritante, se recogieron los sobrenadantes y se analizaron las interleucinas (A) IL-1 α , (B) IL-8 y (C) IL-6 mediante ELISA. Todos los resultados están expresados como media \pm SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a control.

4.1.3 El tejido de piel artificial Phenion®-FT tiene una arquitectura tisular similar a la piel humana y es más resistente a alteraciones morfológicas en comparación con el tejido de epidermis Skinethic™.

Con la finalidad de estudiar la morfología tisular de los modelos de piel reconstruida y verificar el efecto de la aplicación de compuestos irritantes se llevaron a cabo tinciones histológicas de hematoxilina-eosina. En la figura 29, se muestran los cortes histológicos de los modelos Skinethic™ y Phenion®-FT, así como un corte de piel humana abdominal. En el modelo de epidermis Skinethic™ se distinguen la capa de células basales, el estrato espinoso con células espinosas, la capa granular con queratinocitos cargados con gránulos de queratohialina y finalmente, el estrato córneo con queratinocitos desnucleados. El modelo Phenion®-FT presenta además de las capas epidérmicas características mencionadas, una capa dérmica formada por fibroblastos embebidos en una matriz de colágeno. Por ello, y como se observa en la Figura 29, el

modelo Phenion®-FT presenta una morfología prácticamente idéntica a la de la piel humana, debido a la presencia de epidermis y dermis.

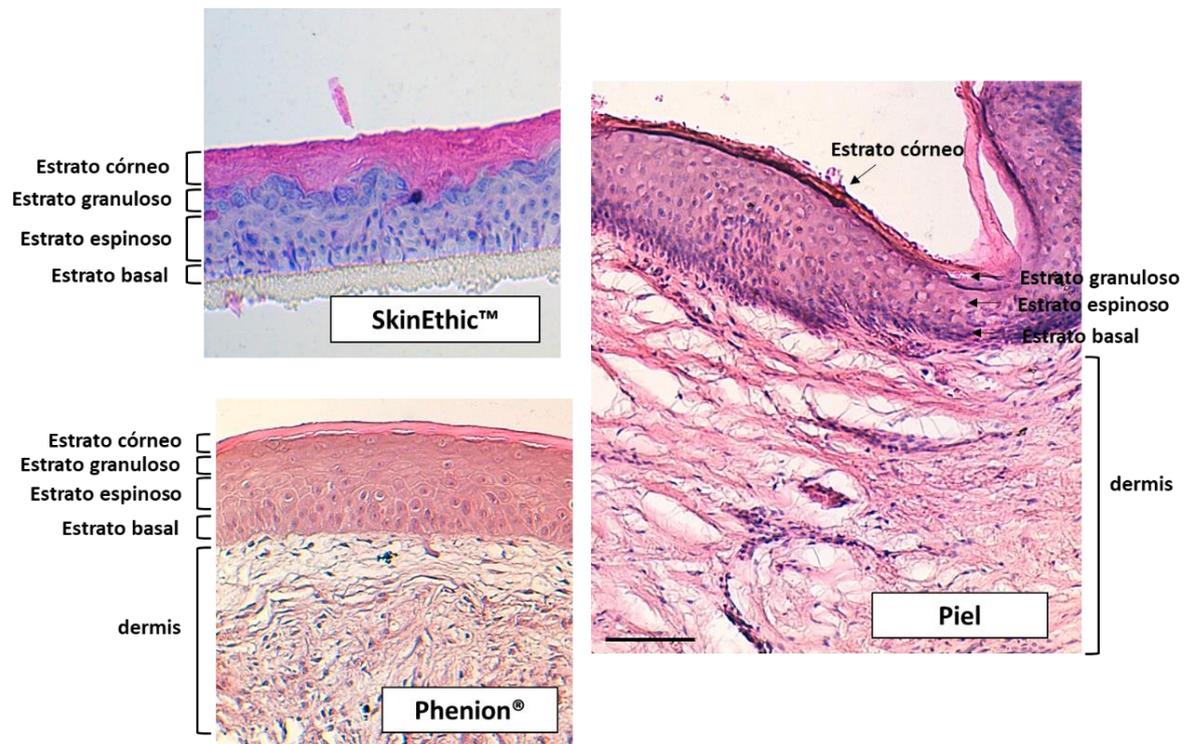


Figura 29. Comparativa de la morfología en cortes histológicos del modelo de epidermis SkinEthic™, el modelo de piel completa Phenion®-FT y piel abdominal humana. Se muestran cada una de las capas de la piel. Escala 100 μm.

En las imágenes histológicas de los tejidos tratados con SDS 5% se observó el desprendimiento de células en el estrato córneo, así como, la pérdida de queratinocitos en el estrato granuloso en el caso concreto del tejido SkinEthic™ (Figura 30A). El modelo Phenion®-FT (Figura 30B) también presentó un estrechamiento de células en el estrato córneo, más acusado cuando se trató con SDS 5% durante mayor tiempo de exposición (4h). En este tejido, la morfología tisular presentó mayor resistencia al SDS en comparación con el modelo SkinEthic™, ya que no se observa tanta pérdida de queratinocitos en las capas suprabasales.

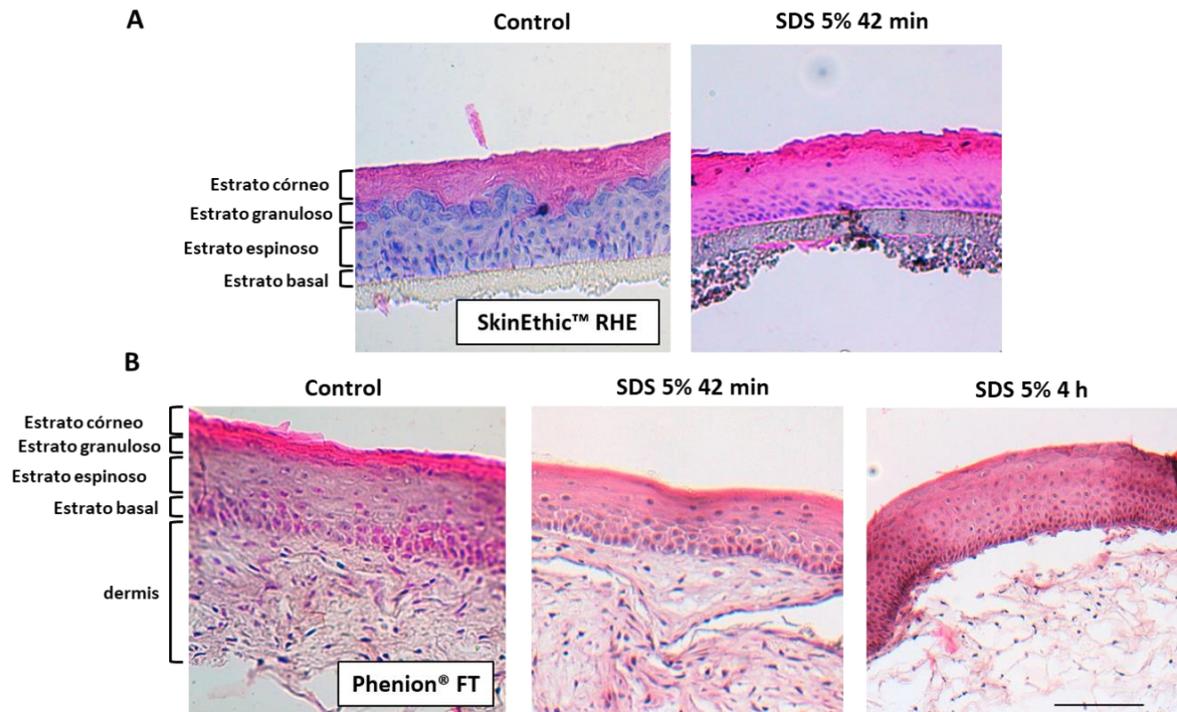


Figura 30. El tejido de piel artificial Phenion®-FT es más resistente a alteraciones morfológicas en comparación con el tejido de epidermis Skinethic™ tras el tratamiento con el compuesto irritante SDS. (A) Los tejidos de epidermis SkinEthic™ se incubaron con SDS 5% durante 42 minutos. (B) Los tejidos de epidermis + dermis Phenion®-FT se incubaron con SDS 5% durante 42 minutos o 4h. Las tinciones de hematoxilina y eosina se realizaron a partir de los cortes histológicos de dichos tejidos. Escala 100 μm .

4.2 EFECTOS DE LA RADIACIÓN SOLAR COMPLETA

4.2.1 La radiación solar completa altera la viabilidad celular e induce una respuesta inflamatoria en queratinocitos primarios y en modelos artificiales de piel 3D

Se realizaron los ensayos de viabilidad y citotoxicidad, MTT y LDH, respectivamente, así como ELISAS para evaluar los efectos de una curva de dosis crecientes de luz solar completa, sobre la citotoxicidad e inflamación.

Los queratinocitos primarios NHEK se irradiaron con dosis de 1 J/cm^2 , 2,5 J/cm^2 , 5 J/cm^2 y 10 J/cm^2 y sufrieron una disminución progresiva y significativa de la viabilidad celular (Figura 31A), acompañada por un aumento de la liberación de IL-8 (Figura 31B).

La dosis a la que se produjo la mayor liberación de IL-8 fue la de 5 J/cm², en la que la viabilidad celular era del 35±2 %.

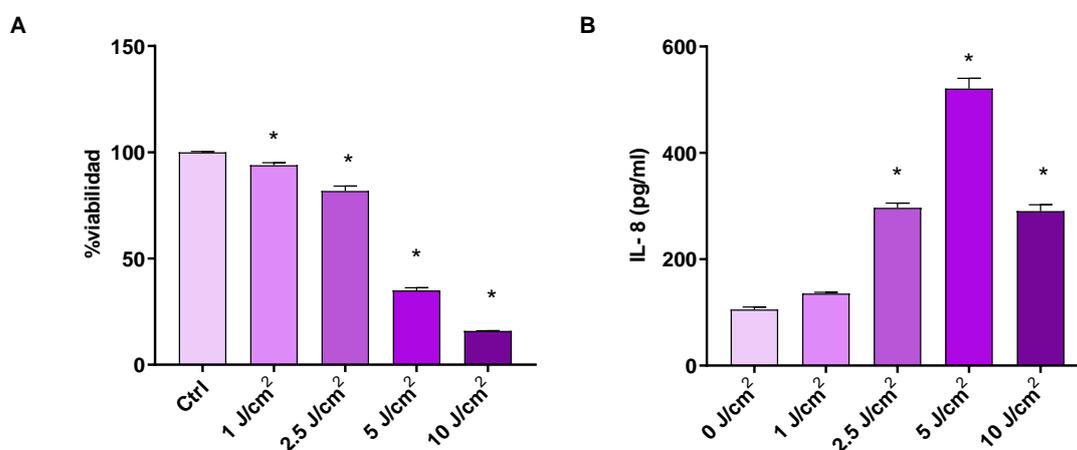


Figura 31. La radiación solar completa induce una disminución de la viabilidad en queratinocitos primarios NHEK, así como un aumento de la inflamación. Los queratinocitos primarios NHEK se irradiaron con dosis crecientes de radiación solar completa (1 J/cm², 2,5 J/cm², 5 J/cm² y 10 J/cm²). (A) 24h tras la irradiación se realizó el ensayo de viabilidad MTT y (B) se cuantificaron los niveles de citoquina IL-8 mediante ELISA. Todos los resultados están expresados como media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. **p*<0.05 respecto a control.

En el modelo SkinEthic™ se emplearon dosis más altas de luz solar completa 2 J/cm², 6 J/cm², 12 J/cm² y 18 J/cm², que se mantuvieron para el resto de los experimentos y la viabilidad celular se redujo progresivamente hasta alcanzar un 57,76±8,98% a la dosis de 18 J/cm² (Figura 32A). Esta disminución de la viabilidad vino acompañada de un aumento de la citotoxicidad significativo a las dosis de 12 J/cm² y 18 J/cm² (Figura 32 B,C). En el caso del tejido Phenion®-FT, debido a los resultados previos del estudio de irritación, se decidieron emplear dosis más altas que en el modelo de epidermis sola, por su esperable mayor resistencia. Por ello, las dosis de luz solar en este caso fueron 4 J/cm², 12 J/cm², 20 J/cm², 30 J/cm² y 40 J/cm². La elección de estas dosis se mantuvo también para el resto de los experimentos. En Phenion®-FT, solo la dosis más alta disminuyó significativamente la viabilidad celular, medida mediante ensayo MTT hasta un 63,24±15% (Figura 32D). No obstante, en este caso la citotoxicidad producida no fue proporcional a la disminución de la viabilidad, ya que los aumentos de citotoxicidad significativos se observaron a las dosis de 12 J/cm² y 20 J/cm² (Figura 32 E,F).

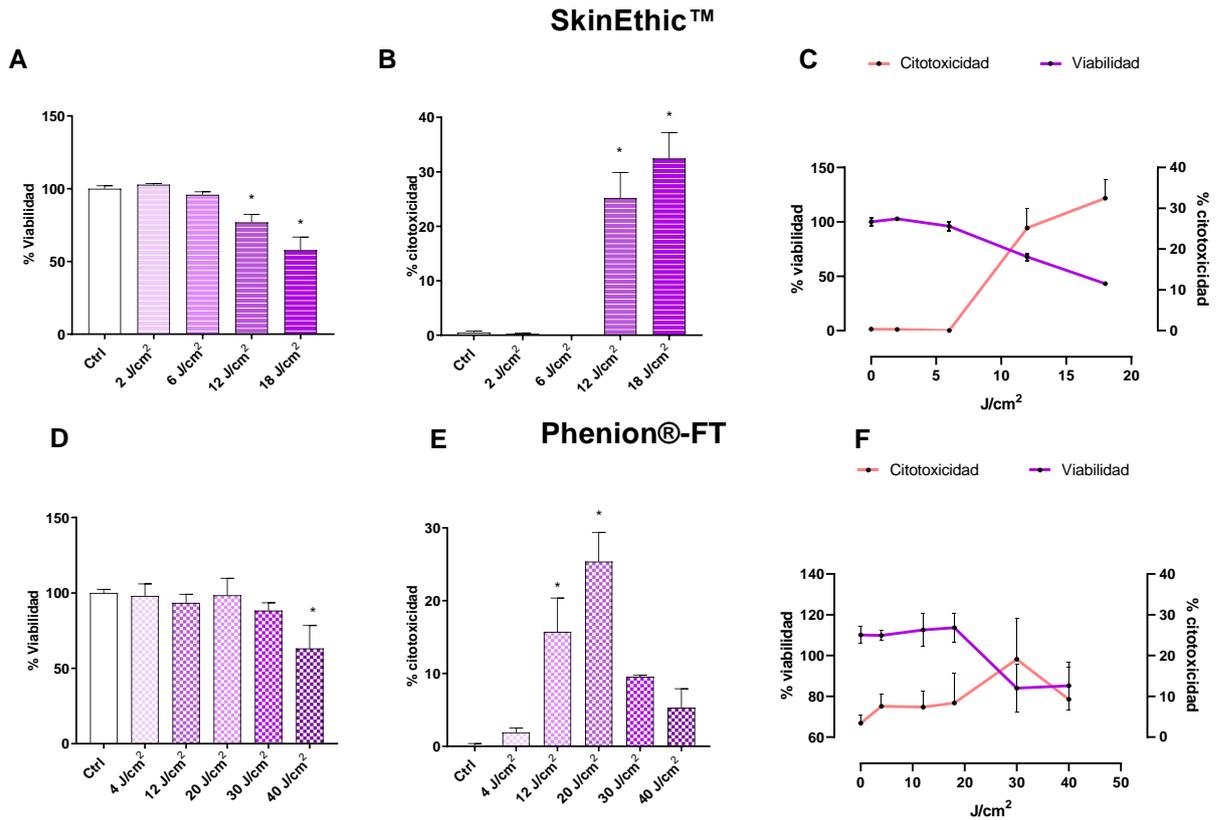


Figura 32. La radiación solar completa induce una disminución de la viabilidad y aumento de citotoxicidad en los modelos de piel 3D SkinEthic™ Y Phenion®-FT. Los tejidos SkinEthic™ se irradiaron con dosis crecientes de radiación solar completa 2 J/cm², 6 J/cm², 12 J/cm² y 18 J/cm². (A) 24h tras la irradiación se realizó el ensayo de viabilidad MTT y (B) ensayo de citotoxicidad LDH. (C) Comparativa de viabilidad citotoxicidad en SkinEthic™. Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron con dosis crecientes de radiación solar completa 4 J/cm², 12 J/cm², 20 J/cm², 30 J/cm² y 40 J/cm². (D) 24h tras la irradiación se realizó el ensayo de viabilidad MTT y (E) ensayo de citotoxicidad LDH. (F) Comparativa de viabilidad citotoxicidad en Phenion®-FT. Todos los resultados están expresados como media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. *p<0.05 respecto a control.

Por lo que respecta a la respuesta inflamatoria, en el modelo SkinEthic™, la radiación solar indujo un aumento significativo de la liberación de las citoquinas IL-1α e IL-8 a las dosis más altas de 12 J/cm² y 18 J/cm² (Figura 33A, C). Estas dosis indujeron también un ligero aumento de la citoquina IL-6, pero muy lejos de las concentraciones alcanzadas con las otras dos citoquinas (Figura 33B). En el caso de Phenion®-FT, las citoquinas se produjeron con tendencia de campana, es decir se produjo un incremento en la liberación de IL-1α, IL-6 e IL-8 hasta la dosis de 20 J/cm², y a partir de esta dosis empezaron a descender (Figura 33 D-F).

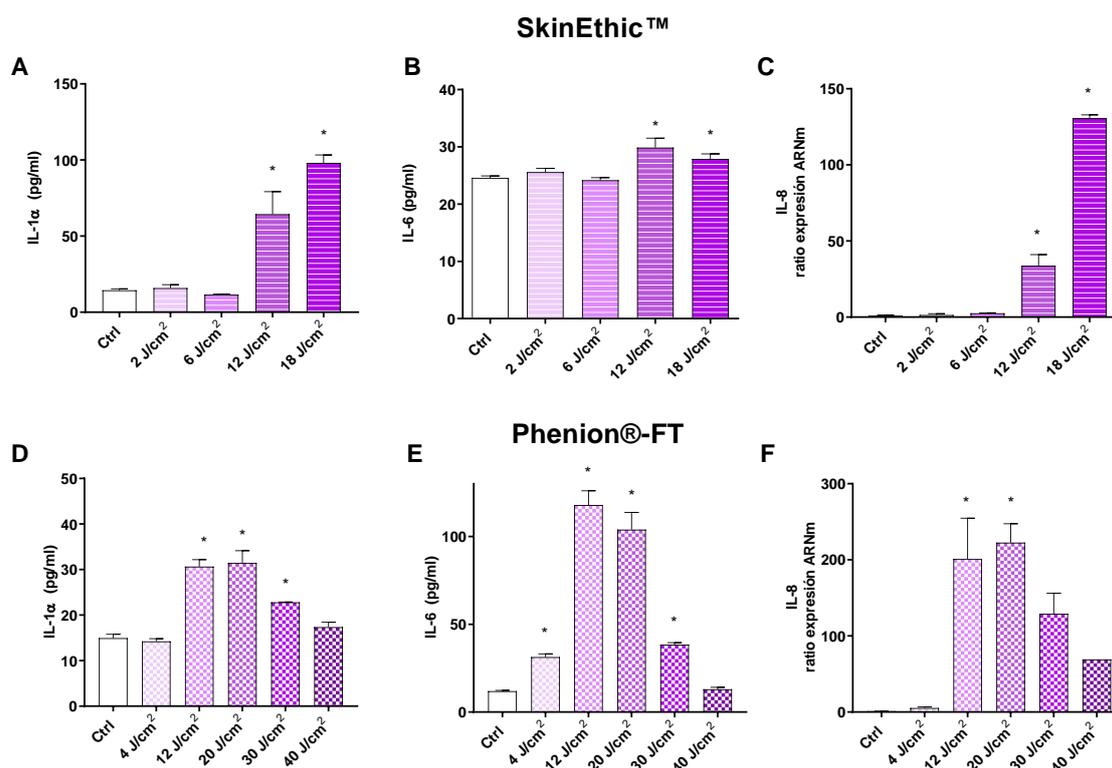


Figura 33. La radiación solar completa induce la producción de citoquinas inflamatorias en los modelos de piel 3D SkinEthic™ Y Phenion®-FT. Los tejidos SkinEthic™ se irradiaron con dosis crecientes de radiación solar completa 2 J/cm², 6 J/cm², 12 J/cm² y 18 J/cm². 24h tras la irradiación se cuantificaron los niveles de las interleucinas (A) IL-1α, (B) IL-6 y (C) IL-8 mediante ELISA. Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron con dosis crecientes de radiación solar completa 4 J/cm², 12 J/cm², 20 J/cm², 30 J/cm² y 40 J/cm². 24h tras la irradiación se cuantificaron los niveles de las interleucinas (D) IL-1α, (E) IL-6 y (F) IL-8 mediante ELISA. Todos los resultados están expresados como media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. *p<0.05 respecto a control.

4.2.2 La radiación solar completa modula la expresión génica de marcadores dérmicos y epidérmicos en modelos artificiales de piel 3D.

Se realizó el análisis de expresión génica mediante PCR para evaluar los efectos de una curva de dosis crecientes de luz solar completa, sobre la modulación de distintos biomarcadores. Los resultados de la RT-PCR se presentan como un mapa de calor donde los tonos más claros indican una menor expresión génica y los tonos más oscuros representan una mayor expresión, tal como se indica en las leyendas de las Figuras 34 y 35. En los tejidos SkinEthic™, los genes DCN, MMP9, MMP1 e IVL

aumentaron la expresión génica a medida que aumentó la dosis de radiación, mientras que los genes COL7A1 y ELN aumentaron a dosis bajas, pero a las dosis más altas disminuyen su expresión génica (Figura 34). Como se observa en la Figura 35, este patrón de expresión en el que las dosis bajas de radiación inducen una sobreexpresión, mientras que dosis altas la disminuyen, se observó también en los marcadores DCN, MMP9, MMP1, COL7A1 y IVL en los tejidos Phenion®-FT. El único marcador que no siguió este patrón fue ELN, que disminuyó progresivamente a medida que aumentó la dosis de radiación solar completa.

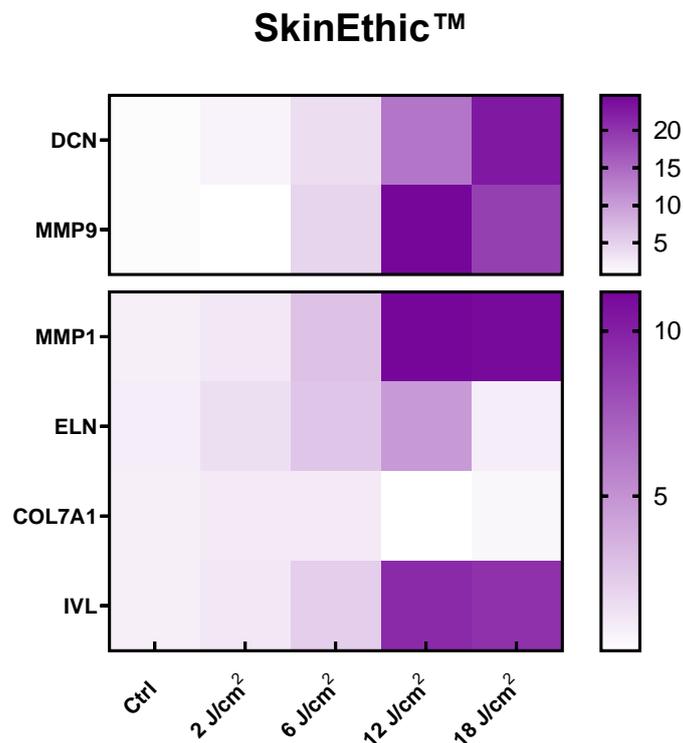


Figura 34. La radiación solar completa modula la expresión génica de marcadores dérmicos y epidérmicos en los tejidos de epidermis artificial SkinEthic™. Los tejidos SkinEthic™ se irradiaron con dosis crecientes de radiación solar completa 2 J/cm², 6 J/cm², 12 J/cm² y 18 J/cm². 24h tras la irradiación y mediante PCR a tiempo real, se midieron los niveles de expresión génica de los siguientes genes: Decorina (DCN), metaloproteinasas 1 y 9 (MMP1, MMP9), elastina (ELN), colágeno tipo 1 alfa 1 (COL1A1), colágeno tipo 7 alfa 1 (COL7A1) e involucrina (IVL). Los resultados se representan mediante un mapa de calor como la media del incremento de expresión génica.

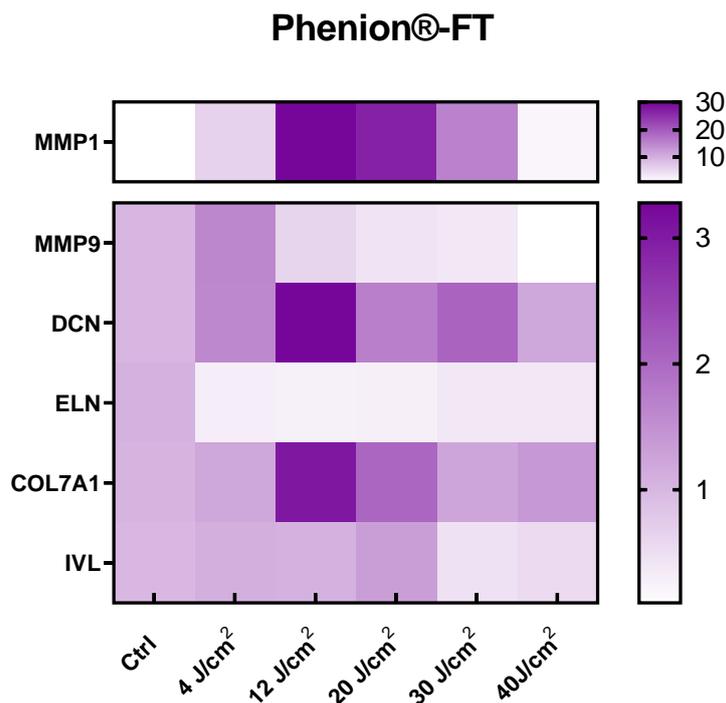


Figura 35. La radiación solar completa modula la expresión génica de marcadores dérmicos y epidérmicos en los tejidos de piel artificial Phenion®-FT. Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron con dosis crecientes de radiación solar completa 4 J/cm², 12 J/cm², 20 J/cm², 30 J/cm² y 40 J/cm². 24h tras la irradiación y mediante PCR a tiempo real, se midieron los niveles de expresión génica de los siguientes genes: Decorina (DCN), metaloproteinasas 1 y 9 (MMP1, MMP9), elastina (ELN), colágeno tipo 7 alfa 1 (COL7A1) e involucrina (IVL). Los resultados se representan mediante un mapa de calor como la media del incremento de expresión génica.

4.2.3 La radiación solar completa induce el aumento del estrés oxidativo y la formación de dímeros de timina en queratinocitos primarios y en modelos artificiales de piel 3D

Los queratinocitos primarios NHEK produjeron una liberación de ERO significativa tras ser irradiados con las dosis de 2,5 J/cm² y 5 J/cm² y medido mediante citometría de flujo (Figura 36 A). En el caso de los tejidos de piel 3D, el estrés oxidativo se midió mediante las variaciones en la expresión del gen antioxidante GPX1 (Figura 36 B, C). En ambos casos se observó el aumento significativo de GPX1 a las dosis más altas: 18 J/cm² en SkinEthic™ y 40 J/cm² en Phenion®-FT.

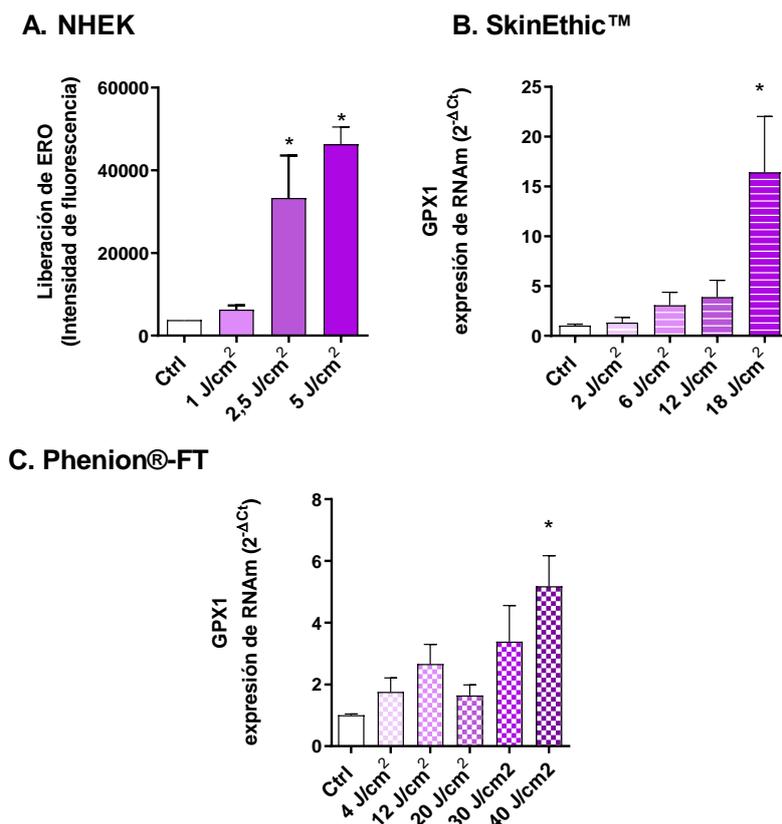


Figura 36. La radiación solar completa induce la liberación de especies reactivas de oxígeno en queratinocitos primarios NHEK y aumenta los niveles de expresión del antioxidante glutatión peroxidasa 1 en SkinEthic™ y Phenion®-FT. (A) Los queratinocitos primarios NHEK se irradiaron con dosis crecientes de radiación solar completa (1 J/cm², 2,5 J/cm² y 5 J/cm²) y se analizaron los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) mediante citometría de flujo con la sonda CM-H₂DCFDA. (B) Los tejidos SkinEthic™ se irradiaron con dosis crecientes de radiación solar completa 2 J/cm², 6 J/cm², 12 J/cm² y 18 J/cm². 24h tras la irradiación, se midieron los niveles de expresión génica de glutatión peroxidasa 1 (GPX1) mediante PCR a tiempo real. (C) Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron con dosis crecientes de radiación solar completa 4 J/cm², 12 J/cm², 20 J/cm², 30 J/cm² y 40 J/cm². 24h tras la irradiación, se midieron los niveles de expresión génica de glutatión peroxidasa 1 (GPX1) mediante PCR a tiempo real. Todos los resultados están expresados como media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. *p<0.05 respecto a control.

Asimismo, se evaluó la generación de dímeros de timina en los queratinocitos NHEK mediante citometría de flujo. Como se observa en la Figura 37A, los dímeros de timina aumentaron significativamente tras la exposición a la luz solar completa a una dosis de 5 J/cm². En los tejidos Phenion®-FT los dímeros de timina se evaluaron mediante marcaje inmunohistológico. Como se observa en la Figura 37B, la radiación solar de 25 J/cm² produjo el aumento del marcaje (marrón) con respecto al control.

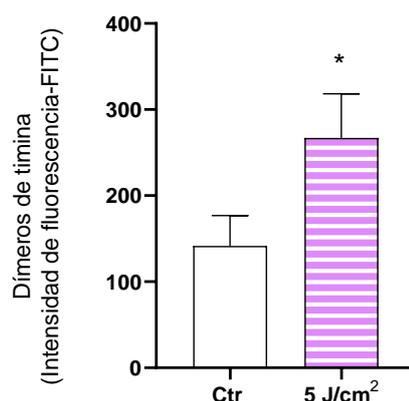
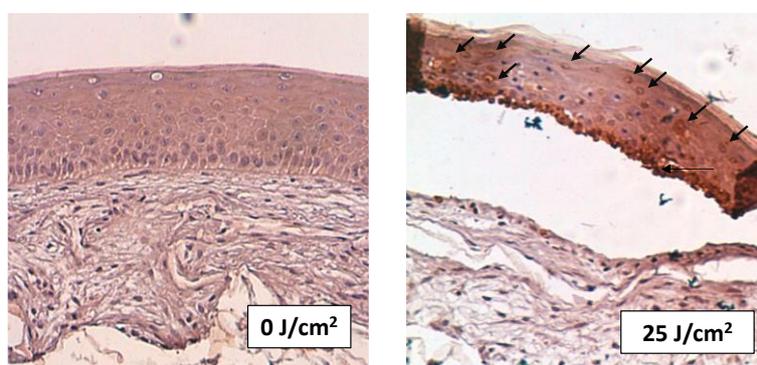
A.NHEK**B. Phenion®-FT**

Figura 37. La radiación solar completa induce la formación de dímeros de timina en queratinocitos primarios NKEK y en el tejido de piel 3D Phenion®-FT. (A) Los queratinocitos primarios NHEK se irradiaron con una dosis de 5 J/cm² de radiación solar completa y se analizaron los niveles de dímeros de timina mediante citometría de flujo. Todos los resultados están expresados como la media \pm SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. * $p < 0.05$ respecto al grupo control. (B) Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron con 25 J/cm² y se realizó, a partir de cortes histológicos, el marcaje de los dímeros de timina mediante inmunohistoquímica. Las flechas indican las células positivas para dímeros de timina.

4.2.4 La radiación solar completa afecta a la arquitectura tisular de los tejidos de epidermis y piel artificial Skinethic™ y Phenion®-FT

Los efectos de la luz solar completa en la morfología tisular de los modelos de piel reconstruida se evaluaron mediante tinción de hematoxilina eosina. En los tejidos SkinEthic™, a las dosis de 12 J/cm² y 18 J/cm² se observó la muerte de los queratinocitos de la epidermis, que se acumulan en la capa suprabasal (Figura 38). Del mismo modo, los tejidos Phenion®-FT mostraron efectos visibles de la luz solar completa desde la dosis de 12 J/cm² y hasta la de 40 J/cm² (Figura 39). En este caso, se

produjo la debilitación de la unión dermo-epidérmica y, por tanto, la separación entre la dermis y la epidermis durante el manejo histológico. A las dosis más altas, se observaron núcleos picnóticos en el estrato basal, más pequeños y oscuros, y caracterizados por la condensación de la cromatina. Estos cambios en los queratinocitos epidérmicos suelen preceder a la muerte celular y se definen como células quemadas por el sol, del inglés “sunburn cells”. Asimismo, se observó la pérdida de la adhesión celular en los estratos granuloso y espinoso y la vacuolización perinuclear de los queratinocitos, caracterizada por la formación de vacuolas citoplasmáticas alrededor de núcleos picnóticos.

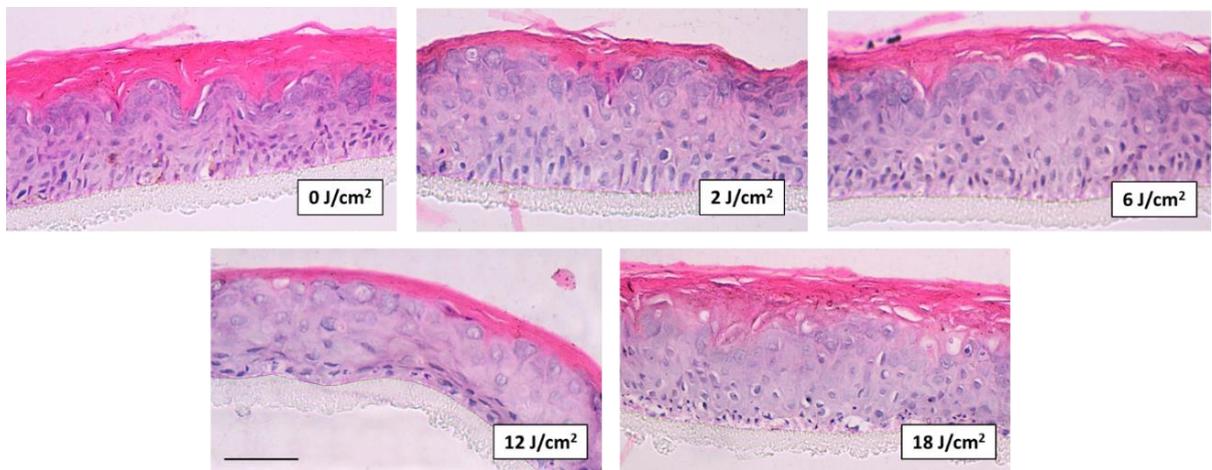


Figura 38. La radiación solar completa afecta a la arquitectura tisular del tejido de epidermis SkinEthic™. Los tejidos SkinEthic™ se irradiaron con dosis crecientes de radiación solar completa 2 J/cm², 6 J/cm², 12 J/cm² y 18 J/cm². Las tinciones de hematoxilina y eosina se realizaron a partir de los cortes histológicos de dichos tejidos. Escala 100 μm.

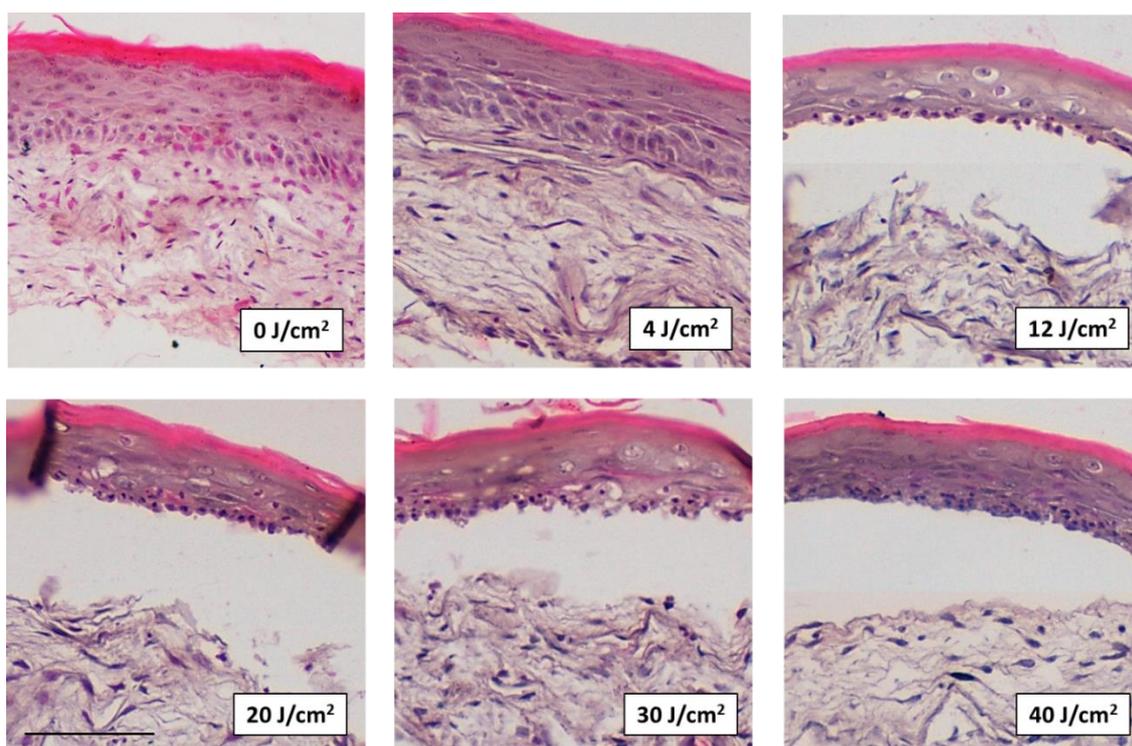


Figura 39. La radiación solar completa afecta a la arquitectura tisular del tejido de piel Phenion®-FT. Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron con dosis crecientes de radiación solar completa 4 J/cm², 12 J/cm², 20 J/cm², 30 J/cm² y 40 J/cm². Las tinciones de hematoxilina y eosina se realizaron a partir de los cortes histológicos de dichos tejidos. Escala 100 μm.

4.2.5 La radiación solar completa induce la modulación de la expresión de p21 y p53 en Phenion®-FT

Para evaluar las variaciones en la expresión de los genes p21 y p53, se analizó la expresión génica por RT-PCR y la protéica mediante Western Blot. Tras la exposición de los tejidos Phenion®-FT a radiación solar completa, la expresión génica de p53 no mostró variaciones significativas mientras que la de p21 disminuyó progresivamente con el aumento de la dosis de luz solar y de manera significativa a partir de la dosis de 12 J/cm² (Figura 40A). Por el contrario, en la expresión protéica si se pudo observar un aumento significativo de p53 tras irradiar con 12 y 20 J/cm², y, coincidiendo con los resultados de la expresión génica, la expresión protéica de p21 disminuyó significativamente en todas las dosis (figura 40B).

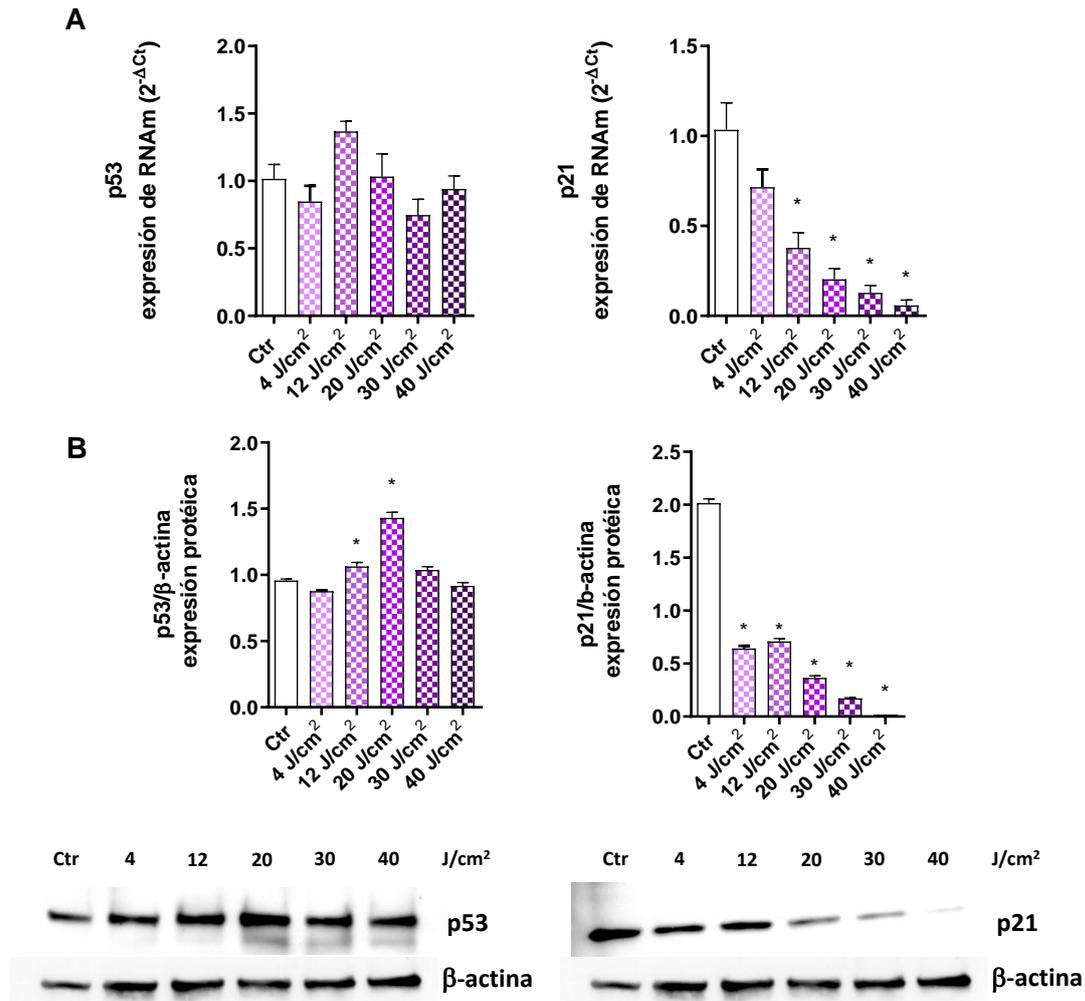


Figura 40. La radiación solar completa induce la modulación de la expresión génica y protéica de p21 y p53. (A) Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron con dosis crecientes de radiación solar completa 4 J/cm², 12 J/cm², 20 J/cm², 30 J/cm² y 40 J/cm². 24h tras la irradiación, se midieron los niveles de expresión génica de p21 y p53 mediante PCR a tiempo real. (B) Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron con dosis crecientes de radiación solar completa, 4 J/cm², 12 J/cm², 20 J/cm², 30 J/cm² y 40 J/cm². 24h tras la irradiación, se midieron los niveles de expresión protéica mediante western blot. Los diagramas de barras representan los datos de densitometría de la proteína, respecto al control constitutivo. Todos los resultados están expresados como media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. *p<0.05 respecto a control.

Tras evaluar los efectos de la radiación solar completa en los dos modelos de epidermis artificial SkinEthic™ y de piel completa Phenion®-FT, se observó que el segundo, por su mayor complejidad estructural y la posibilidad de intercomunicación entre queratinocitos epidérmicos y fibroblastos dérmicos, ofrece una mayor resistencia y la posibilidad de evaluar más marcadores. Por esta razón, se decidió

continuar el resto de las evaluaciones del espectro con el modelo de piel completa Phenion®-FT

4.3 EFECTOS DE LA RADIACIÓN UVA SOLA

4.3.1 La radiación UVA altera la viabilidad celular e induce una respuesta inflamatoria en queratinocitos primarios y en el modelo de piel 3D Phenion®-FT

Se realizaron los ensayos de viabilidad y citotoxicidad, MTT y LDH, respectivamente, así como ELISAS para evaluar los efectos de una curva de dosis crecientes de luz UVA, sobre la citotoxicidad e inflamación.

Los queratinocitos primarios NHEK se irradiaron con dosis de UVA 2,5 J/cm², 5 J/cm², 6 J/cm², 7 J/cm², 8 J/cm², 9 J/cm², 10 J/cm², 15 J/cm² y 20 J/cm². A partir de la dosis de 5 J/cm², los NHEK sufrieron una disminución significativa de la viabilidad celular (Figura 41A) que no bajó del 50% de viabilidad. Esta reducción vino acompañada por un aumento de la citotoxicidad significativo con respecto al control sin irradiar (Figura 41B). En cuanto a la liberación de citoquinas inflamatorias, solo las dosis más bajas (2,5 J/cm², 5 J/cm²) indujeron un aumento de la producción de IL-8. La dosis a la que se produjo la mayor liberación de IL-8 fue la de 5 J/cm², en la que la viabilidad celular era del 77.4±1.98 % (Figura 41C)

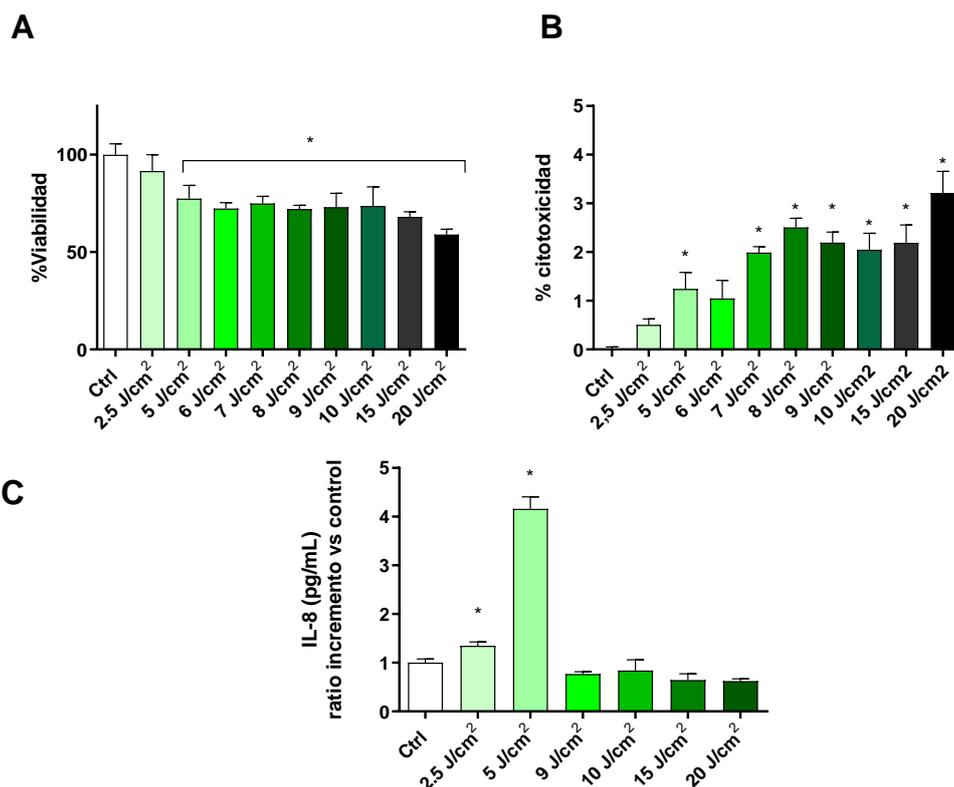


Figura 41. La radiación UVA induce una disminución de la viabilidad y aumento de la citotoxicidad, así como un aumento de la inflamación, en queratinocitos primarios NHEK. Los queratinocitos primarios NHEK se irradiaron con dosis crecientes de radiación UVA (2,5 J/cm², 5 J/cm², 6 J/cm², 7 J/cm², 8 J/cm², 9 J/cm², 10 J/cm², 15 J/cm² y 20 J/cm²). 24h tras la irradiación se realizaron: (A) Ensayo de viabilidad MTT. (B) Ensayo de citotoxicidad LDH y (C) se cuantificaron los niveles de citoquina IL-8 mediante ELISA. Todos los resultados están expresados como media \pm SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a control.

En el caso del tejido Phenion®-FT, las dosis de UVA elegidas fueron 10 J/cm², 20 J/cm², 30 J/cm² y 40 J/cm². La elección de estas dosis se mantuvo también para el resto de experimentos. En todas las dosis, la viabilidad celular se mantuvo sin variaciones significativas (Figura 42A, C), siendo el valor más bajo de viabilidad del $78,5 \pm 6.5$ %. Sin embargo, sí que se observó un aumento de citotoxicidad significativo en la dosis de UVA más alta 40 J/cm² (Figura 42 B, C).

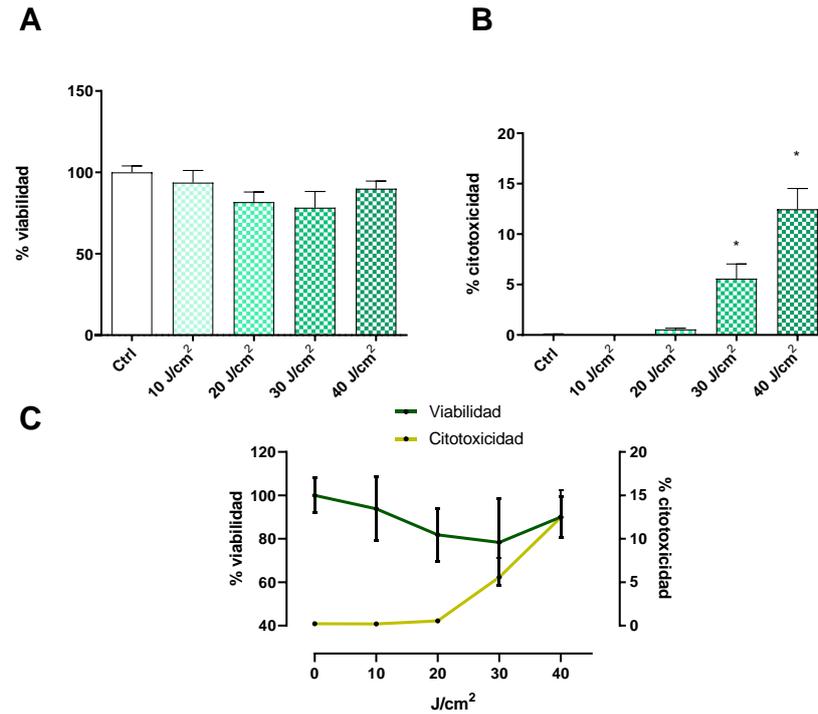


Figura 42. La radiación UVA induce una disminución de la viabilidad y aumento de citotoxicidad en el modelo de piel 3D Phenion®-FT. Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron con dosis crecientes de radiación UVA 10 J/cm², 20 J/cm², 30 J/cm² y 40 J/cm². (A) 24h tras la irradiación se realizó el ensayo de viabilidad MTT y (B) ensayo de citotoxicidad LDH. (C) Gráfica comparativa de viabilidad y citotoxicidad en Phenion®-FT irradiado con UVA. Todos los resultados están expresados como media \pm SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a control.

Por lo que respecta a la respuesta inflamatoria, en el modelo Phenion®-FT, la radiación UVA indujo un aumento progresivo de la liberación de las citoquinas IL-1 α , IL-6 y IL-8, siendo significativos los aumentos a las dosis más altas (Figura 43A-C).

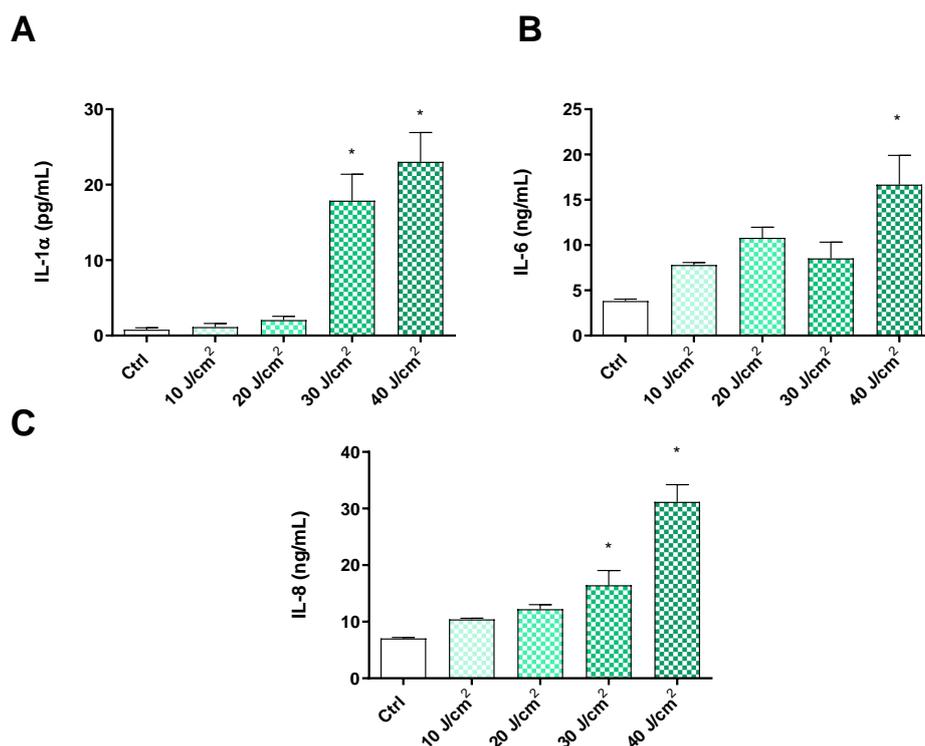


Figura 43. La radiación UVA induce la producción de citoquinas inflamatorias en el modelo de piel 3D Phenion®-FT. Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron con dosis crecientes de UVA 10 J/cm², 20 J/cm², 30 J/cm² y 40 J/cm². 24h tras la irradiación se cuantificaron los niveles de las interleucinas (A) IL-1α, (B) IL-6 y (C) IL-8 mediante ELISA. Todos los resultados están expresados como media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. **p*<0.05 respecto a control.

4.3.2 La radiación UVA modula la expresión génica de marcadores dérmicos y epidérmicos en el modelo de piel 3D Phenion®-FT.

Se realizó el análisis de expresión génica mediante PCR para evaluar los efectos de una curva de dosis crecientes de luz UVA, sobre la modulación de distintos biomarcadores. Los resultados de la RT-PCR se presentan como un mapa de calor donde los tonos más claros indican una menor expresión génica y los tonos más oscuros representan una mayor expresión. Como se observa en la Figura 44, al exponer a los tejidos Phenion®-FT a la luz UVA se observó una modulación de la expresión génica en forma de campana, aumentando a dosis bajas y disminuyendo a dosis altas, en el caso de los genes DCN y ELN. Por otra parte, los marcadores MMP1 y COL7A1 aumentaron su expresión mientras que MMP9 la disminuyó.

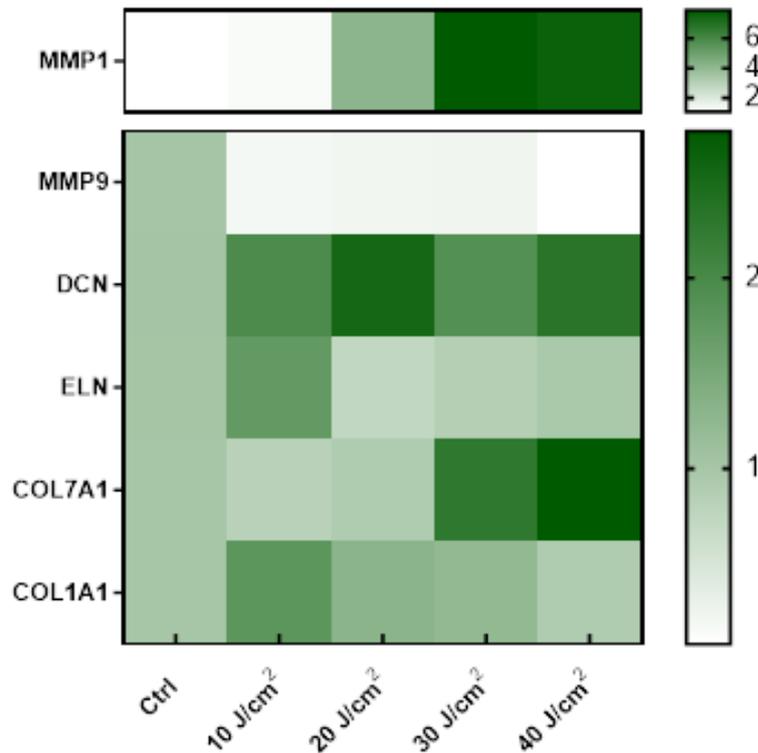


Figura 44. La radiación UVA modula la expresión génica de marcadores dérmicos y epidérmicos en el tejido de piel artificial Phenion®-FT. Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron con dosis crecientes de radiación UVA 10 J/cm², 20 J/cm², 30 J/cm² y 40 J/cm². 24h tras la irradiación, mediante PCR a tiempo real, se midieron los niveles de expresión génica de los siguientes genes: Decorina (DCN), metaloproteinasas 1 y 9 (MMP1, MMP9), elastina (ELN), colágeno tipo 1 alfa 1 (COL1A1), colágeno tipo 7 alfa 1 (COL7A1). Los resultados se representan mediante un mapa de calor como la media del incremento de expresión génica.

4.3.3 La radiación UVA induce el aumento del estrés oxidativo y la formación de dímeros de timina en queratinocitos primarios y en el modelo de piel 3D Phenion®-FT.

Se evaluó la generación de dímeros de timina en los queratinocitos NHEK mediante citometría de flujo. Como se observa en la Figura 45A, los dímeros de timina aumentaron significativamente tras la exposición a la luz UVA a una dosis de 5 J/cm². En los tejidos Phenion®-FT los dímeros de timina se evaluaron mediante marcaje inmunohistológico. Como se observa en la figura 45C, la radiación UVA de 20 J/cm² produjo el aumento del marcaje (marrón) con respecto al control.

También, se midió el estrés oxidativo en los tejidos Phenion®-FT de piel 3D, mediante las variaciones en la expresión del gen antioxidante GPX1 (Figura 45 B, C). Dosis

crecientes de luz UVA produjeron la sobreexpresión de GPX1, significativa en a las dosis más altas 30 J/cm² y 40 J/cm².

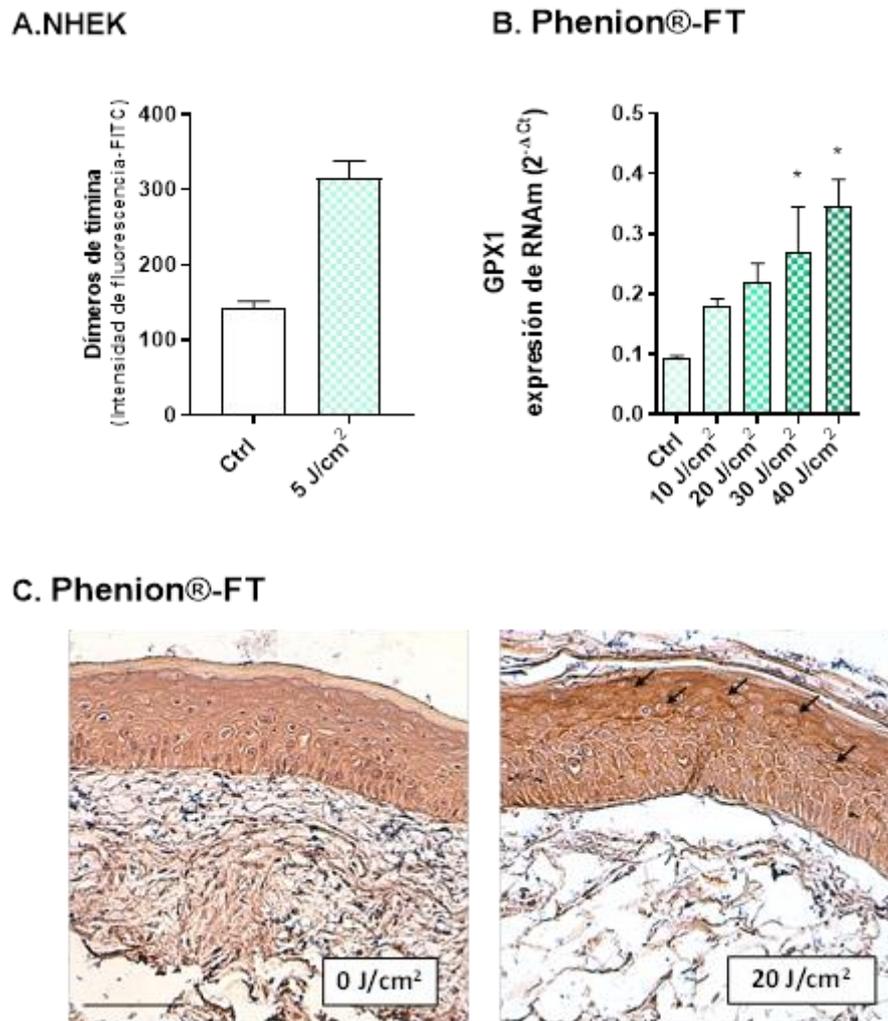


Figura 45. La radiación UVA induce la formación de dímeros de timina en queratinocitos primarios NHEK y en el tejido de piel 3D Phenion®-FT además de aumentar los niveles de expresión del antioxidante glutatión peroxidasa 1 en Phenion®-FT. (A) Los queratinocitos primarios NHEK se irradiaron con una dosis de 5 J/cm² de UVA y se analizaron los niveles de dímeros de timina mediante citometría de flujo. Todos los resultados están expresados como la media \pm SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante t test. * $p < 0.05$ respecto al grupo control. (B) Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron con dosis crecientes de radiación UVA 10 J/cm², 20 J/cm², 30 J/cm² y 40 J/cm². 24h tras la irradiación, se midieron los niveles de expresión génica de glutatión peroxidasa 1 (GPX1) mediante PCR a tiempo real. * $p < 0.05$ respecto a control. Se realizó, a partir de cortes histológicos, el marcaje de los dímeros de timina mediante inmunohistoquímica. Las flechas indican las células positivas para dímeros de timina. (C) Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron con 20 J/cm² de radiación UVA. Se realizó, a partir de cortes histológicos, el marcaje de los dímeros de timina mediante inmunohistoquímica. Las flechas indican las células positivas para dímeros de timina. Todos los resultados están expresados como media \pm SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni.

4.3.4 La radiación UVA afecta a la arquitectura tisular del modelo de piel 3D Phenion®-FT

Los efectos de la luz UVA en la morfología tisular de los tejidos Phenion®-FT se evaluó mediante tinción de hematoxilina eosina. La irradiación con UVA indujo la pérdida de fibroblastos dérmicos en todas las dosis. Además, en las dosis de 20 J/cm² y 30 apareció el inicio de la vacuolización de los queratinocitos epidérmicos que se pudo observar con un mayor porcentaje en la dosis de 40 J/cm². En esta dosis más alta, es donde los efectos de la luz UVA fueron más acusados, destacando la muerte de queratinocitos y fibroblastos y la presencia de núcleos picnóticos en el estrato basal (Figura 46).

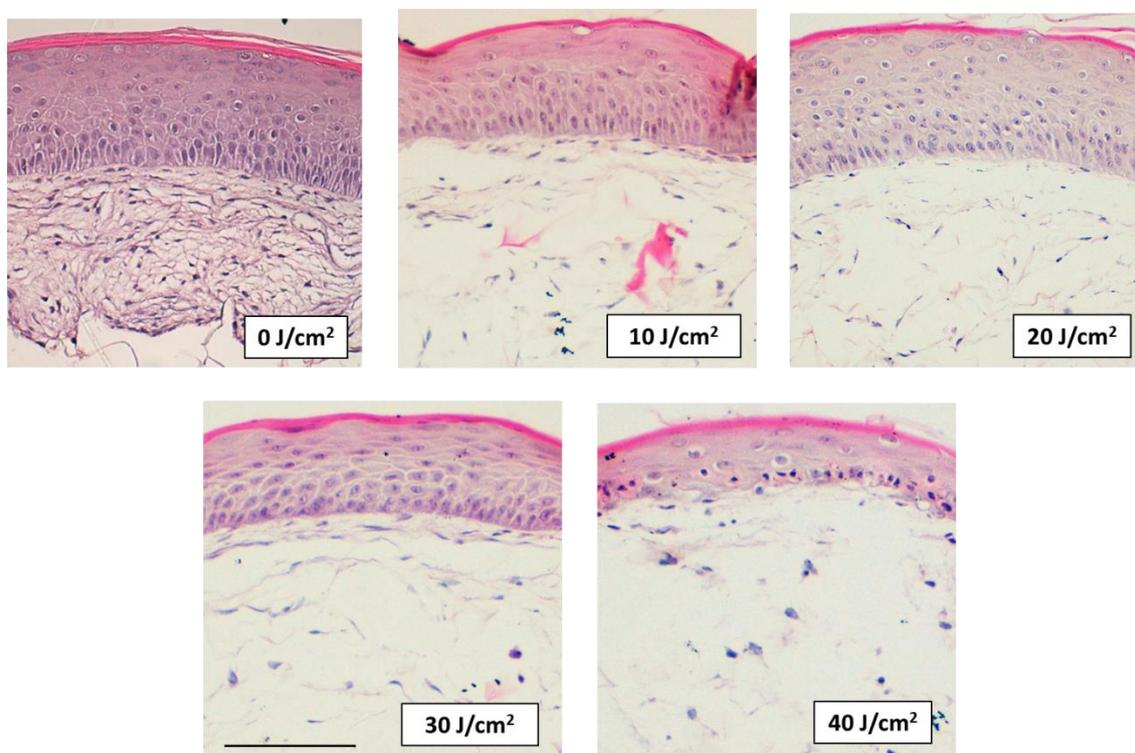


Figura 46. La radiación UVA afecta a la arquitectura tisular del tejido de piel 3D Phenion®-FT. Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron con dosis crecientes de UVA, 10 J/cm², 20 J/cm², 30 J/cm² y 40 J/cm². Las tinciones de hematoxilina y eosina se realizaron a partir de los cortes histológicos de dichos tejidos. Escala 100 μ m.

4.3.5 La radiación UVA induce la modulación de la expresión de p21 y p53 en el modelo de piel 3D Phenion®-FT

Para evaluar las variaciones en la expresión de los genes p21 y p53, se analizó la expresión génica por RT-PCR y la protéica mediante Western Blot. Tras la exposición de los tejidos Phenion®-FT a radiación UVA, la expresión génica de p53 no mostró variaciones significativas mientras que la de p21 aumentó significativamente a la dosis más baja de 10 J/cm², dosis a partir de la cual descendió la expresión (Figura 47A). Por otra parte, en la expresión protéica p53 aumentó hasta los 20 J/cm² y luego descendió dejando un perfil de expresión en forma de campana. P21 por su parte mostró un descenso progresivo de la expresión protéica significativa en todas las dosis (figura 47B).

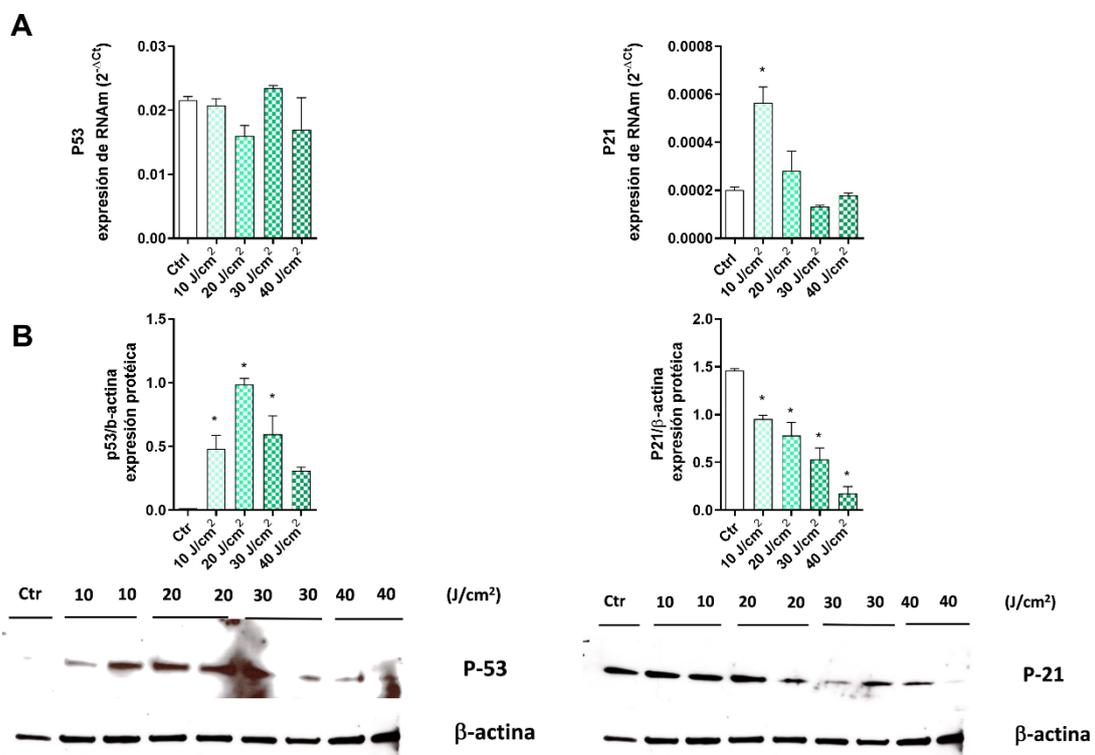


Figura 47. La radiación UVA induce la modulación de la expresión génica y protéica de p21 y p53. Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron con dosis crecientes de radiación UVA 10 J/cm², 20 J/cm², 30 J/cm² y 40 J/cm². (A) 24h tras la irradiación, se midieron los niveles de expresión génica de p21 y p53 mediante PCR a tiempo real. (B) 24h tras la irradiación, se midieron los niveles de expresión protéica mediante western blot. Los diagramas de barras representan los datos de densitometría de la proteína, respecto al control constitutivo. Todos los resultados están expresados como media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. *p<0.05 respecto a control.

4.4 EFECTOS DE LA LUZ AZUL

4.4.1 La luz azul afecta a la viabilidad y citotoxicidad celular, pero no induce una respuesta inflamatoria en queratinocitos primarios.

Se realizaron los ensayos de viabilidad y citotoxicidad, MTT y LDH, así como ELISAS para evaluar los efectos de una curva de dosis crecientes de luz azul, sobre la citotoxicidad e inflamación. Los queratinocitos primarios NHEK se irradiaron con dosis de luz azul 10 J/cm², 15 J/cm², 20 J/cm², 25 J/cm², 30 J/cm², 35 J/cm², 40 J/cm², 50 J/cm², 100 J/cm² y 150 J/cm². Se empleó un rango de dosis mayor que en las otras luces del espectro, debido a que no se observó una relación directamente proporcional entre la disminución de la viabilidad y el aumento de citotoxicidad. La viabilidad disminuyó progresivamente alcanzando el 50% a la dosis de 35 J/cm² (Figura 48A). Sin embargo, la citotoxicidad aumentó significativamente solo en la dosis de 50 J/cm², 100 J/cm² y 150 J/cm² (Figura 48B). En cuanto a la liberación de citoquinas inflamatorias, todas las dosis de luz azul produjeron una disminución no significativa de IL-8 (Figura 48C). Por otra parte, la producción de metaloproteinasa 1 disminuyó significativamente con el aumento de la dosis de luz azul (Figura 48D).

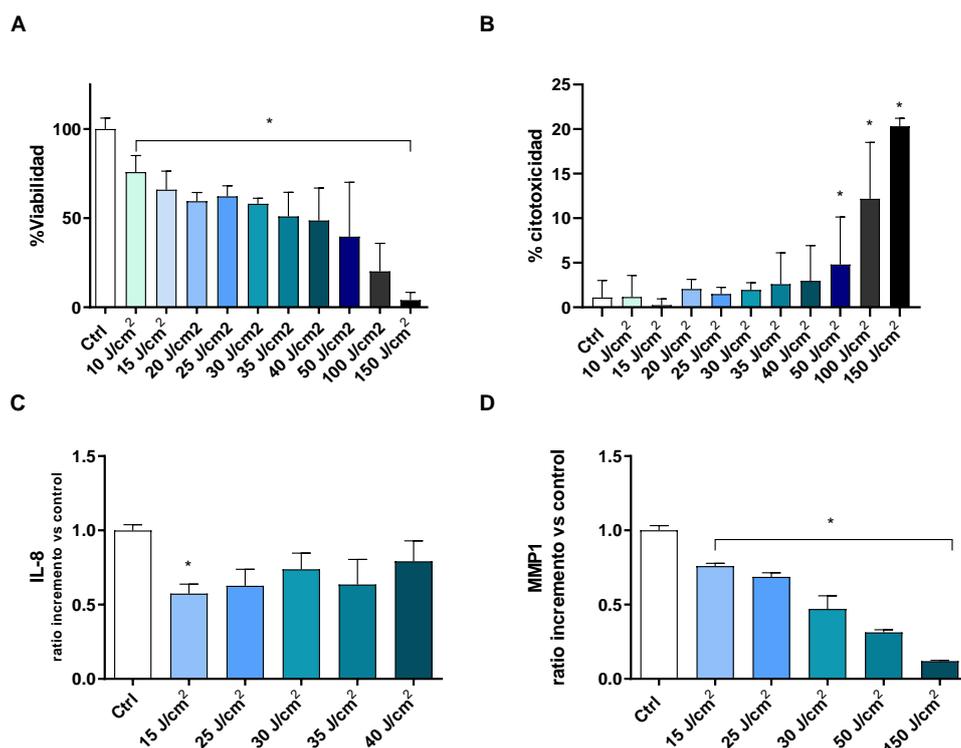


Figura 48. La luz azul induce una disminución de la viabilidad y aumento de la citotoxicidad, pero no el aumento de la inflamación, en queratinocitos primarios NHEK. Los queratinocitos primarios NHEK se irradiaron con dosis crecientes de luz azul (10 J/cm², 15 J/cm² y 20 J/cm², 25 J/cm², 30 J/cm², 35 J/cm², 40 J/cm², 50 J/cm², 100 J/cm² y 150 J/cm²). 24h tras la irradiación se realizaron: (A) Ensayo de viabilidad MTT. (B) Ensayo de citotoxicidad LDH. Se cuantificaron mediante ELISA: (C) Los niveles de citoquina IL-8 y (D) los niveles de la metaloproteína 1 (MMP1). Todos los resultados están expresados como media \pm SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a control.

4.4.2 La luz azul disminuye la viabilidad celular, e induce un aumento de la citotoxicidad a dosis altas en el modelo de piel 3D Phenion®-FT

En base a los resultados del efecto de la luz azul en los queratinocitos primarios NHEK, se eligieron las dosis de luz azul 40 J/cm², 60 J/cm², 80 J/cm² y 100 J/cm² para los tejidos de piel artificial Phenion®-FT. La elección de estas dosis se mantuvo también para el resto de los experimentos. Las dosis elegidas indujeron la disminución de la viabilidad significativa a partir de la dosis de 60 J/cm², alcanzando un porcentaje de viabilidad de 50.76 ± 5 a los 100 J/cm² (Figura 49A, C). A su vez, como se observa en la Figura 49B, C, la citotoxicidad aumentó significativamente a las dosis más altas de 80 y 100 J/cm².

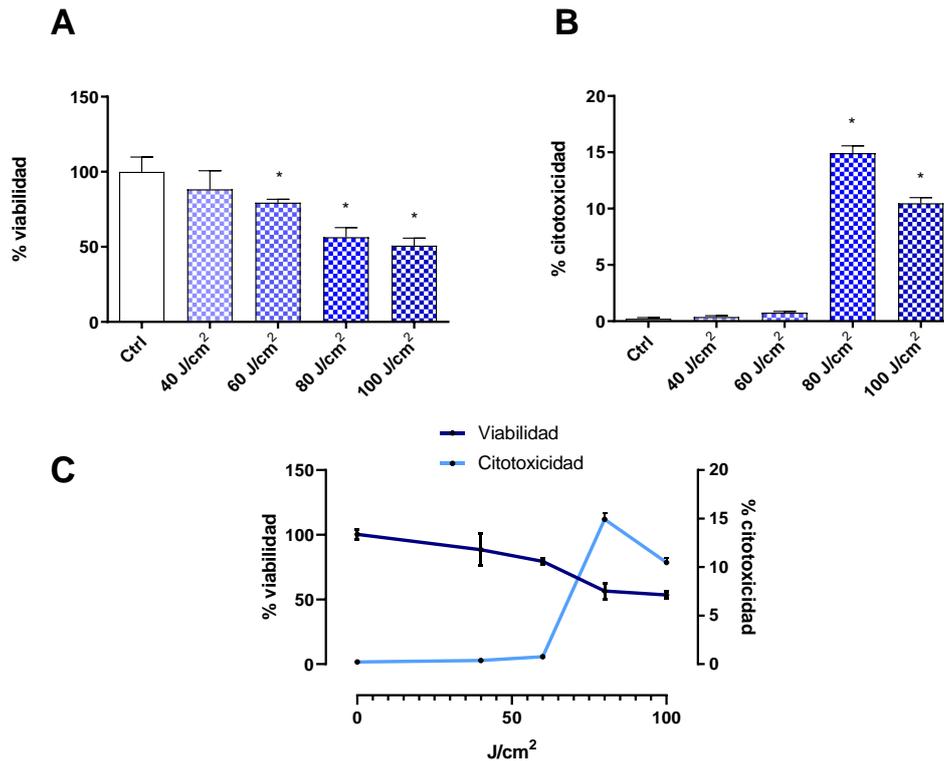


Figura 49. La luz azul induce una disminución de la viabilidad y aumento de citotoxicidad en el modelo de piel 3D Phenion®-FT. Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron con dosis crecientes de luz azul 40 J/cm², 60 J/cm², 80 J/cm² y 100 J/cm². (A) 24h tras la irradiación se realizó el ensayo de viabilidad MTT y (B) ensayo de citotoxicidad LDH. (C) Gráfica comparativa de viabilidad y citotoxicidad en Phenion®-FT irradiado con luz azul. Todos los resultados están expresados como media \pm SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a control.

4.4.3 La luz azul modula la respuesta inflamatoria, en el modelo de piel 3D Phenion®-FT

La evaluación de las citoquinas inflamatorias liberadas al medio de cultivo se realizó mediante ELISA. La luz azul, indujo un aumento de la liberación de IL-1 α , solo a las dosis más altas de 80 J/cm² y 100 J/cm² (Figura 50A). Por el contrario, IL-6 e IL-8 aumentaron a las dosis más bajas, 40 J/cm² y 60 J/cm², dosis a partir de las cuales se empezó a reducir la producción de dichas citoquinas, creando un histograma en forma de campana (Figura 50B, C).

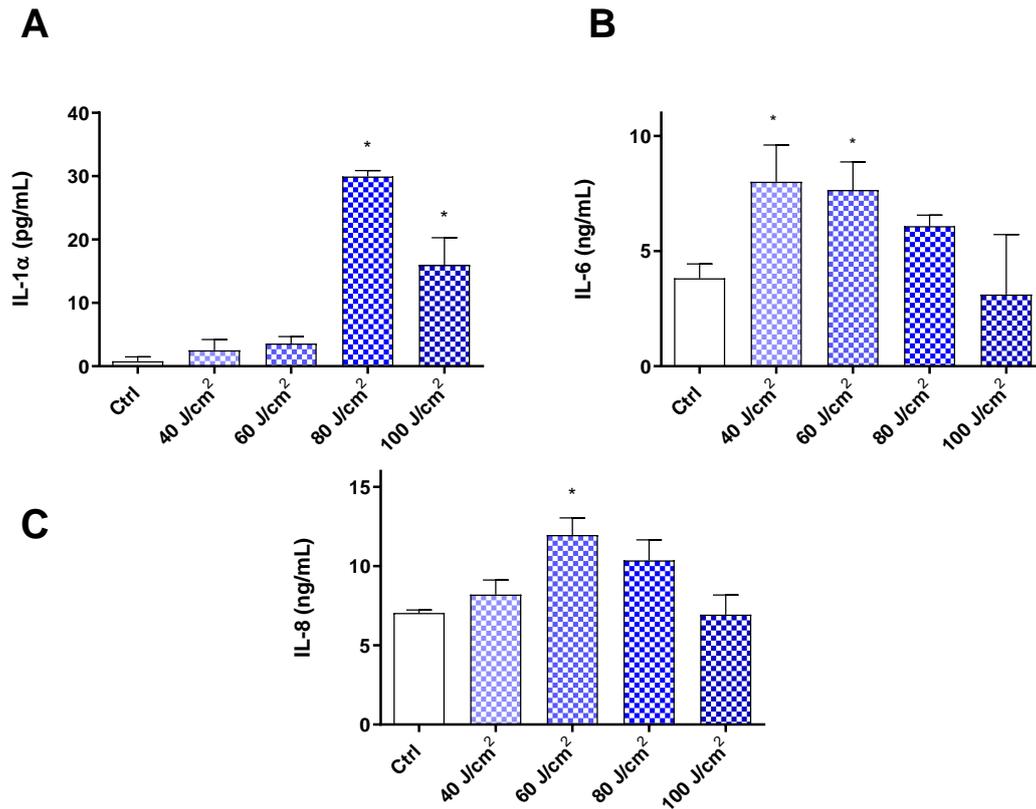


Figura 50. La luz azul induce la producción de citoquinas inflamatorias en el modelo de piel 3D Phenion®-FT. Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron con dosis crecientes de luz azul 40 J/cm², 60 J/cm², 80 J/cm² y 100 J/cm². 24h tras la irradiación se cuantificaron los niveles de las interleucinas (A) IL-1α, (B) IL-6 y (C) IL-8, mediante ELISA. Todos los resultados están expresados como media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. **p*<0.05 respecto a control.

4.4.4 La luz azul modula la expresión génica de marcadores dérmicos y epidérmicos en el modelo de piel 3D Phenion®-FT

Se realizó el análisis de expresión génica mediante PCR para evaluar los efectos de la curva de dosis crecientes de luz azul sobre la modulación de distintos biomarcadores. Los resultados de la RT-PCR se presentan como un mapa de calor donde los tonos más claros indican una menor expresión génica y los tonos más oscuros representan una mayor expresión. Como se observa en la Figura 51, al exponer a los tejidos Phenion®-FT a la luz azul, se observó una modulación de la expresión génica en forma de campana, aumentando a dosis bajas y disminuyendo a dosis altas, en el caso de los

genes MMP1, DCN, COL7A1 y GPX1. Por otra parte, los marcadores ELN y COL1A1 aumentaron su expresión mientras que MMP9 la disminuyó.

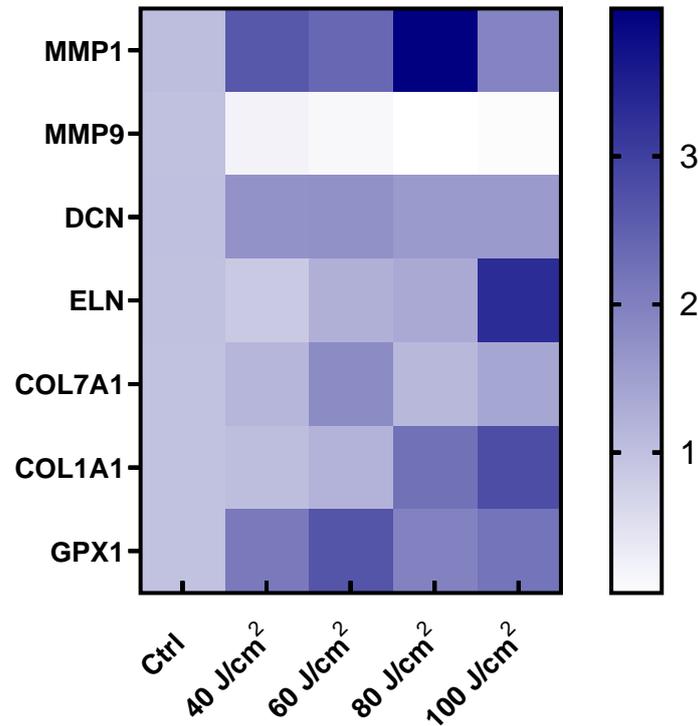


Figura 51. La luz azul modula la expresión génica de marcadores dérmicos y epidérmicos en el tejido de piel artificial Phenion®-FT. Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron con dosis crecientes de luz azul 40 J/cm², 60 J/cm², 80 J/cm² y 100 J/cm². 24h tras la irradiación, mediante PCR a tiempo real, se midieron los niveles de expresión génica de los siguientes genes: Decorina (DCN), metaloproteinasas 1 y 9 (MMP1, MMP9), elastina (ELN), colágeno tipo 1 alfa 1 (COL1A1), colágeno tipo 7 alfa 1 (COL7A1) y glutatión peroxidasa 1 (GPX1). Los resultados se representan mediante un mapa de calor como la media del incremento de expresión génica.

4.4.5 La luz azul afecta a la arquitectura tisular en el modelo de piel 3D

Phenion®-FT

Los efectos de la luz azul en la morfología tisular de los modelos de piel reconstruida Phenion®-FT se evaluaron mediante tinción de hematoxilina eosina. La luz azul produjo modificaciones morfológicas desde la dosis de 40 J/cm² siendo destacable la pérdida de fibroblastos dérmicos y la vacuolización del citoplasma celular en la epidermis. En la dosis de 100 J/cm² se produjo la muerte de los queratinocitos epidérmicos, y su acumulación en la capa basal con núcleos picnóticos (Figura 52).

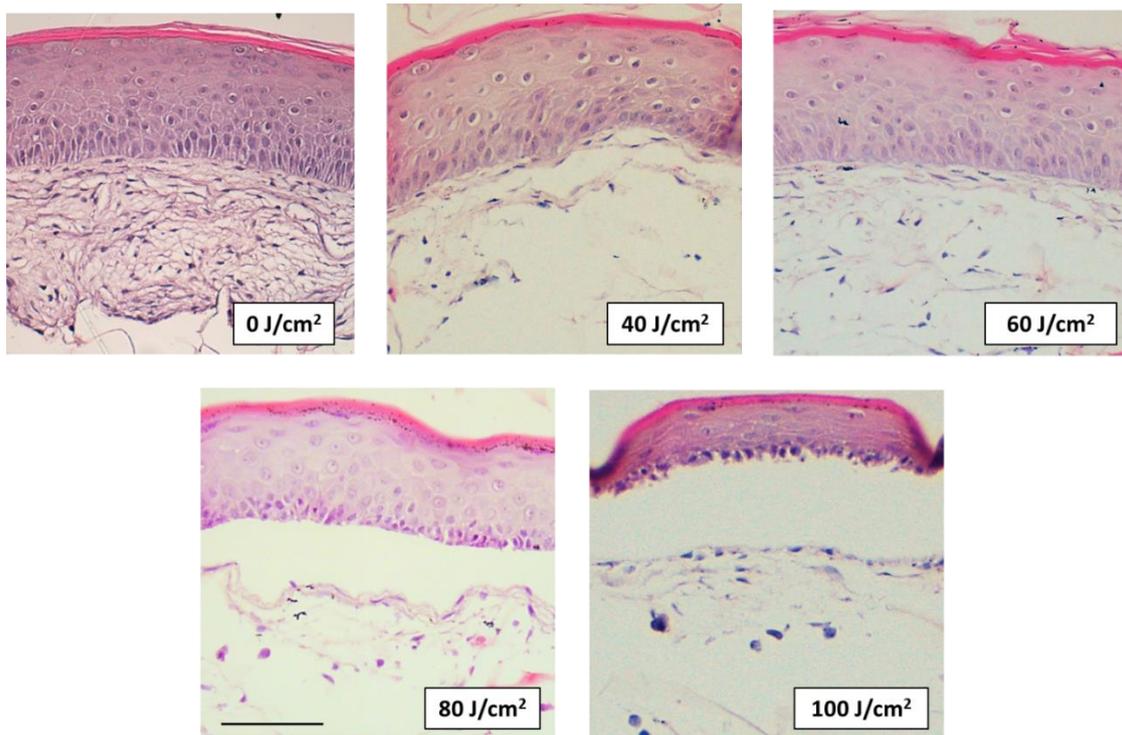


Figura 52. La luz azul afecta a la arquitectura tisular del tejido de piel 3D Phenion®-FT. Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron con dosis crecientes de luz azul 40 J/cm², 60 J/cm², 80 J/cm² y 100 J/cm². Las tinciones de hematoxilina y eosina se realizaron a partir de los cortes histológicos de dichos tejidos. Escala 100 μm.

4.4.6 La luz azul induce la modulación de la expresión de p21 y p53 en el modelo de piel 3D Phenion®-FT

Para evaluar las variaciones en la expresión de los genes p21 y p53, se analizó la expresión protéica mediante Western Blot. Tras la exposición de los tejidos Phenion®-FT a luz azul, la expresión génica de p53 no mostró un aumento significativo en todas las dosis estudiadas (Figura 53A). La luz azul también indujo la sobreexpresión de p53 de forma significativa hasta la dosis de 80 J/cm², sin embargo, a la dosis de 100 J/cm² volvió a descender la expresión al nivel del control sin irradiar (Figura 53B).

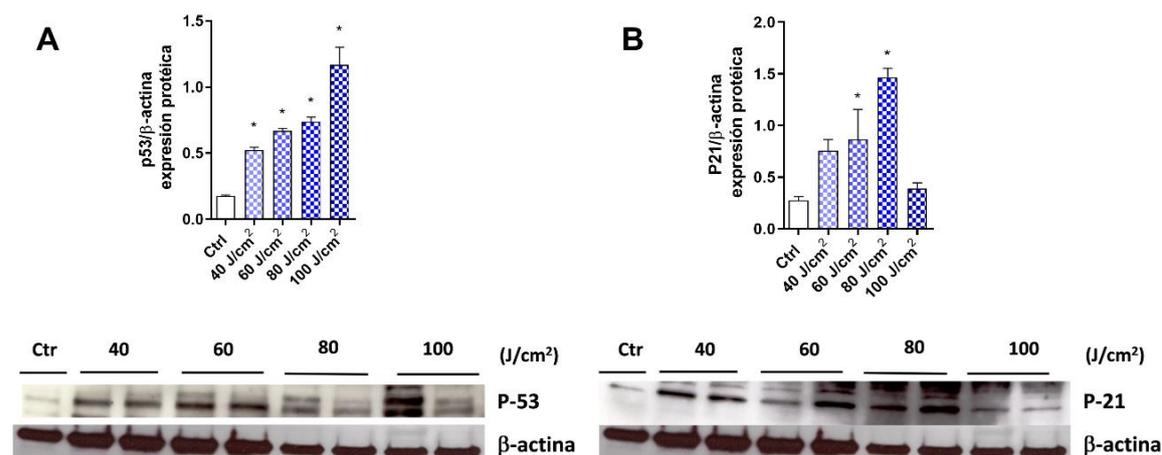


Figura 53. La luz azul induce la modulación de la expresión génica y protéica de p21 y p53. Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron con dosis crecientes de luz azul 40 J/cm², 60 J/cm², 80 J/cm² y 100 J/cm². 24h tras la irradiación, se midieron los niveles de expresión protéica de p53 (A) y p21 (B) mediante western blot. Los diagramas de barras representan los datos de densitometría de la proteína, respecto al control constitutivo. Todos los resultados están expresados como media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. **p*<0.05 respecto a control.

4.5 EFECTOS DE LA LUZ INFRARROJA

4.5.1 La luz infrarroja afecta a la viabilidad y citotoxicidad celular, pero no induce una respuesta inflamatoria en queratinocitos primarios.

Se realizaron los ensayos de viabilidad y citotoxicidad, MTT y LDH, respectivamente, así como ELISAS para evaluar los efectos de la luz infrarroja sobre la citotoxicidad, inflamación y producción de MMP1. En el caso de la luz infrarroja, las dosis no se cuantificaron energéticamente, sino que se determinaron mediante control de tiempos y de temperatura, mediante una sonda térmica sumergible. Así pues, se irradiaron las células a distintos tiempos para hacer la siguiente curva de dosis: 5, 10, 15, 20, 25, 35, 45, 60 minutos. La viabilidad celular disminuyó de manera progresiva significativamente hasta alcanzar un porcentaje de viabilidad del 10.61±4.3% a los 60 minutos (Figura 54A). No obstante, la citotoxicidad solo aumentó significativamente a los 45 y 60 minutos (Figura 54B). Como se observa en la Figura 54C, la temperatura durante la irradiación aumentó a medida que aumentaba el tiempo de exposición

hasta alcanzar temperaturas muy por encima de las fisiológicas, siendo la máxima alcanzada, de 48°C a los 60 minutos.

En cuanto a la liberación de la citoquina IL-8, ninguna de las dosis indujo su aumento (datos no mostrados). Sin embargo, sí que se observaron variaciones en la concentración de MMP1 liberada al medio de cultivo, en este caso, el aumento del tiempo de exposición a la luz infrarroja llevó a la disminución de MMP1 (Figura 54D).

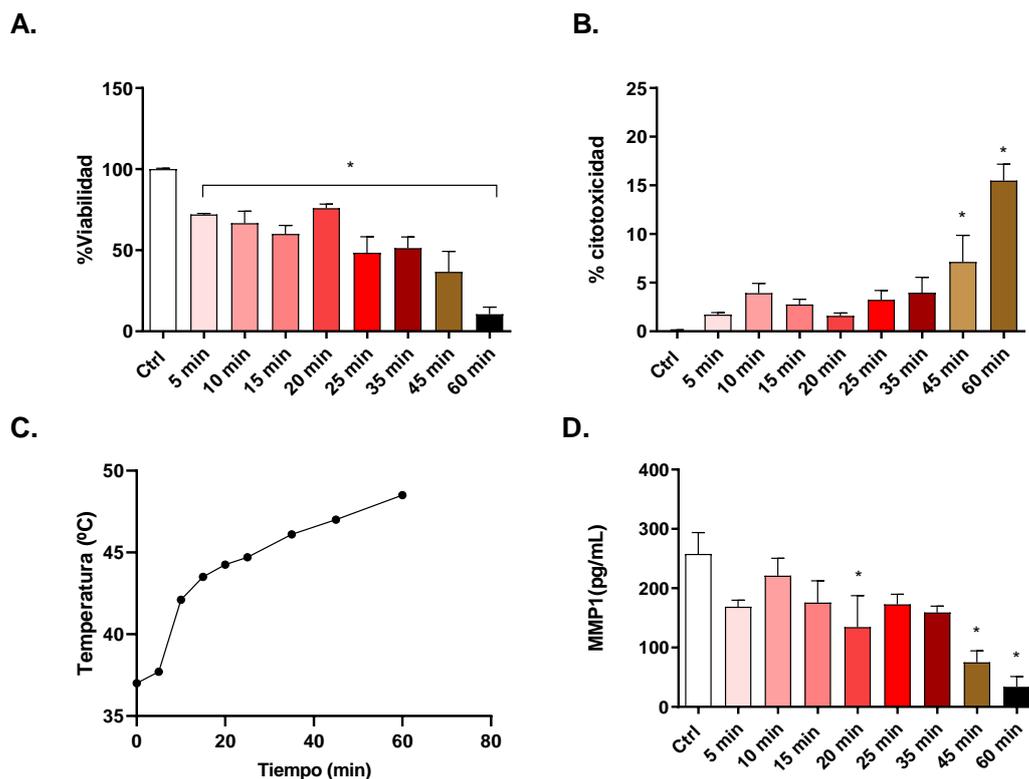


Figura 54. La luz infrarroja induce una disminución de la viabilidad, aumento de la citotoxicidad y disminución de metaloproteína 1, así como el aumento de la temperatura, a tiempos de exposición altos, en queratinocitos primarios NHEK. Los queratinocitos primarios NHEK se irradiaron a distintos tiempos con la lámpara infrarroja 5, 10, 15, 20, 25, 35, 45 y 60 minutos. 24h tras la irradiación se realizaron: (A) Ensayo de viabilidad MTT. (B) Ensayo de citotoxicidad LDH. (C) El control de temperatura se registró cada 5 minutos mediante una sonda térmica sumergible en el medio de irradiación (PBS). (D) 24h tras la irradiación se cuantificaron mediante ELISA los niveles de la metaloproteína 1 (MMP1). Todos los resultados están expresados como media \pm SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a control.

4.5.2 La luz infrarroja disminuye la viabilidad celular, e induce un aumento de la citotoxicidad en el modelo de piel 3D Phenion®-FT.

En base a los resultados obtenidos en monocapa, las dosis elegidas para los tejidos Phenion®-FT fueron 45 y 90 minutos. La elección de estas dosis se mantuvo también para el resto de los experimentos. La viabilidad celular disminuyó significativamente en ambas dosis, y se observó una citotoxicidad proporcional y significativa (Figura 55A, B). En los tejidos Phenion®-FT la temperatura se controló injertando la sonda térmica en la unión dermoepidérmica (Figura 55D). En ambos tiempos de exposición, la temperatura alcanza un máximo alrededor de los 20 minutos, a partir del cual se mantiene estable, nunca sobrepasando los 40 °C (figura 55 C, E)

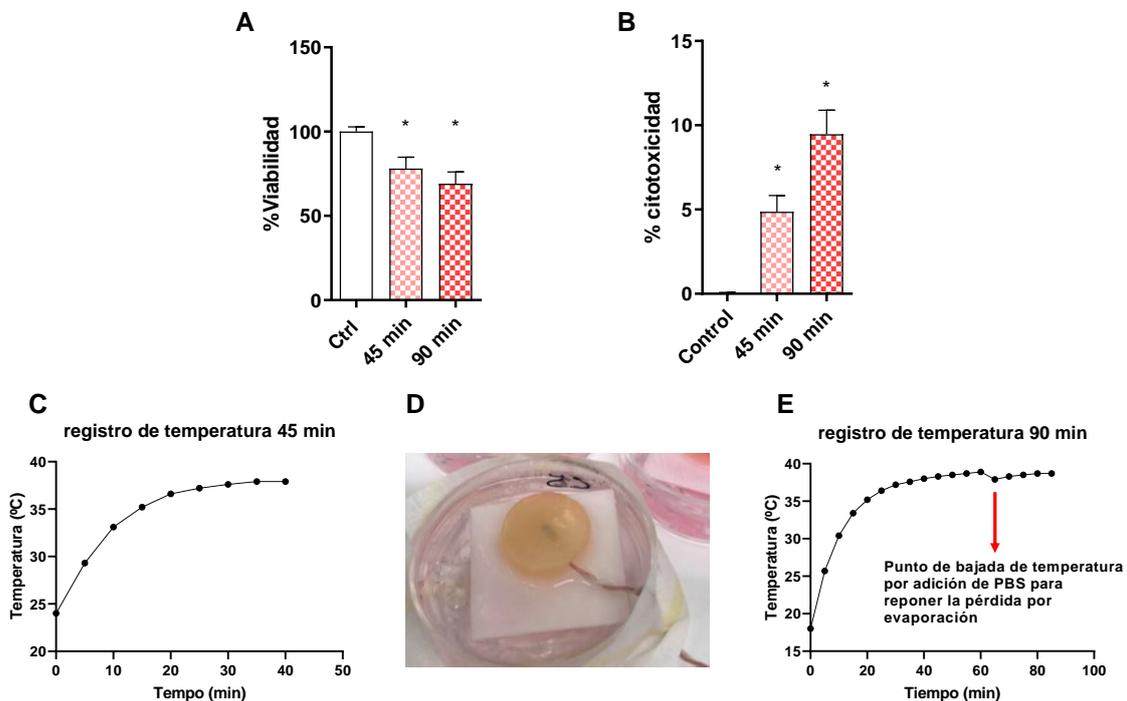


Figura 55. La luz infrarroja induce una disminución de la viabilidad y aumento de citotoxicidad en el modelo de piel 3D Phenion®-FT, manteniendo una temperatura inferior a los 40°C. Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron a dos tiempos de exposición, 45 y 90 minutos. (A) 24h tras la irradiación se realizó el ensayo de viabilidad MTT y (B) ensayo de citotoxicidad LDH. (C, D, E) El control de temperatura se registró cada 5 minutos mediante una sonda térmica insertada en la unión dermoepidérmica. Todos los resultados están expresados como media \pm SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a control.

4.5.3 La luz infrarroja modula la respuesta inflamatoria, en el modelo de piel 3D Phenion®-FT.

La evaluación de las citoquinas inflamatorias liberadas al medio de cultivo se realizó mediante ELISA. La luz infrarroja indujo el aumento significativo de la liberación de las citoquinas IL-1 α , IL-6 e IL-8 en las dos dosis empleadas (Figura 56A-C)

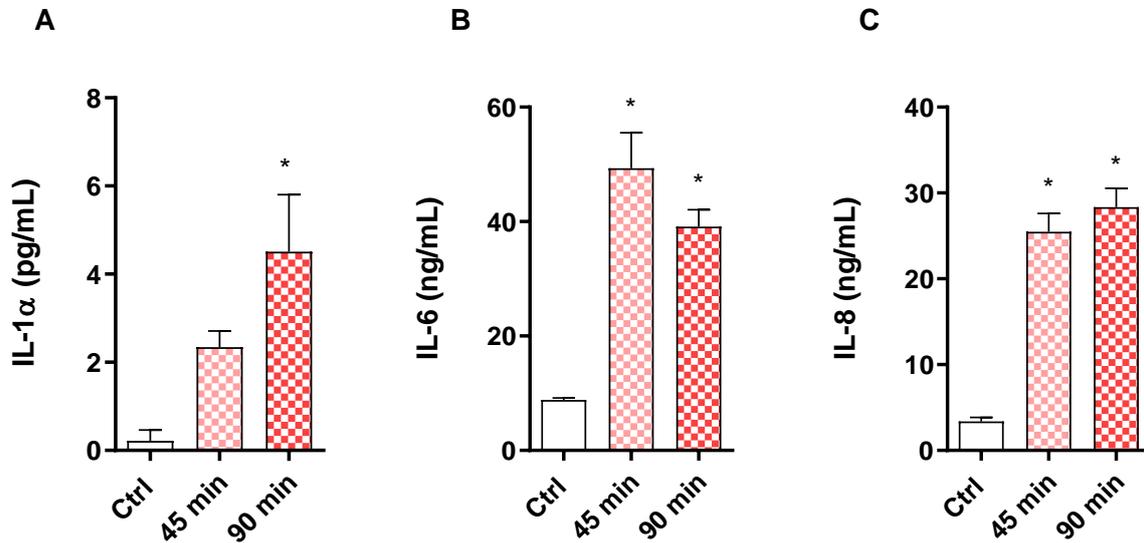


Figura 56. La luz infrarroja induce la producción de citoquinas inflamatorias en el modelo de piel 3D Phenion®-FT. Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron a dos tiempos de exposición, 45 y 90 minutos. 24h tras la irradiación, se cuantificaron los niveles de las interleucinas (A) IL-1 α , (B) IL-6 y (C) IL-8, mediante ELISA. Todos los resultados están expresados como media \pm SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a control.

4.5.4 La luz infrarroja modula la expresión de marcadores dérmicos en el modelo de piel 3D Phenion®-FT.

Se realizó el análisis de expresión génica mediante PCR para evaluar los efectos de la luz infrarroja sobre la modulación de distintos biomarcadores. Los marcadores COL1A1 y ELN (Figura 57A, B) disminuyeron significativamente su expresión tras la exposición durante 45 y 90 minutos de exposición a la luz infrarroja. Por otra parte, el antioxidante GPX1 aumentó su expresión en ambas dosis (Figura 57C).

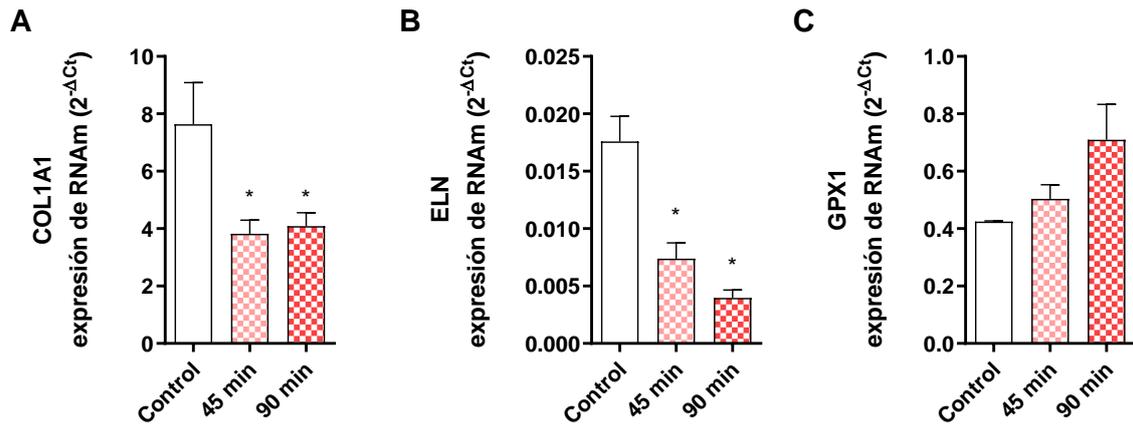


Figura 57. La luz infrarroja disminuye la expresión de los marcadores dérmicos colágeno tipo 1 alfa 1 y elastina y aumenta ligeramente los niveles de expresión del antioxidante glutatión peroxidasa 1 en Phenion®-FT. Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron a dos tiempos de exposición, 45 y 90 minutos. 24h tras la irradiación, se midieron los niveles de expresión génica de (A) colágeno tipo 1 alfa 1 (COL1A1), (B) elastina (ELN) y (C) glutatión peroxidasa 1 (GPX1), mediante PCR a tiempo real. Todos los resultados están expresados como media \pm SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a control.

La modulación de las metaloproteinasas se midió por ELISA y por PCR. Se observó, que la MMP1 liberada al medio de cultivo aumento en ambas dosis de manera no significativa (Figura 58A), mientras que la MMP9 no tuvo variaciones significativas (Figura 58B). En cuanto a la expresión génica, la de MMP1 aumentó tras la exposición a la luz infrarroja mientras que la de MMP9 disminuyó (Figura 58C, D).

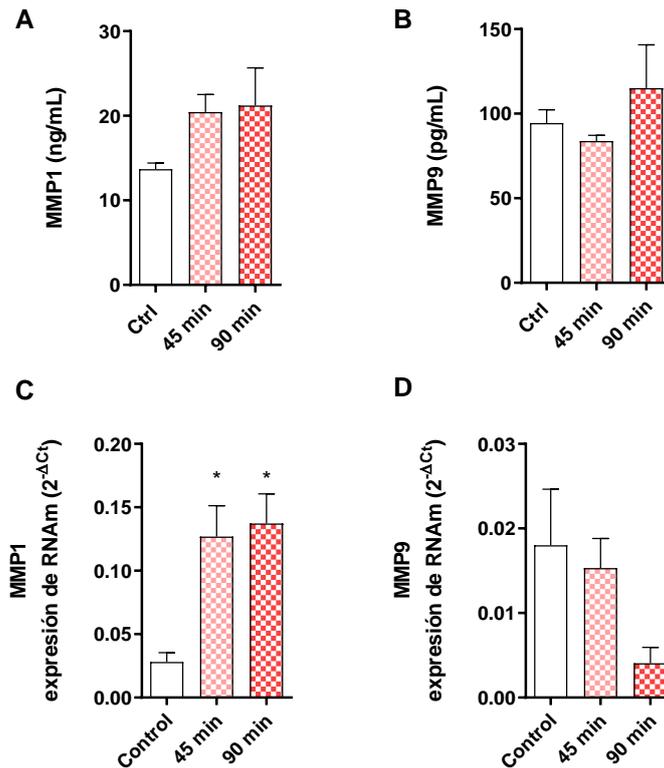


Figura 58. La luz infrarroja modula la expresión y liberación de metaloproteinasas en Phenion®-FT. Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron a dos tiempos de exposición, 45 y 90 minutos. (A, B) 24h tras la irradiación se cuantificaron los niveles las metaloproteinasas 1 y 9 (MMP1 Y MMP9) mediante ELISA. (C, D) 24h tras la irradiación, se midieron los niveles de expresión génica de las metaloproteinasas 1 y 9 (MMP1 Y MMP9) mediante PCR a tiempo real. Todos los resultados están expresados como media \pm SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a control.

4.5.5 La luz infrarroja no modifica en gran medida la arquitectura tisular del modelo de piel 3D Phenion®-FT

Los efectos de la luz infrarroja en la morfología tisular de los modelos de piel Phenion®-FT se evaluaron mediante tinción de hematoxilina eosina. La luz infrarroja no dañó de manera visible la estructura de la dermis o la epidermis. El único efecto morfológico que se pudo destacar fue la vacuolización de los queratinocitos desde el estrato granuloso y hasta el basal (Figura 59).

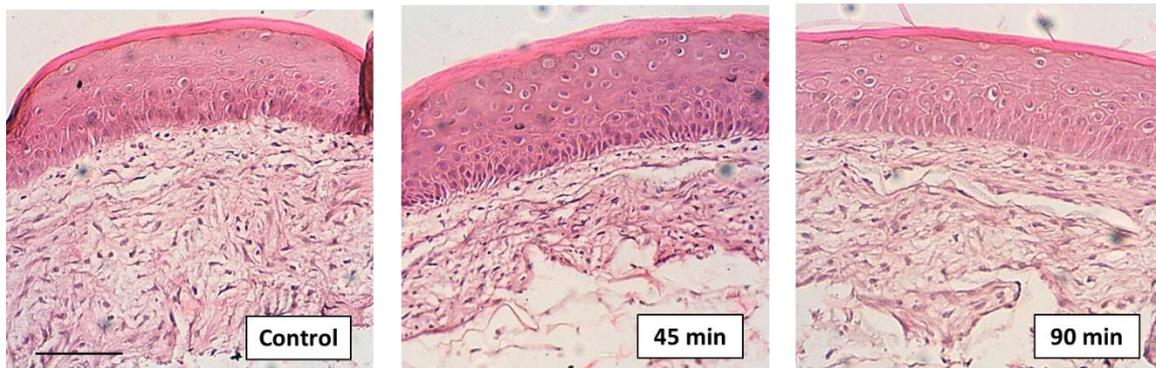


Figura 59. La luz infrarroja modifica ligeramente la arquitectura tisular del tejido de piel 3D Phenion®-FT. Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron a dos tiempos de exposición, 45 y 90 minutos. Las tinciones de hematoxilina y eosina se realizaron a partir de los cortes histológicos de dichos tejidos. Escala 100 μ m.

4.5.6 La luz infrarroja induce la modulación de la expresión de p21 y p53 en el modelo de piel 3D Phenion®-FT

Para evaluar las variaciones en la expresión de los genes p21 y p53, se analizó la expresión génica por RT-PCR y la protéica mediante Western Blot. Tras la exposición de los tejidos Phenion®-FT a radiación infrarroja, la expresión génica de p53 aumentó significativamente a las dosis de 45 y 90 minutos (Figura 60A), mientras que la de p21 disminuyó progresivamente con el aumento de la dosis, de manera no significativa en la expresión protéica, pero sí en la expresión génica (Figura 60B).

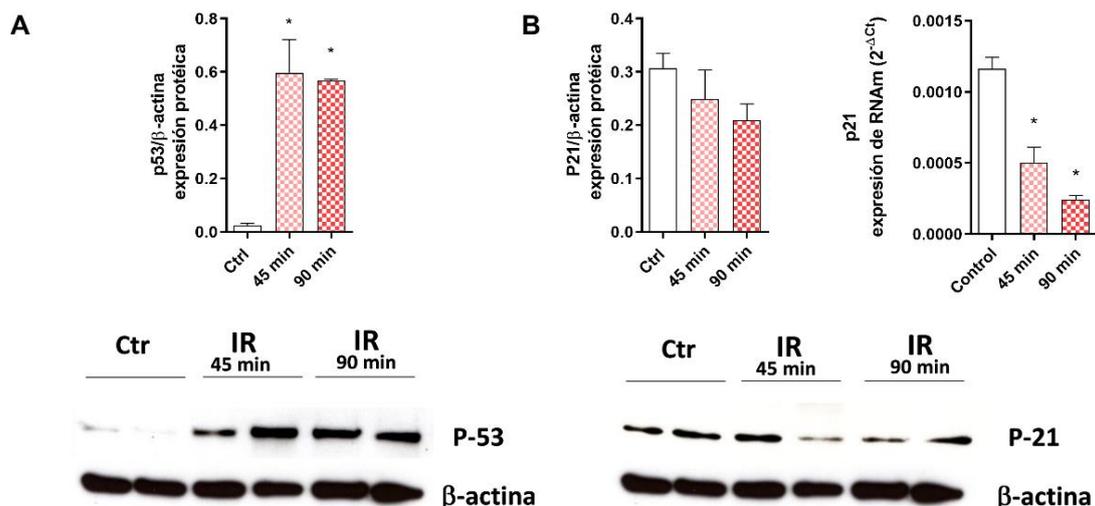


Figura 60. La luz infrarroja induce el aumento de expresión de p53, y la disminución en la expresión de p21. Los tejidos Phenion®-FT se irradiaron a dos tiempos de exposición, 45 y 90 minutos. (A) 24h tras la irradiación, se midieron los niveles de expresión protéica de p53 y (B) los niveles de expresión génica y

protéica de p21 mediante Western Blot y PCR a tiempo real. Los diagramas de barras representan los datos de densitometría de la proteína, respecto al control constitutivo. Todos los resultados están expresados como media \pm SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a control.

4.6 ESTUDIO DE CORRELACIÓN DE BIOMARCADORES CON CADA LUZ DEL ESPECTRO SOLAR

Se realizó un análisis de correlación para establecer cuál de los biomarcadores podría ser más característico para cada tipo de radiación en Phenion®-FT. En la tabla 10, se muestran los coeficientes de Pearson (r) de la curva de dosis de radiación vs cada uno de los marcadores. Cabe destacar que, en algunos de los marcadores, la respuesta es de tipo campana, es decir, a dosis bajas se observa un aumento mientras que a dosis altas hay una disminución, en estos casos no sirve el coeficiente de correlación, ya que cuantifica covariaciones lineales. Por tanto, en estos casos, el análisis de correlación podría dar coeficientes bajos de r , aunque las dos variables estén fuertemente relacionadas. Por esta razón, en la curva de luz solar completa, los coeficientes r se calcularon hasta la dosis de 20 J/cm^2 , a partir de la cual empiezan a disminuir los marcadores. Por la misma razón, en los resultados de la luz azul, se excluyó en algunos casos, tal y como se indica en la Tabla 10, la dosis más alta de 100 J/cm^2 .

Tabla 10. Coeficientes de correlación de Pearson (r) para los biomarcadores evaluados en las distintas luces del espectro solar

Biomarcador	Luz solar completa	UVA	Luz azul	IR
<i>Viabilidad</i>	-0,84*	-0,63	-0,98*	-0,97
<i>Citotoxicidad</i>	0,99*	0,88*	0,76	0,99*
<i>IL-1α</i>	0,94*	0,90*	0,74 (hasta 80 J/cm^2)	1*
<i>IL-6</i>	0,88	0,88*	0,59 (hasta 80 J/cm^2)	0,71
<i>IL-8</i>	0,93	0,91*	0,81 (hasta 80 J/cm^2)	0,91
<i>GPX1</i>	0,81	0,99*	0,75 (hasta 80 J/cm^2)	0,77
<i>MMP1</i>	0,89	0,94*	0,92	0,90

	<i>(hasta 80 J/cm²)</i>			
<i>MMP9</i>	-0,75	-0,76	-0,89*	-0,94
<i>ELN</i>	-0,69	-0,30	0,73	-0,96
<i>DCN</i>	0,61	0,68	0,68	-0,42
<i>COL1</i>		-0,36	0,88*	-0,82
<i>COL7A1</i>	0,75	0,87	0,44	0,91
<i>p21</i>	-0,99*	-0,98*	0,39	-0,99
<i>p53</i>	0,59	±0,99*	0,96*	0,84

* $p < 0.05$. Abreviaturas: *GPX1*: Glutación peroxidasa 1, *MMP1*: Metaloproteínasa 1, *MMP9*: Metaloproteínasa 9, *ELN*: Elastina, *DCN*: Decorina, *COL1A1*: Colágeno tipo 1 alfa 1, *COL7A1*: Colágeno tipo 7 alfa 1, *P21*: inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1. *P53*: proteína supresora de tumores p53

Para la luz solar completa, los marcadores con los coeficientes de correlación más altos y significativos fueron la viabilidad, citotoxicidad, IL-1 α y p21, siendo los más destacables, la citotoxicidad y p21 con un valor de r de 0,99. Por otra parte, en la luz UVA, p53 y GPX1 también mostraron una correlación muy alta de $\pm 0,99$, aunque p21, MMP1, la citotoxicidad y las tres citoquinas evaluadas también mostraron valores de r por encima de 0,8 y significativos. Por otra parte, en la luz azul, los marcadores con coeficiente r altos y significativos fueron la viabilidad, MMP9, COL1 y p53, mientras que la citotoxicidad e IL-1 α mostraron coeficientes de Pearson de 0,99 y 1 respectivamente en relación con la luz infrarroja.

4.7 FOTOPROTECCIÓN DEL COMPUESTO NATURAL OBACUNONA

Con el fin de evaluar el nivel de fotoprotección ejercido por el antioxidante natural obacunona, y validar el uso de los tejidos Phenion®-FT en fotoprotección de compuestos naturales, se analizaron distintos marcadores moleculares en los tejidos 3D Phenion®-FT y en queratinocitos en monocapa NHEK, expuestos a luz solar completa y previamente tratados con obacunona.

4.7.1 La obacunona protege frente al aumento de citotoxicidad inducido por la luz solar completa en queratinocitos primarios y en el

modelo de piel 3D Phenion®-FT, mientras que su efecto antiinflamatorio no es tan potente.

Se realizó el ensayo de citotoxicidad LDH, así como ELISAS para evaluar los efectos protectores de la Obacunona, sobre la citotoxicidad e inflamación. Tanto en las células NHEK como en Phenion®-FT, el aumento de la citotoxicidad inducido por la irradiación con luz solar se previno significativamente con el tratamiento con obacunona en todas las dosis empleadas (figura 61A, B).

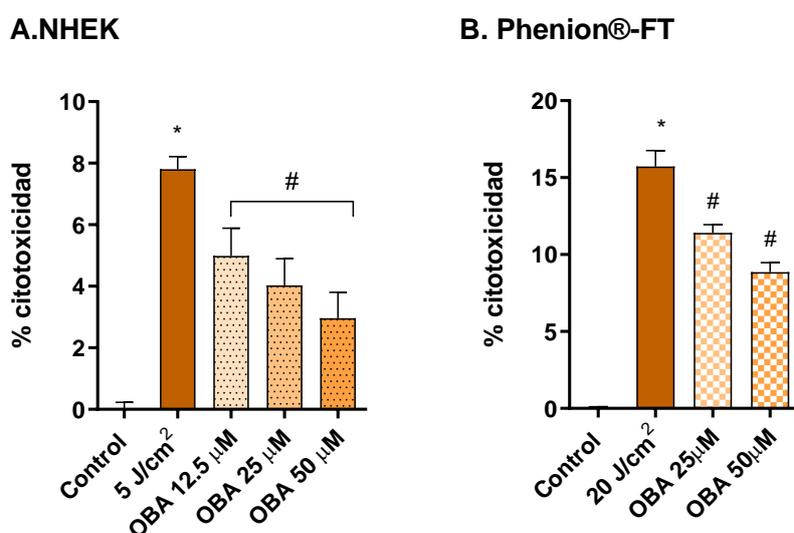


Figura 61. La obacunona protege frente al aumento de citotoxicidad inducido por la luz solar completa en queratinocitos primarios y en el modelo de piel 3D Phenion®-FT. Las células NHEK y los tejidos Phenion®-FT se incubaron con Obacunona (12,5 μM, 25 μM y 50 μM) durante 24h y a continuación se irradiaron con 5 y 20 J/cm² de luz solar completa respectivamente. (A, B) 24h tras la irradiación se realizó el ensayo de citotoxicidad LDH. Todos los resultados están expresados como media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a control. # $p < 0.05$ respecto a 5 J/cm² o 20 J/cm².

En cuanto a la producción de citoquinas se evaluó IL-1α (Figura 62A) en los queratinocitos primarios e IL-1α, IL-6 y IL-8 en Phenion®-FT (Figura 62B, C, D). La obacunona previno ligeramente el aumento de dichas citoquinas inducido por la exposición a la luz solar completa, tanto en monocapa como en el modelo 3D, aunque dichas disminuciones no fueron estadísticamente significativas.

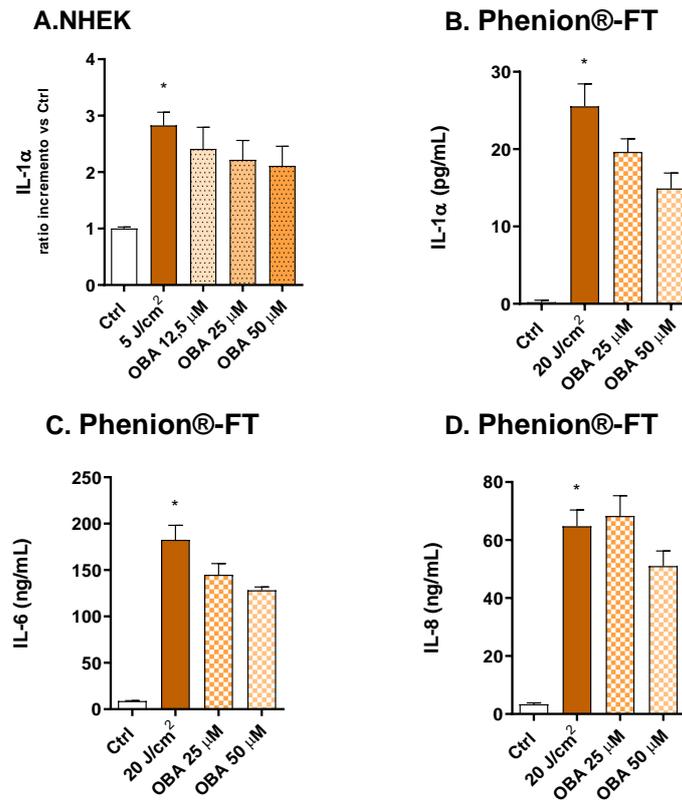


Figura 62. La obacunona previene ligeramente la producción de citoquinas inflamatorias en queratinocitos primarios y en el modelo de piel 3D Phenion®-FT. Las células NHEK y los tejidos Phenion®-FT se incubaron con Obacunona (12,5 μ M, 25 μ M y 50 μ M) durante 24h y a continuación se irradiaron con 5 y 20 J/cm² de luz solar completa respectivamente. 24h tras la irradiación, se cuantificaron los niveles de las interleucinas (A, B) IL-1 α , (C) IL-6 y (D) IL-8 mediante ELISA. Todos los resultados están expresados como media \pm SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. * p <0.05 respecto a control.

4.7.2 La obacunona previene frente a la modulación de la expresión y liberación de metaloproteinasa y marcadores dérmicos inducidos por la luz solar en queratinocitos primarios y en el modelo de piel 3D Phenion®-FT.

El estudio de la modulación de los distintos biomarcadores dérmicos se realizó mediante RT-PCR tanto en monocapa como en el modelo de piel artificial. La metaloproteinasa MMP1 aumentó en las células NHEK y en Phenion®-FT tras la irradiación y la obacunona consiguió revertir este aumento (Figura 63A, B).

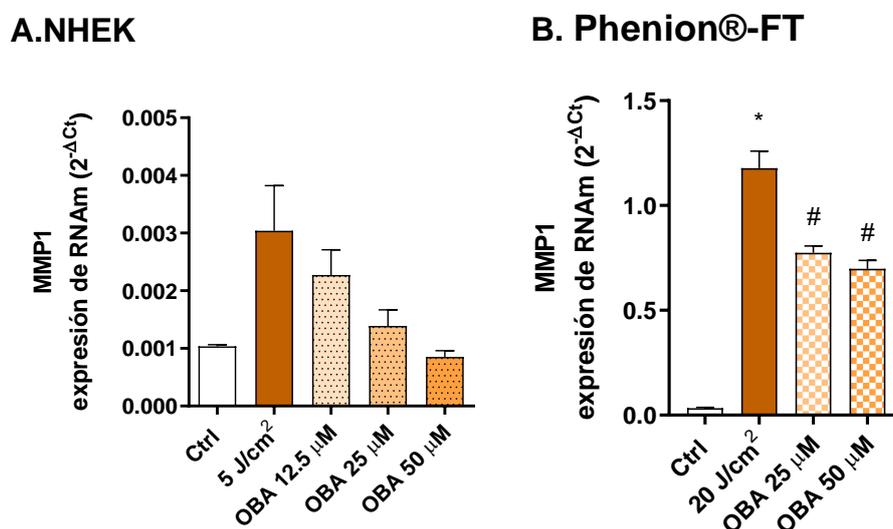


Figura 63. La obacunona previene el aumento de la metaloproteinasa 1 en queratinocitos primarios y en Phenion®-FT. Las células NHEK y los tejidos Phenion®-FT se incubaron con Obacunona (12,5 µM, 25 µM y 50 µM) durante 24h y a continuación se irradiaron con 5 y 20 J/cm² de luz solar completa respectivamente. (A, B) 24h tras la irradiación, se midieron los niveles de expresión génica de la metaloproteinasas 1 (MMP1) mediante PCR a tiempo real. Todos los resultados están expresados como media \pm SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a control.

Los marcadores dérmicos COL1A1, COL7A1 y ELN se evaluaron también en Phenion®-FT. COL1A1 y ELN disminuyeron su expresión tras la exposición a la luz solar. En el caso de la ELN, la Obacunona previno significativamente este efecto a la dosis más alta (Figura 64C), pero no fue capaz de prevenir el descenso de expresión en COL1A1 (Figura 64A). En cuanto al marcador COL7A1, ambas concentraciones de obacunona consiguieron prevenir el aumento de expresión inducido por la luz solar (Figura 64B).

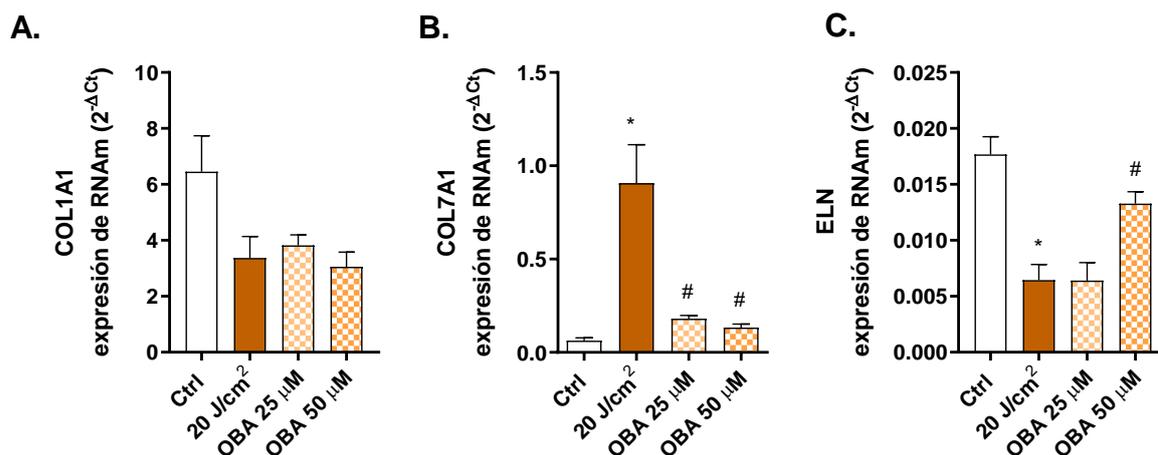


Figura 64. La obacunona revierte las modificaciones de expresión de marcadores dérmicos inducidos por la luz solar, excepto del Colágeno 1, en el modelo de piel 3D Phenion®-FT. Los tejidos Phenion®-FT se incubaron con Obacunona (12,5 μ M, 25 μ M y 50 μ M) durante 24h y a continuación se irradiaron con 20 J/cm² de luz solar completa. 24h tras la irradiación, se midieron los niveles de expresión génica de colágeno tipo 1 alfa 1 (COL1A1), colágeno tipo 7 alfa 1 (COL7A1) y Elastina (ELN) mediante PCR a tiempo real. Todos los resultados están expresados como media \pm SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. * p <0.05 respecto a control. # p <0.05 respecto a 20 J/cm².

4.7.3 La obacunona ejerce efectos antioxidantes frente a la exposición de radiación solar en queratinocitos primarios y en el modelo de piel 3D Phenion®-FT

El efecto antioxidante de la obacunona se evaluó en monocapa mediante el análisis de liberación de ERO y GSH, y mediante RT-PCR en el modelo de piel artificial Phenion®-FT. Como se observa en la Figura 65A, el estrés oxidativo inducido por la luz solar en las NHEK se previno al incubar las células con obacunona, siendo el efecto significativo a la dosis más alta de 50 μ M. De la misma manera, dosis crecientes de obacunona indujeron el incremento de la producción del antioxidante GSH en NHEK, incluso por encima de los niveles basales (Figura 65B); y frente a la disminución de los genes antioxidantes NQO1 y HO1 inducida por la radiación en los queratinocitos, la obacunona previno dicho efecto significativamente (Figura 65C, D). En el caso del modelo de piel 3D Phenion®-FT, la obacunona ejerció un efecto protector frente al

aumento del antioxidante GPX1 inducido por la exposición a la luz solar completa (Figura 65E).

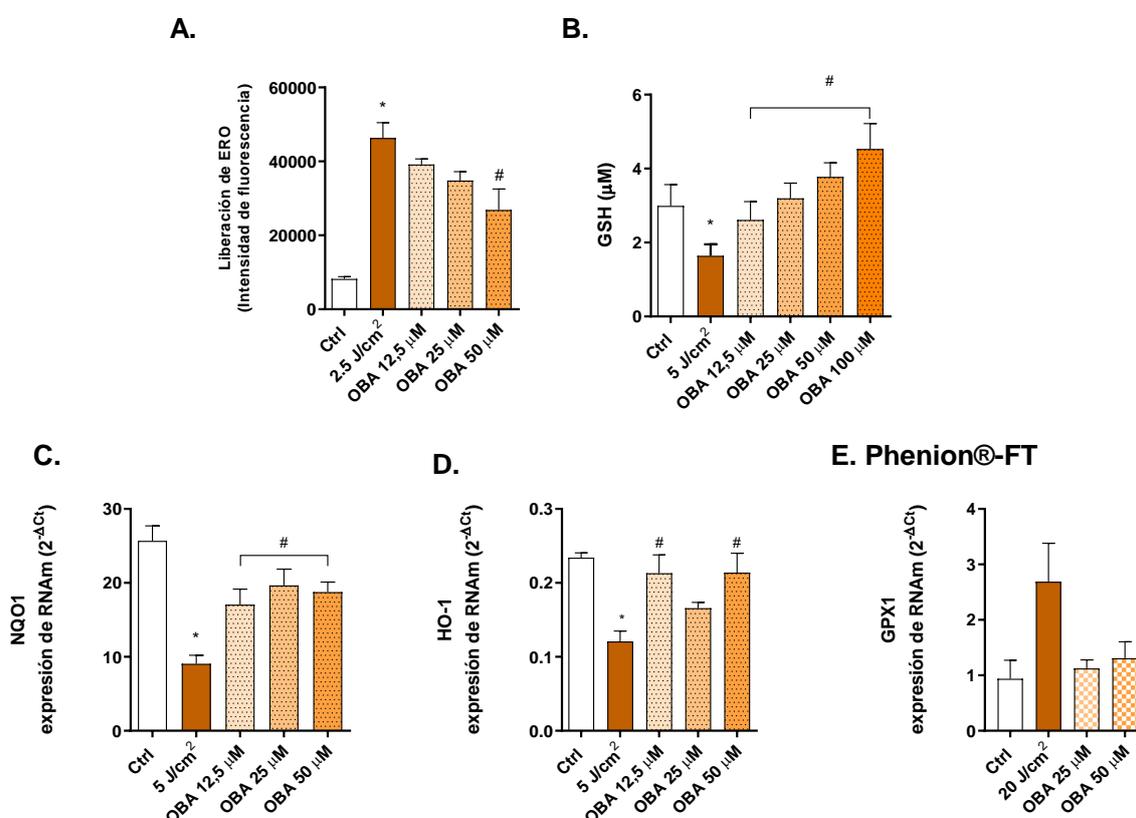


Figura 65. La obacunona previene frente al estrés oxidativo en queratinocitos primarios y en Phenion®-FT. Las células NHEK y los tejidos Phenion®-FT se incubaron con Obacunona (12,5 μM, 25 μM y 50 μM) durante 24h y a continuación se irradiaron con 5 y 20 J/cm² de luz solar completa respectivamente. (A) Tras la irradiación, se analizaron los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) mediante citometría de flujo con la sonda CM-H₂DCFDA. (B) Tras la irradiación, se cuantificaron los niveles de glutatión (GSH) mediante el kit ‘GSH-Glo™ Glutathione Assay’. (C-E) 24h tras la irradiación, se midieron los niveles de expresión génica de quinona oxidoreductasa (NQO1), hemo oxigenasa-1 (HO-1) Y glutatión peroxidasa 1 (GPX1) mediante PCR a tiempo real. Todos los resultados están expresados como media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. *p<0.05 respecto a control. #p<0.05 respecto a control irradiado (J/cm²).

4.7.4 La obacunona previene frente a la apoptosis inducida por la luz solar en queratinocitos primarios y en el modelo de piel 3D Phenion®-FT.

El efecto protector de la obacunona frente a la apoptosis celular inducida tras la exposición solar se estudió mediante citometría de flujo en los queratinocitos NHEK y mediante inmunohistoquímica de Caspasa-3 en Phenion®-FT. La irradiación con luz

solar aumentó el porcentaje de queratinocitos apoptóticos, efecto que previno significativamente el tratamiento previo con obacunona (Figura 66A, B). Asimismo, en el modelo Phenion-FT, tras la irradiación se observa el aumento de marcaje (marrón) del marcador de apoptosis Caspasa-3, mientras que en los tejidos tratados con obacunona disminuyó dicho marcaje (Figura 66C, D).

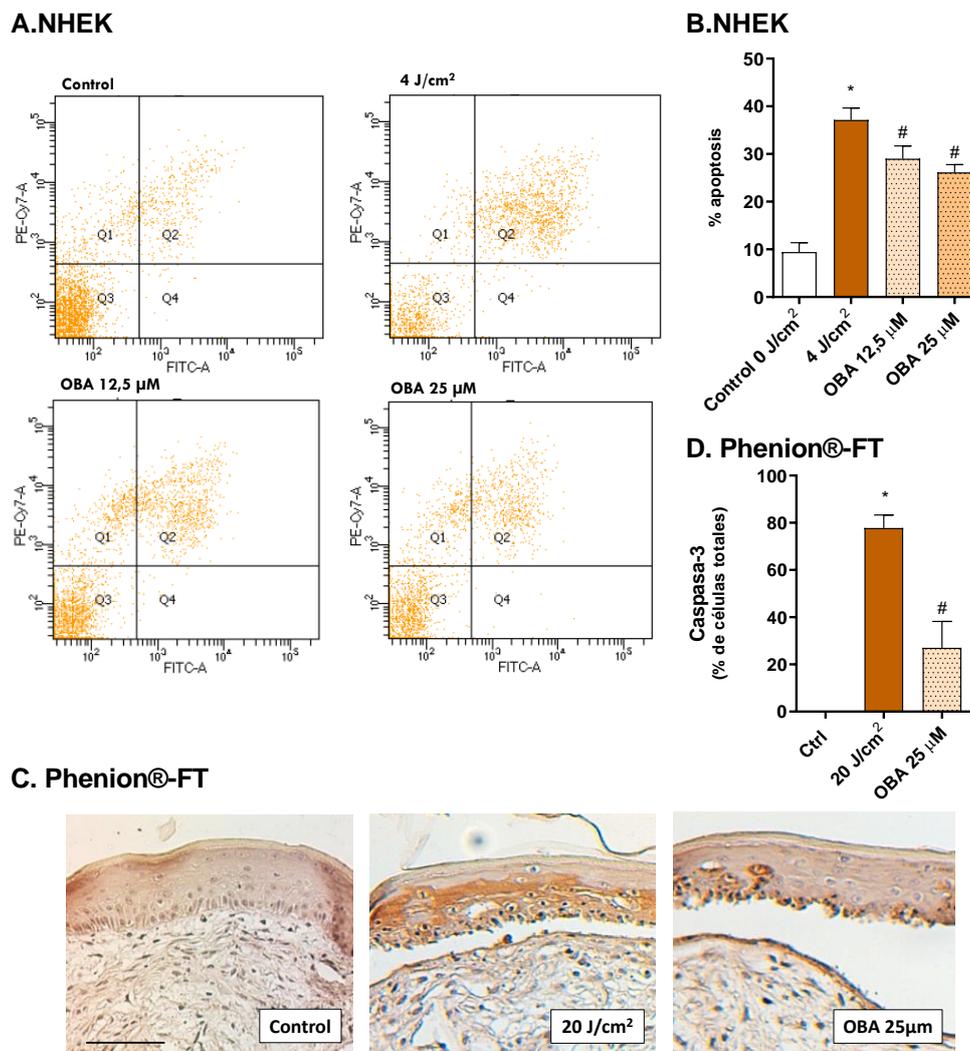


Figura 66. La obacunona revierte apoptosis celular mediada por caspasas. Las células NHEK y los tejidos Phenion®-FT se incubaron con Obacunona (12,5 µM, 25 µM y 50 µM) durante 24h y a continuación se irradiaron con 4 y 20 J/cm² de luz solar completa respectivamente. 24h tras la irradiación se midió la apoptosis mediante detección de Anexina V-FITC por citometría de flujo. (A) Diagramas del análisis de la anexina V frente al yoduro de propidio (PI). Los cuartiles en los que se divide el diagrama son: Q1 células necróticas (PI/FITC, +/+); Q2 células apoptóticas tardías (PI/FITC, +/+); Q3 células viables (PI/FITC, -/-) y Q4 células apoptóticas tempranas (PI/FITC, -/+). (B) Representación gráfica del porcentaje de apoptosis celular extraído de la media los cuartiles Q2 y Q4. (C) Imágenes representativas de las inmunohistoquímicas de Phenion-FT® marcadas para caspasa-3 (marrón) y definidas con hematoxilina. Escala 100 µm. (D) Representación gráfica del porcentaje de células marcadas por Caspasa-3 en las inmunohistoquímicas, medias representativas de al menos tres muestras

de cada grupo y varios campos de cada sección del tejido. Todos los resultados están expresados como media \pm SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a control. # $p < 0.05$ respecto a 4J/cm² o 20 J/cm².

4.7.5 La obacunona activa la cascada de señalización de Nrf2 en queratinocitos NHEK y en los queratinocitos de línea keratinoSens®.

Los queratinocitos NHEK se transfectaron transitoriamente con siARN(Nrf2) para reducir la expresión de Nrf2. Como se puede observar en la Figura 67A, el silenciamiento se llevó a cabo correctamente ya que los niveles de expresión génica de Nrf2 en todas las condiciones, se redujeron significativamente en comparación con los controles de siARN(-). Así pues, se analizaron los genes de la respuesta antioxidante inducida por Nrf2 y se observó que, en las condiciones sin silenciamiento, el tratamiento con Obacunona aumentó significativamente la expresión de HO1 y NQO1. Sin embargo, cuando el gen Nrf2 estaba silenciado, este aumento de la expresión génica en ambos marcadores se inhibió, lo que indica que en los queratinocitos el efecto antioxidante inducido por la obacunona está mediado por la activación de Nrf2 (Figura 67B,C). Para apoyar estos resultados se realizó el ensayo KeratinoSens. Los keratinosens son células transfectadas con el gen de la luciferasa unido a un promotor de la respuesta antioxidante al que se une Nrf2, por lo que aumenta la actividad de la luciferasa cuando este gen se activa. Como se observa en la Figura 67D, la actividad de la luciferasa aumentó significativamente tras la incubación de las células KeratinoSens con Obacunona.

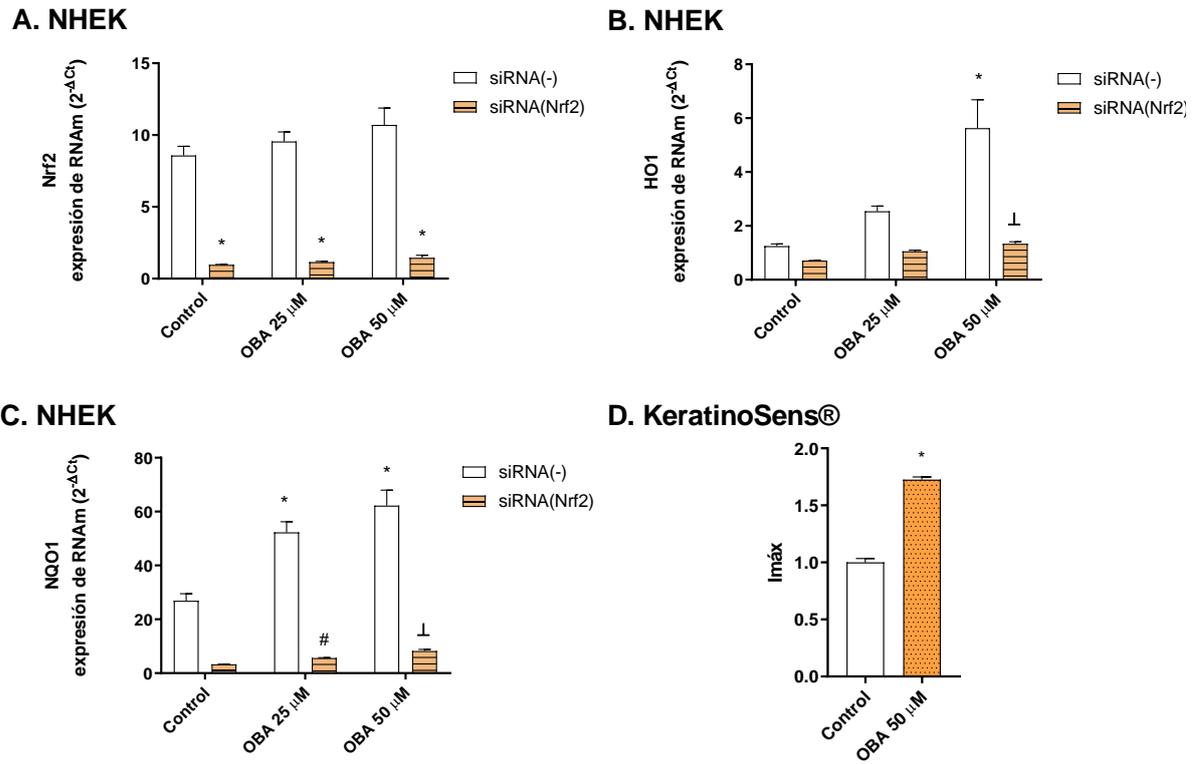


Figura 67. La Obacunona activa la ruta de señalización de Nrf2 en queratinocitos NHEK y en los KeratinoSens®. (A-C) Los queratinocitos NHEK se transfectaron transitoriamente con siRNA control (-) o siRNA-Nrf2 y las células silenciadas se trataron con Obacunona 25 μM y 50 μM. 24h tras la incubación con obacunona, se midieron los niveles de expresión génica de Nrf2, quinona oxidoreductasa (NQO1) y hemo oxigenasa-1 (HO-1) mediante PCR a tiempo real. Todos los resultados están expresados como media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni * $p < 0.05$ respecto a siRNA(-) control. # $p < 0.05$ respecto a siRNA(-) OBA 25. ⊥ $p < 0.05$ respecto a siRNA(-) OBA 50. (D) Los queratinocitos se incubaron con Obacunona 50 μM y se llevó a cabo la prueba ARE-Nrf2 luciferasa. Los datos se expresaron como inducción de la actividad luciferasa (Imax). Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. * $p < 0.05$ respecto al grupo control.

4.8 EVALUACIÓN DE LA FOTOPROTECCIÓN DE PROTECTORES SOLARES FORMULADOS POR RNB EN EL MODELO DE PIEL 3D PHENION®-FT.

Una vez validado el potencial de los tejidos Phenion®-FT en la evaluación de la fotoprotección y conociendo los efectos de las distintas luces de espectro sobre dichos tejidos, se escogieron dosis por encima de las dosis mínimas biológicas, como estímulo para determinar el efecto fotoprotector de las formulaciones de RNB. La dosis mínima biológica se define como la dosis mínima necesaria para inducir cambios morfológicos o estructurales sin llegar a la muerte del tejido. Previamente a los estudios de fotoprotección, se verificó, mediante ensayos de irritación en base a las directrices de la OECD [103], que ninguna de las formulaciones por se inducían efectos sobre los tejidos 3D (ANEXO 1) [107]. A continuación, se muestran los resultados de los experimentos de fotoprotección en cada una de las luces del espectro.

LUZ SOLAR COMPLETA Y UVA

4.8.1 Protección de las formulaciones frente la pérdida de viabilidad, aumento de citotoxicidad e inflamación inducidas por luz solar completa y luz UVA en Phenion®-FT

La dosis de 25 J/cm² de luz solar completa, indujo un aumento de la citotoxicidad que disminuyeron significativamente las formulaciones 3,4,5 (Figura 68A). En cuanto a la inflamación producida, las formulaciones 2,3,4,5 previnieron frente al aumento de la liberación de IL-1 α y IL-8, mientras que ninguna de ellas protegió significativamente frente al aumento de IL-6 (Figura 68 B-D).

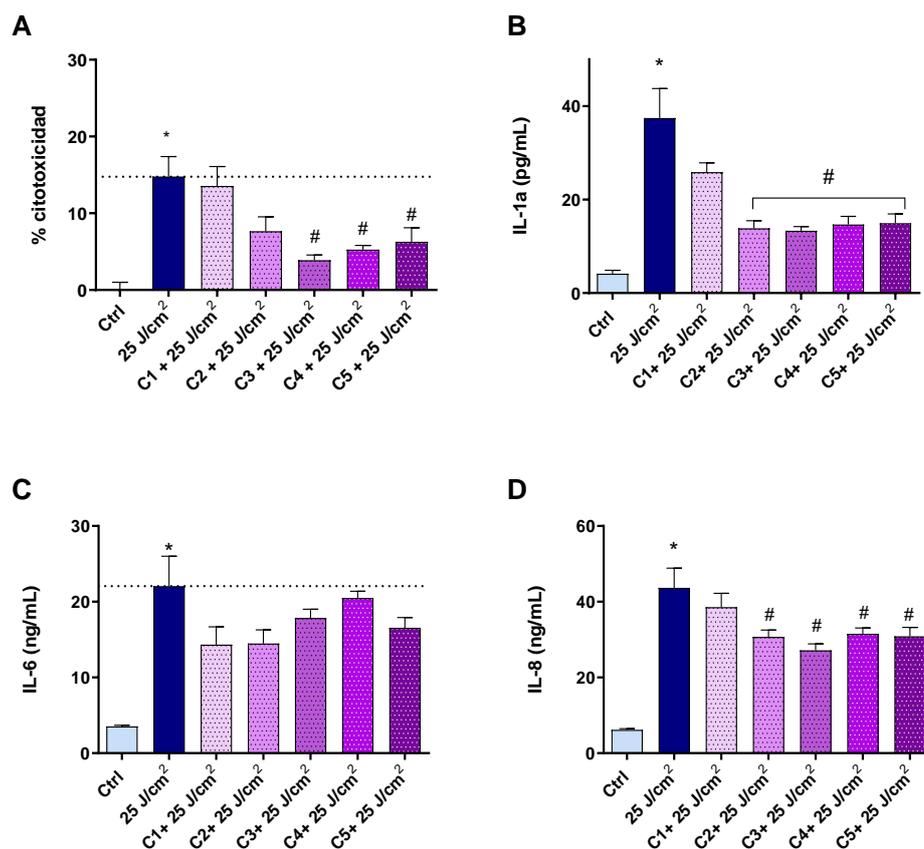


Figura 68. Protección de las formulaciones 1-5 frente al aumento de citotoxicidad y producción de citoquinas inflamatorias inducido por la luz solar completa. Los tejidos Phenion®-FT se trataron tópicamente con 2mg/cm² de las formulaciones correspondientes y se irradiaron con 25 J/cm² de luz solar completa. 24h tras la irradiación, se realizó el ensayo de citotoxicidad LDH (A) y se cuantificaron los niveles de las interleucinas IL-1α (B), IL-6 (C) y IL-8 (D) mediante ELISA. Todos los resultados están expresados como media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. *p<0.05 respecto a control.; #p<0.05 respecto a 25 J/cm². C1: Formulación 1, C2: Formulación 2, C3: Formulación 3, C4: Formulación 4, C5: Formulación 5.

En el caso de la luz UVA sola, se eligió una dosis más alta de 45 J/cm² y produjo una disminución de la viabilidad del 50%. Las formulaciones 3 y 5 protegieron frente a esta pérdida de viabilidad (Figura 69A, B). No obstante, solo se produjo el aumento de la citoquina IL-1α y la C5 fue la única capaz de evitar este aumento (Figura 69C). Solo en presencia de fibroblastos la IL-1-α producida por los queratinocitos estimula las citoquinas secundarias IL-6 e IL-8. En este caso, lo que pudo ocurrir es que la dosis de 45J/cm² produjo más muerte celular de la esperada y dañó la dermis hasta tal punto que los fibroblastos no produjeron niveles comparables de dichas citoquinas IL-6 e IL-8.

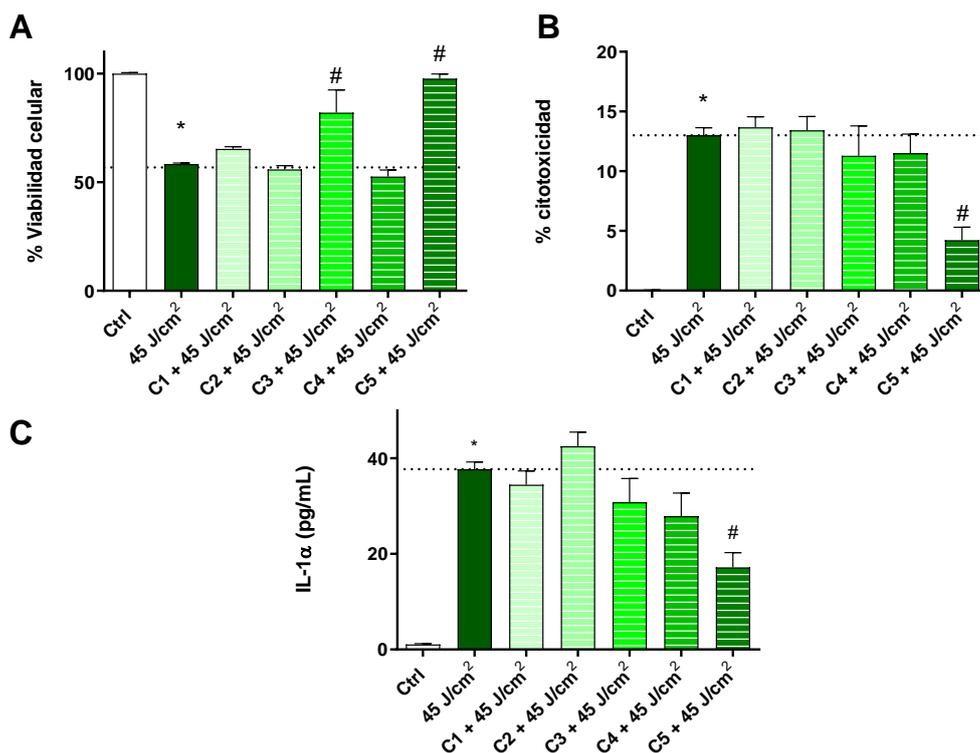


Figura 69. Protección de las formulaciones 1-5 frente a la modulación de viabilidad, citotoxicidad y producción de citoquinas inflamatorias inducido por la UVA. Los tejidos Phenion-FT se trataron tópicamente con 2mg/cm² de las formulaciones correspondientes y se irradiaron con 45 J/cm² de luz solar completa. 24h tras la irradiación, se realizó el ensayo de viabilidad MTT (A), citotoxicidad LDH (B), y se cuantificaron los niveles de la interleucina IL-1α (C) mediante ELISA. Todos los resultados están expresados como media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. *p<0.05 respecto a control.; #p<0.05 respecto a 45 J/cm². C1: Formulación 1, C2: Formulación 2, C3: Formulación 3, C4: Formulación 4, C5: Formulación 5.

4.8.2 Protección de las formulaciones frente la modulación de biomarcadores dérmicos y la alteración de la arquitectura tisular inducidas por luz solar completa y luz UVA en Phenion®-FT

Ante la exposición de luz solar completa, todas las formulaciones previnieron frente al aumento del antioxidante GPX1 (Figura 70A). Los marcadores de matriz extracelular DCN y ELN también aumentaron, pero solo la C3 revirtió este efecto (Figura 70B, C). Por otra parte, las formulaciones 1 y 2 previnieron significativamente frente al aumento de la producción de COL1A1, y las formulaciones 1,2,4,5 frente al aumento de COL7A1 (Figura 70D, E). La luz solar aumentó además la síntesis de MMP1, efecto

que las formulaciones no consiguieron revertir (Figura 70F). Sin embargo, la MMP9 sufrió un descenso frente al cual la formulación 1 demostró protección (Figura 70G).

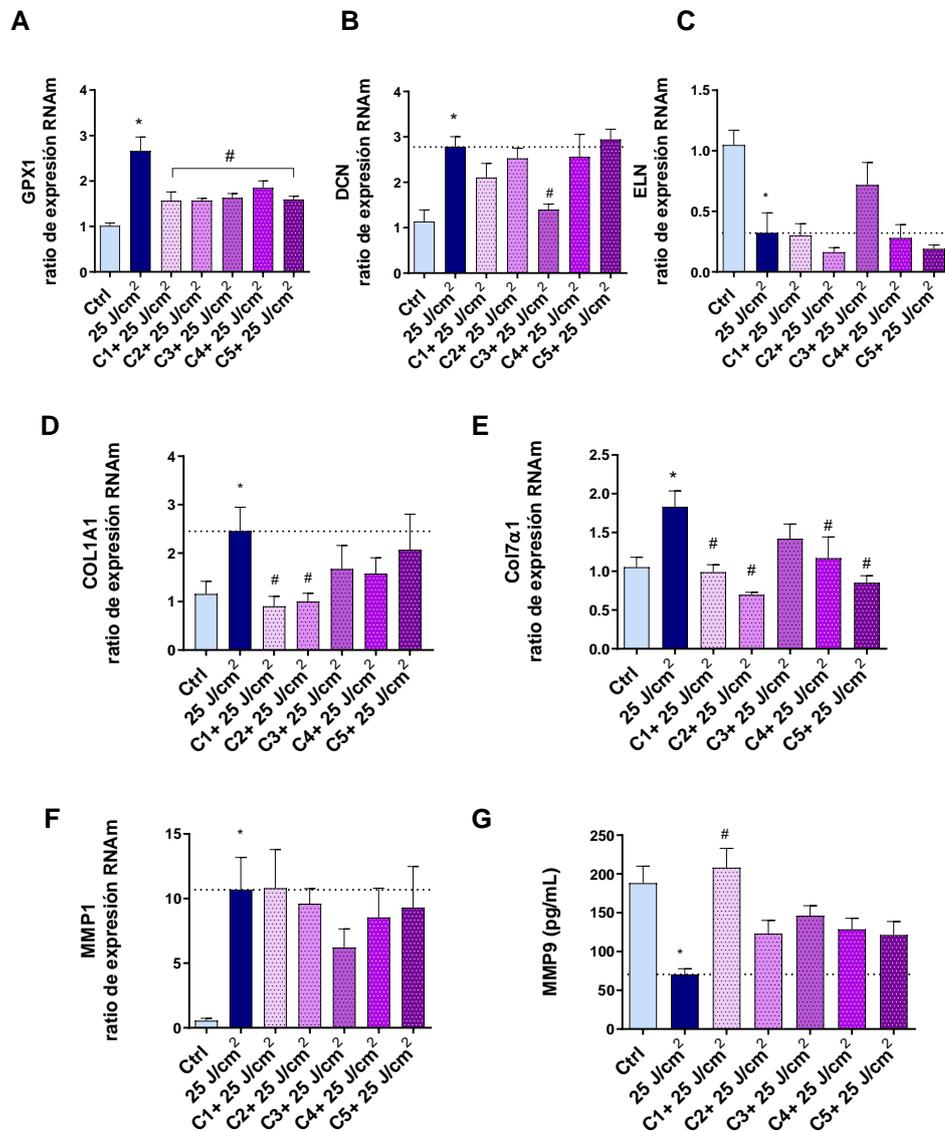


Figura 70. Protección de las formulaciones 1-5 frente a la modulación de biomarcadores dérmicos inducida por la luz solar completa. Los tejidos Phenion®-FT se trataron tópicamente con 2mg/cm² de las formulaciones correspondientes y se irradiaron con 25 J/cm² de luz solar completa. 24h tras la irradiación, mediante PCR a tiempo real, se midieron los niveles de expresión génica de los siguientes genes: (A) Glutación peroxidasa-1 (GPX1), (B) decorina (DCN), (C) elastina (ELN), (D) colágeno tipo 1 alfa 1 (COL1A1), (E) colágeno tipo 7 alfa 1 (COL7A1), (F) metaloproteinas 1 (MMP1) y (G) metaloproteinas 9 (MMP9). Todos los resultados están expresados como media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. *p<0.05 respecto a control. #p<0.05 respecto a 25 J/cm². C1: Formulación 1, C2: Formulación 2, C3: Formulación 3, C4: Formulación 4, C5: Formulación 5.

En el caso de la irradiación con UVA sola, el estímulo producido por una dosis tan alta de UVA, 45 J/cm², indujo el aumento de la expresión de los marcadores GPX1, DCN, COL1A1 y COL7A1, mientras que disminuyó los niveles de las metaloproteinasas 1 y 9. Ninguna de las formulaciones protegió frente el aumento de expresión de GPX1 (Figura 71A). Las formulaciones 1 y 4 revirtieron el aumento de DCN (Figura 71B), y la C3 y C5 el de COL1A1 (Figura 71C). Por otra parte, todas las formulaciones protegieron frente al aumento de COL7 α 1 (Figura 71D) y solo la C5 y la C3 previnieron significativamente el descenso de las metaloproteinasas 1 y 9, respectivamente (Figura 71 E,F). A dosis tan altas de irradiación no hay variaciones en la expresión de la elastina (datos no mostrados).

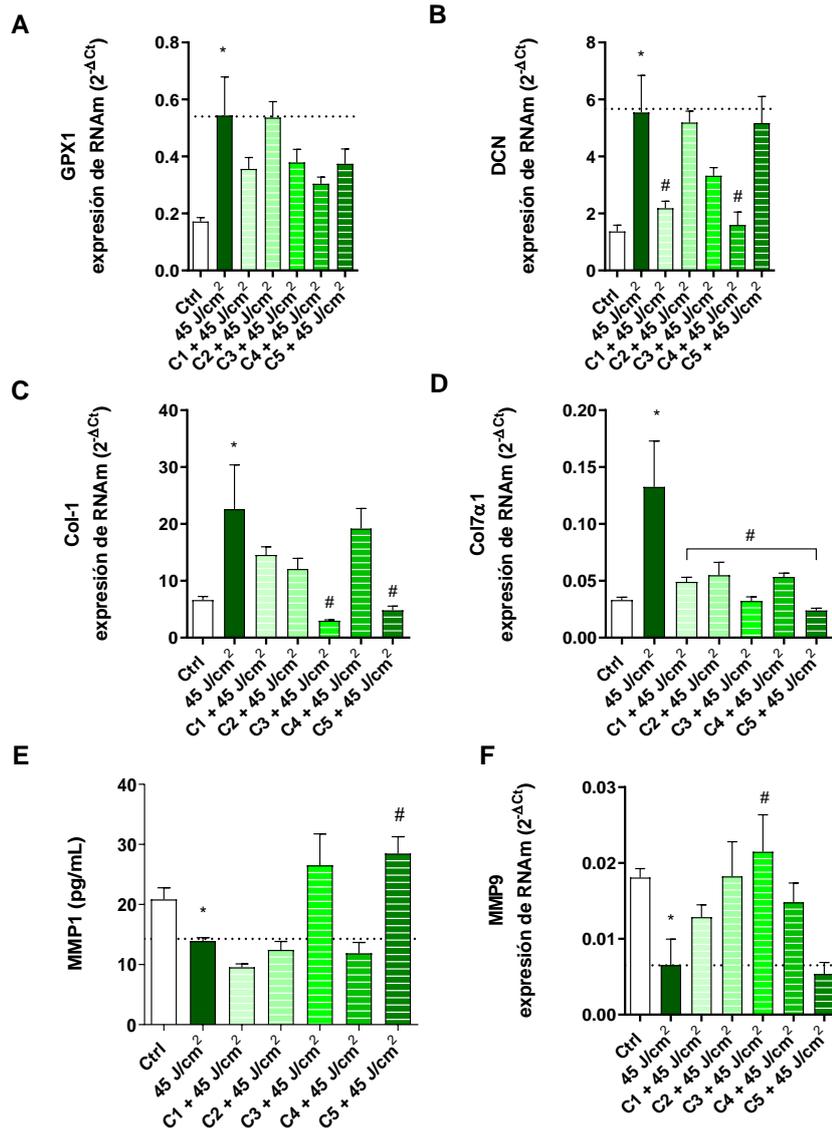


Figura 71. Protección de las formulaciones 1-5 frente a la modulación de biomarcadores dérmicos inducida por la luz UVA. Los tejidos Phenion®-FT se trataron tópicamente con 2mg/cm² de las formulaciones correspondientes y se irradiaron con 45 J/cm² de luz UVA. 24h tras la irradiación, mediante PCR a tiempo real, se midieron los niveles de expresión génica de los siguientes genes: (A) Glutatión peroxidasa-1 (GPX1), (B) decorina (DCN), (C) colágeno tipo 1 alfa 1 (COL1A1), (D) colágeno tipo 7 alfa 1 (COL7A1), (E) metaloproteinas 1 (MMP1) y (F) metaloproteinas 9 (MMP9). Todos los resultados están expresados como media \pm SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a control. # $p < 0.05$ respecto a 45 J/cm². C1: Formulación 1, C2: Formulación 2, C3: Formulación 3, C4: Formulación 4, C5: Formulación 5.

En cuanto a los efectos en la arquitectura tisular, los 25 J/cm² de luz solar completa produjeron la muerte de los queratinocitos en la epidermis, acumulados en la capa suprabasal y la aparición de las *sunburn cells*. Asimismo, la radiación afectó en la

pérdida de fibroblastos dérmicos y el debilitamiento de la unión dermo-epidérmica (Figura 72). La dosis de 45 J/cm² de UVA sola generó la misma destrucción de la morfología, además de la vacuolización de los queratinocitos en las capas más externas (Figura 73). Todas las formulaciones protegieron frente a la luz solar completa, con cortes histológicos muy similares a los del control no irradiado (Figura 72), mientras que en el caso de la luz UVA, solo protegieron ligeramente frente a los efectos inducidos y no se observó una protección tan completa como para todo el espectro de luz solar (Figura 73).

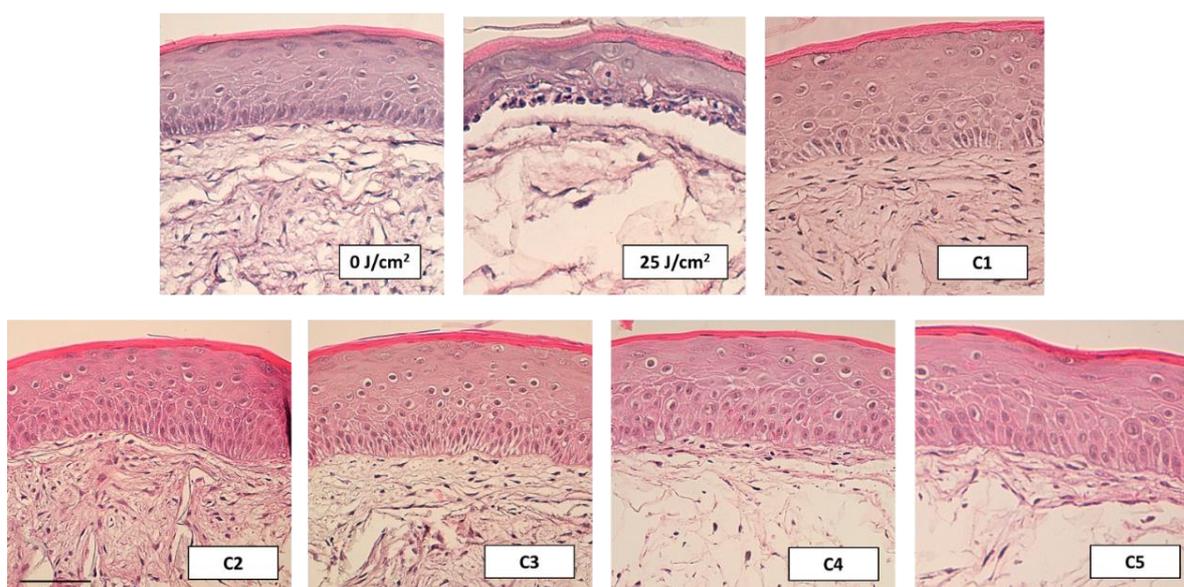


Figura 72. Protección de las formulaciones 1-5 frente a las alteraciones de la arquitectura tisular de Phenion®-FT inducidas por la luz solar completa. Los tejidos Phenion®-FT se trataron tópicamente con 2mg/cm² de las formulaciones correspondientes y se irradiaron con 25 J/cm² de luz solar completa. Las tinciones de hematoxilina y eosina se realizaron a partir de los cortes histológicos de dichos tejidos. Escala 100 μ m. C1: Formulación 1, C2: Formulación 2, C3: Formulación 3, C4: Formulación 4, C5: Formulación 5.

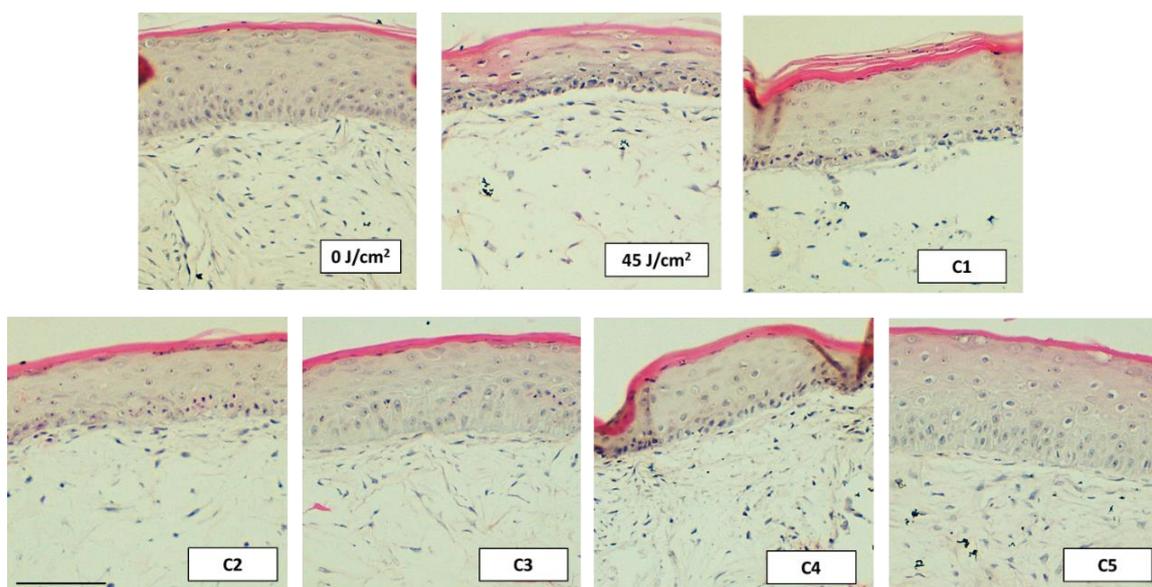


Figura 73. Protección de las formulaciones 1-5 frente a las alteraciones de la arquitectura tisular de Phenion®-FT inducidas por la luz UVA. Los tejidos Phenion®-FT se trataron tópicamente con $2\text{mg}/\text{cm}^2$ de las formulaciones correspondientes y se irradiaron con $45\text{ J}/\text{cm}^2$ de luz UVA. Las tinciones de hematoxilina y eosina se realizaron a partir de los cortes histológicos de dichos tejidos. Escala $100\ \mu\text{m}$. C1: Formulación 1, C2: Formulación 2, C3: Formulación 3, C4: Formulación 4, C5: Formulación 5.

4.8.3 Protección de las formulaciones frente la modulación de los marcadores p21 y p53 inducida por la luz solar completa y luz UVA en Phenion®-FT

Tanto en la luz solar completa como en la luz UVA, se produjo una disminución de la expresión protéica tanto de p21 como de p53. En el caso del espectro completo, todas las formulaciones excepto la 1 mantuvieron los niveles de p21 similares a los del control sin irradiar (Figura 74B), mientras que solo la C5 protegió frente a las variaciones de p53 (Figura 74C). Con la radiación UVA, todas las formulaciones previnieron la modulación de ambos genes inducida (Figura 75A-C).

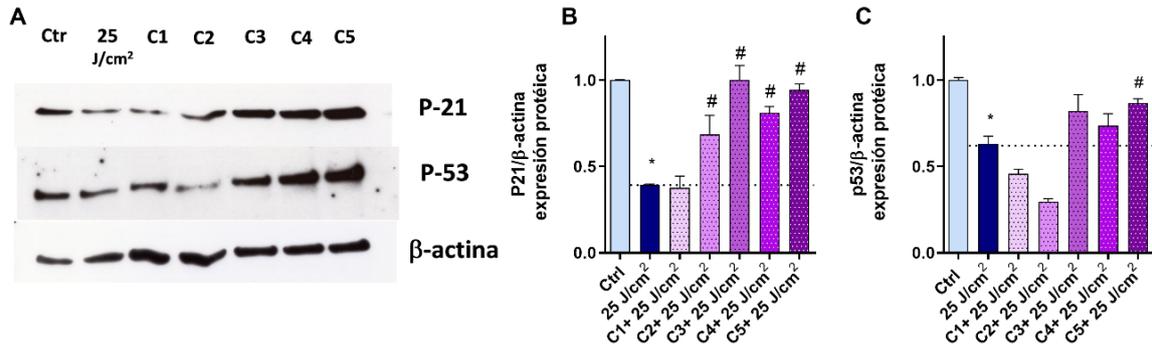


Figura 74. Protección de las formulaciones 1-5 frente a modulación de la expresión protéica de p21 y p53 inducida por la luz solar completa en Phenion®-FT. Los tejidos Phenion®-FT se trataron tópicamente con 2mg/cm² de las formulaciones correspondientes y se irradiaron con 25 J/cm² de luz solar completa. (A) 24h tras la irradiación, se midieron los niveles de expresión protéica de p53 y p21 mediante Western Blot. Los diagramas de barras representan los datos de densitometría de la proteína, respecto al control constitutivo para p21 (B) y p53 (C). Todos los resultados están expresados como media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. *p<0.05 respecto a control. #p<0.05 respecto a 25 J/cm². C1: Formulación 1, C2: Formulación 2, C3: Formulación 3, C4: Formulación 4, C5: Formulación 5.

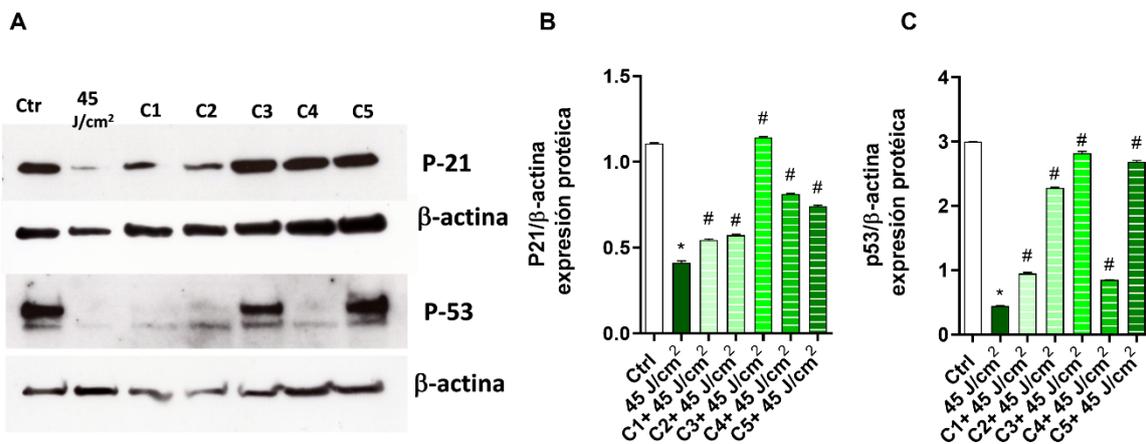


Figura 75. Protección de las formulaciones 1-5 frente a modulación de la expresión protéica de p21 y p53 inducida por la luz UVA en Phenion®-FT. Los tejidos Phenion®-FT se trataron tópicamente con 2 mg/cm² de las formulaciones correspondientes y se irradiaron con 45 J/cm² de luz UVA. (A) 24h tras la irradiación, se midieron los niveles de expresión protéica de p53 y p21 mediante Western Blot. Los diagramas de barras representan los datos de densitometría de la proteína, respecto al control constitutivo para p21 (B) y p53 (C). Todos los resultados están expresados como media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. *p<0.05 respecto a control. #p<0.05 respecto a 45 J/cm². C1: Formulación 1, C2: Formulación 2, C3: Formulación 3, C4: Formulación 4, C5: Formulación 5.

LUZ AZUL

4.8.4 Protección de las formulaciones frente la pérdida de viabilidad, aumento de citotoxicidad e inflamación inducidas por la luz azul en Phenion®-FT

En el caso de la luz azul, para poder evaluar la fotoprotección de distintos biomarcadores se eligió, al igual que en el caso de la luz solar completa y UVA, dosis por encima de las dosis mínimas biológicas. La luz azul a 90 J/cm², disminuyó la viabilidad y aumentó la citotoxicidad, efectos que revirtieron significativamente las formulaciones 3 y 4 en el caso de la viabilidad y todas las formulaciones excepto la 5 en la citotoxicidad (Figura 76A, B). En cuanto a la inflamación producida por la luz azul, las formulaciones no previnieron el aumento de IL-6 y IL-8, pero la C2, C4 y C5 redujo significativamente el aumento de IL-1α producido por la luz azul (Figura 76C-E).

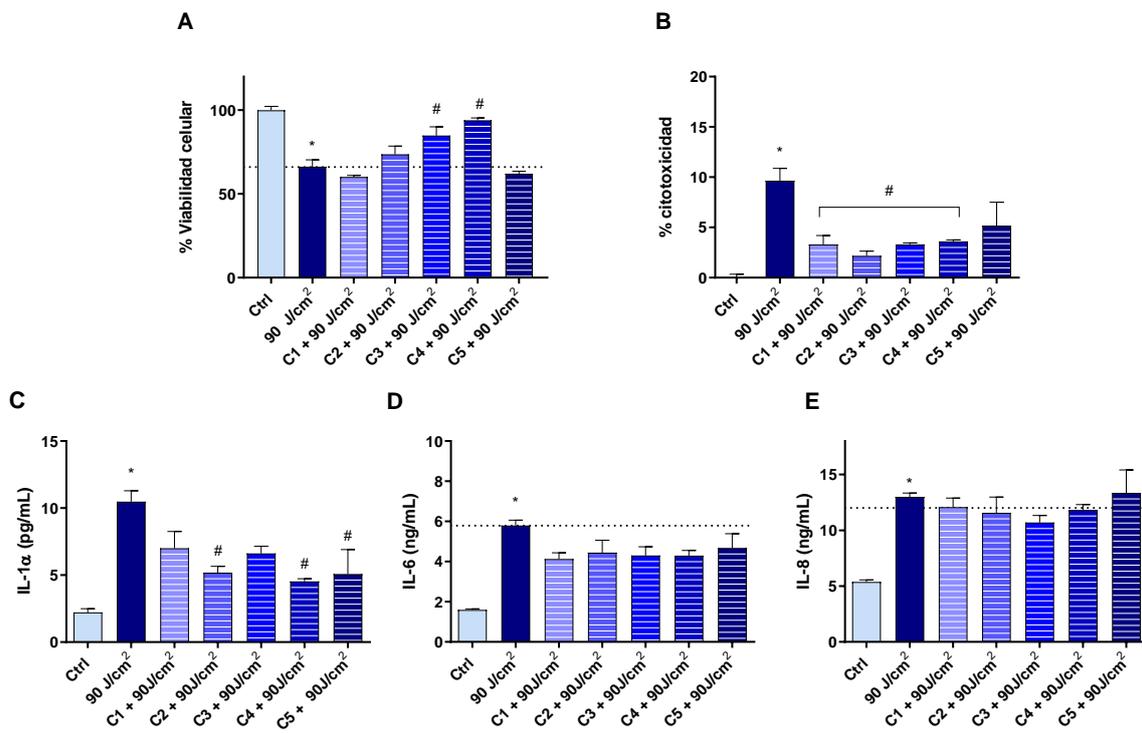


Figura 76. Protección de las formulaciones 1-5 frente al aumento de citotoxicidad y producción de citoquinas inflamatorias inducido por la luz solar completa. Los tejidos Phenion-FT se trataron tópicamente con 2mg/cm² de las formulaciones correspondientes y se irradiaron con 90 J/cm² de luz azul. 24h tras la irradiación, se realizó el ensayo de viabilidad (A), citotoxicidad LDH (B) y se cuantificaron los niveles de las interleucinas IL-1α (C), IL-6 (D) y IL-8 (E) mediante ELISA. Todos los resultados están

*expresados como media \pm SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a control.: # $p < 0.05$ respecto a 90 J/cm². C1: Formulación 1, C2: Formulación 2, C3: Formulación 3, C4: Formulación 4, C5: Formulación 5.*

4.8.5 Protección de las formulaciones frente la modulación de biomarcadores dérmicos y la alteración de la arquitectura tisular inducidas por la luz azul en Phenion®-FT

El estímulo de 90 J/cm² de luz azul indujo el aumento de la expresión de los marcadores GPX1, ELN, DCN, MMP1 y COL1A1, mientras que disminuyó los niveles de MMP9. Todas las formulaciones revirtieron en parte el aumento de expresión de GPX1, ELN y COL1A1, aunque los efectos significativos se observaron en las C2 y C3 para GPX1 (Figura 77A), todas las formulaciones excepto C1 en el caso de ELN (Figura 77B) y todas las formulaciones excepto C4 en COL1A1 (Figura 77C). No obstante, ninguna protegió frente al aumento de la MMP1 (Figura 77D) y solo las formulaciones 1,3 y 5 previnieron la disminución de MMP9 (Figura 77E).

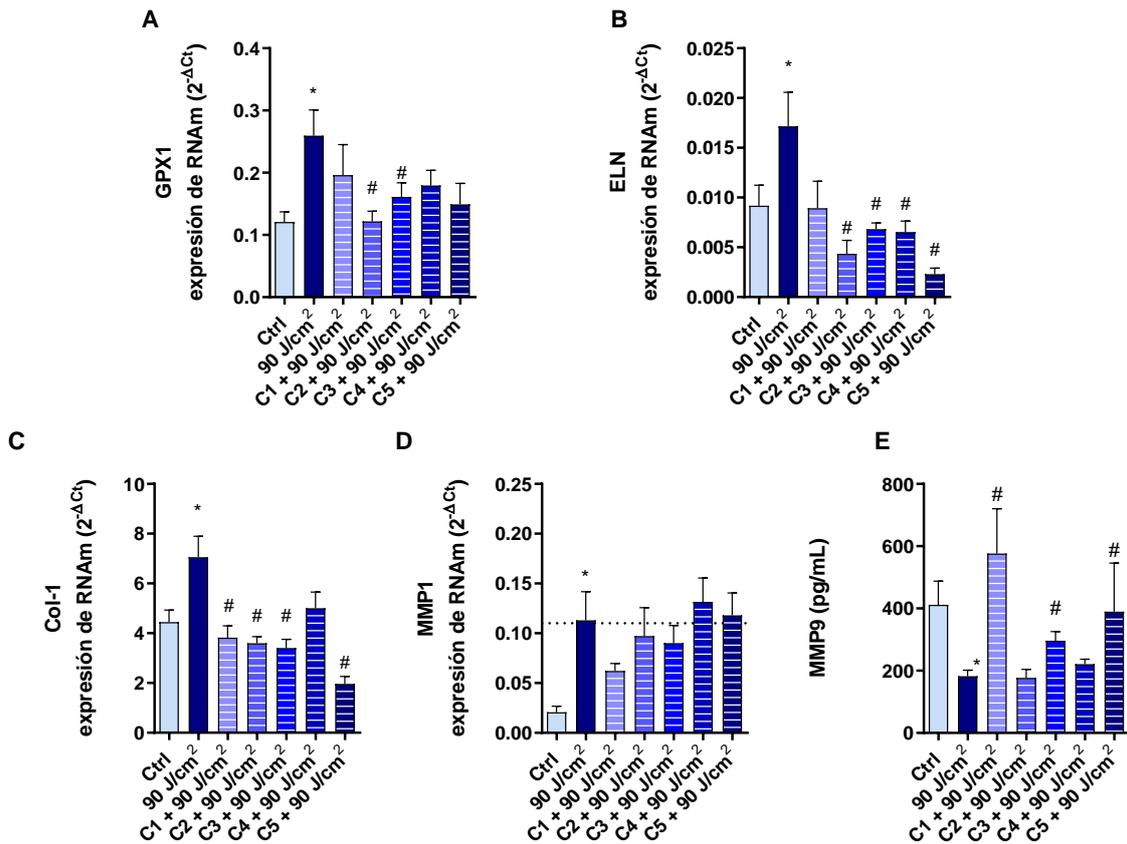


Figura 77. Protección de las formulaciones 1-5 frente a la modulación de biomarcadores dérmicos inducida por la luz azul. Los tejidos Phenion-FT se trataron tópicamente con 2mg/cm² de las formulaciones correspondientes y se irradiaron con 90 J/cm² de luz azul. 24h tras la irradiación, mediante PCR a tiempo real, se midieron los niveles de expresión génica de los siguientes genes: (A) Glutatión peroxidasa-1 (GPX1), (B) elastina (ELN), (C) colágeno tipo 1 alfa 1 (COL1A1), (D) metaloproteinas 1 (MMP1) y (E) metaloproteinas 9 (MMP9). Todos los resultados están expresados como media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. *p<0.05 respecto a control. #p<0.05 respecto a 90 J/cm². C1: Formulación 1, C2: Formulación 2, C3: Formulación 3, C4: Formulación 4, C5: Formulación 5.

En cuanto a los efectos en la arquitectura tisular, los 90 J/cm² de luz azul no afectaron en gran medida a los queratinocitos de las capas basales y suprabasales, aunque indujeron una ligera vacuolización y sí que alteró morfológicamente la organización del estrato córneo además de la pérdida de fibroblastos dérmicos. Todas las formulaciones excepto la 5 protegieron en parte frente a los efectos producidos en cuanto a la desestructuración del estrato córneo y en todos los casos disminuyeron la muerte de los fibroblastos dérmicos (Figura 78).

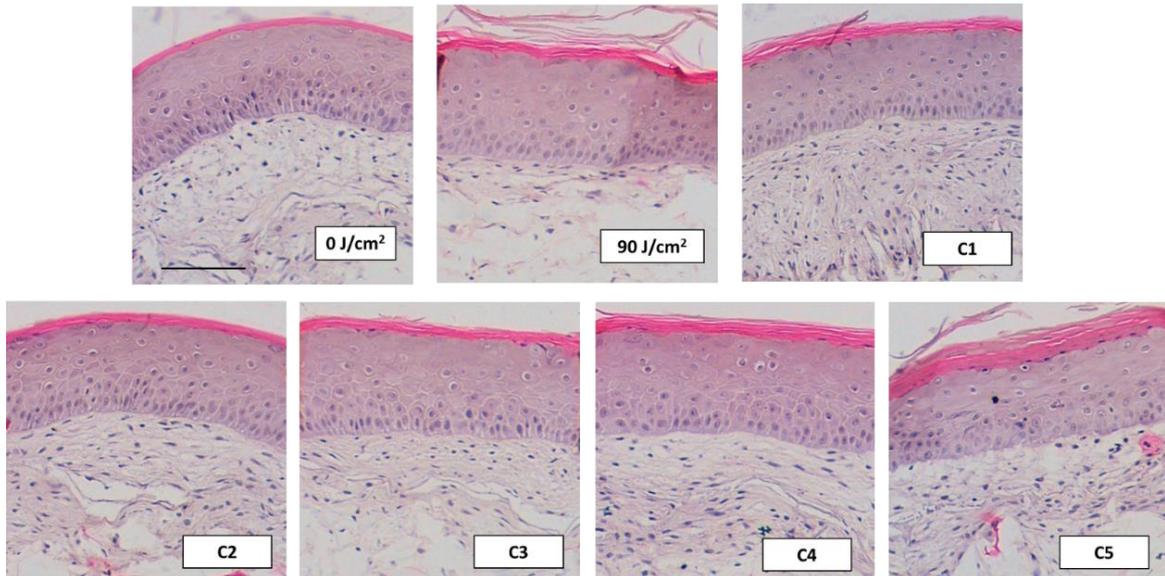


Figura 78. Protección de las formulaciones 1-5 frente a las alteraciones de la arquitectura tisular de Phenion®-FT inducidas por la luz azul. Los tejidos Phenion®-FT se trataron tópicamente con 2mg/cm² de las formulaciones correspondientes y se irradiaron con 90 J/cm² de luz azul. Las tinciones de hematoxilina y eosina se realizaron a partir de los cortes histológicos de dichos tejidos. Escala 100 μm. C1: Formulación 1, C2: Formulación 2, C3: Formulación 3, C4: Formulación 4, C5: Formulación 5.

4.8.6 Protección de las formulaciones frente la modulación de los marcadores p21 y p53 inducida por la luz azul en Phenion®-FT

La luz azul produjo una disminución de la expresión protéica de p21 y el aumento de p53. Todas las formulaciones excepto la 1 mantuvieron los niveles de p21 similares a los del control sin irradiar (Figura 79B), mientras que solo las C2 y C5 protegieron frente a las variaciones de p53 (Figura 79C).

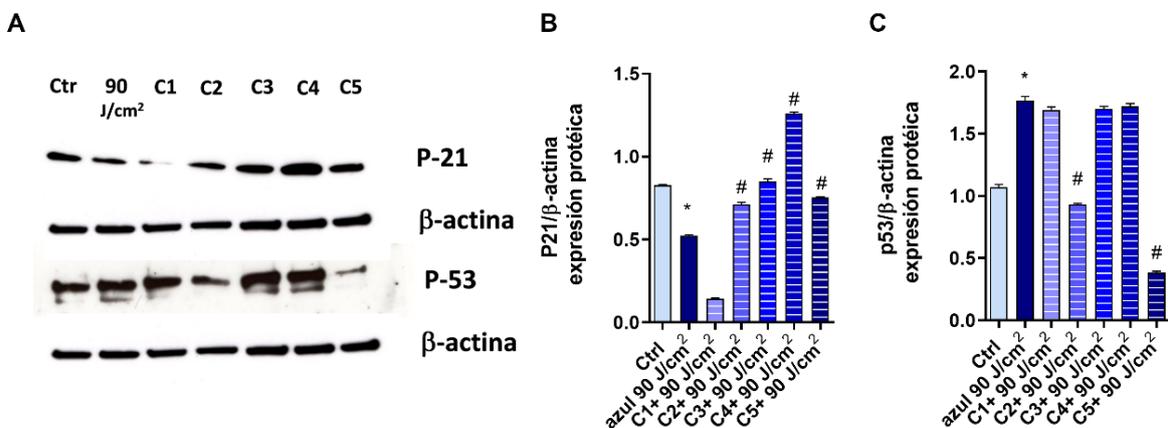


Figura 79. Protección de las formulaciones 1-5 frente a modulación de la expresión protéica de p21 y p53 inducida por la luz solar completa en Phenion®-FT. Los tejidos Phenion®-FT se trataron

tópicamente con 2mg/cm² de las formulaciones correspondientes y se irradiaron con 90 J/cm² de luz azul. (A) 24h tras la irradiación, se midieron los niveles de expresión protéica de p53 y p21 mediante western blot. Los diagramas de barras representan los datos de densitometría de la proteína, respecto al control constitutivo para p21 (B) y p53 (C). Todos los resultados están expresados como media \pm SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a control. # $p < 0.05$ respecto a 90 J/cm². C1: Formulación 1, C2: Formulación 2, C3: Formulación 3, C4: Formulación 4, C5: Formulación 5.

INFRARROJO

4.8.7 Protección de las formulaciones frente la pérdida de viabilidad, aumento de citotoxicidad e inflamación inducidas por luz infrarroja en Phenion®-FT

En el caso de los experimentos de fotoprotección frente la luz infrarroja se eligió la dosis con la que se obtuvo una mejor respuesta biológica con un panel de marcadores más amplio. Esta dosis de 45 minutos ejerció los efectos biológicos sin aumentar la temperatura del modelo 3D por encima de las alcanzadas *in vivo*. Dicha dosis aumentó la citotoxicidad celular ligeramente y aumentó la liberación de citoquinas inflamatorias al medio de cultivo. Así pues, el tratamiento con la C3 previno en parte de los efectos citotóxicos de esta luz (Figura 80A), así como el aumento de producción de las citoquinas IL-6 e IL-8 (Figura 80D, E). Ninguna de las formulaciones protegió frente al aumento de IL-1 α (Figura 80C), sin embargo, todas inhibieron ligeramente la liberación de IL-6 (Figura 80D), y las formulaciones 1,2,3, la liberación de IL-8 (Figura 80E).

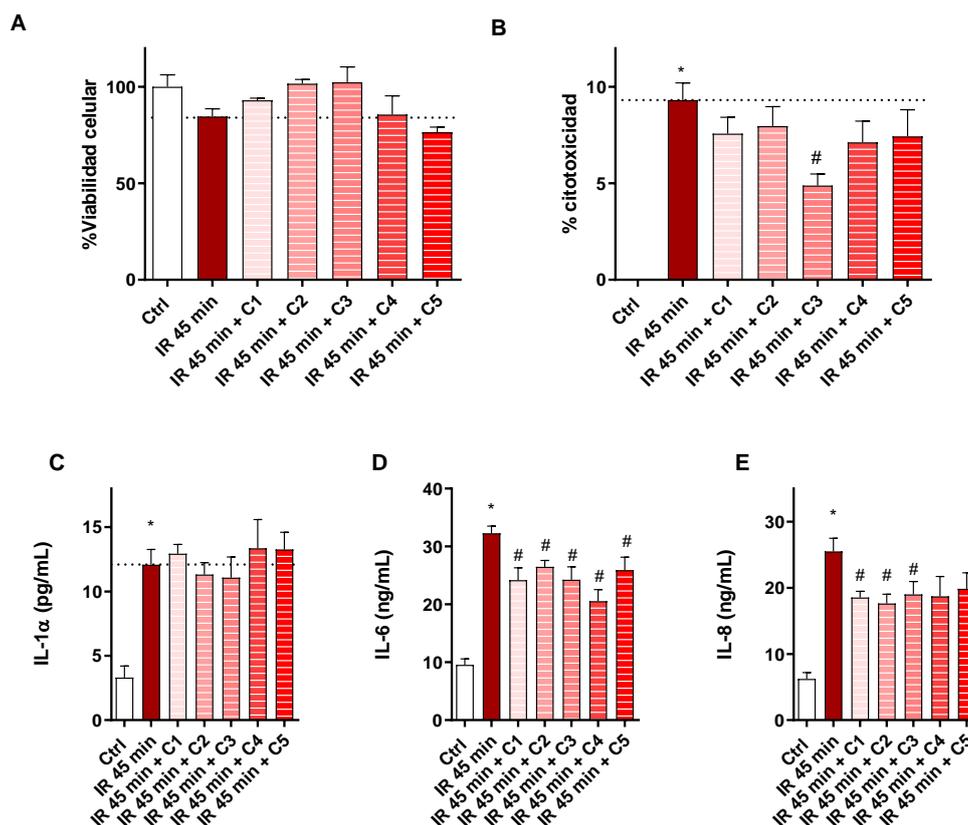


Figura 80. Protección de las formulaciones 1-5 frente al aumento de citotoxicidad y producción de citoquinas inflamatorias inducido por la infrarroja. Los tejidos Phenion®-FT se trataron tópicamente con 2mg/cm² de las formulaciones correspondientes y se irradiaron durante 45 minutos con luz infrarroja. 24h tras la irradiación, se realizó el ensayo de viabilidad MTT (A), citotoxicidad LDH (B) y se cuantificaron los niveles de las interleucinas IL-1α (C), IL-6 (D) e IL-8 (E) mediante ELISA. Todos los resultados están expresados como media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. *p<0.05 respecto a control. #p<0.05 respecto a IR 45 minutos. C1: Formulación 1, C2: Formulación 2, C3: Formulación 3, C4: Formulación 4, C5: Formulación 5.

4.8.8 Protección de las formulaciones frente la modulación de biomarcadores dérmicos y la alteración de la arquitectura tisular inducidas por luz infrarroja en Phenion®-FT

En cuanto a los marcadores dérmicos evaluados, los 45 minutos de exposición a la luz IR disminuyeron la expresión de COL1A1 y ELN, mientras que aumentaron los niveles de MMP1. Las formulaciones 1 y 5 inhibieron parte de la reducción de COLA1 (Figura 81A) y las formulaciones 1,2,3 inhibieron la reducción de ELN significativamente (Figura 81B). Por otra parte, el aumento de MMP1 se vio en parte revertido gracias a la protección de las formulaciones 2,3,4 y 5 (Figura 81C).

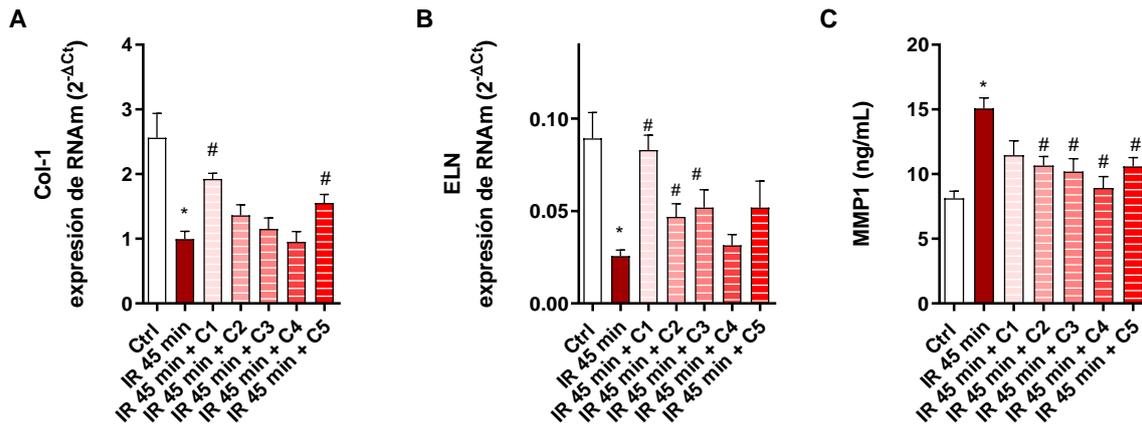


Figura 81. Protección de las formulaciones 1-5 frente a la modulación de biomarcadores dérmicos inducida por la luz infrarroja. Los tejidos Phenion®-FT se trataron tópicamente con 2mg/cm² de las formulaciones correspondientes y se irradiaron durante 45 minutos con luz infrarroja. 24h tras la irradiación, mediante PCR a tiempo real, se midieron los niveles de expresión génica de los siguientes genes: (A) colágeno tipo 1 alfa 1 (COL1A1), (b) elastina (ELN), (C) metaloproteinasa 1 (MMP1). Todos los resultados están expresados como media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. *p<0.05 respecto a control. #p<0.05 respecto a 25 J/cm². #p<0.05 respecto a IR 45 minutos. C1: Formulación 1, C2: Formulación 2, C3: Formulación 3, C4: Formulación 4, C5: Formulación 5.

Como se observó en los experimentos de determinación de los efectos de la luz IR en los modelos Phenion®-FT, La luz infrarroja no dañó de manera visible la estructura de la dermis o la epidermis. El único efecto morfológico que se pudo destacar fue la vacuolización de los queratinocitos desde el estrato granuloso y hasta el basal, efectos, que al aplicar las formulaciones previamente a la irradiación no fueron inhibidos (Figura 82).

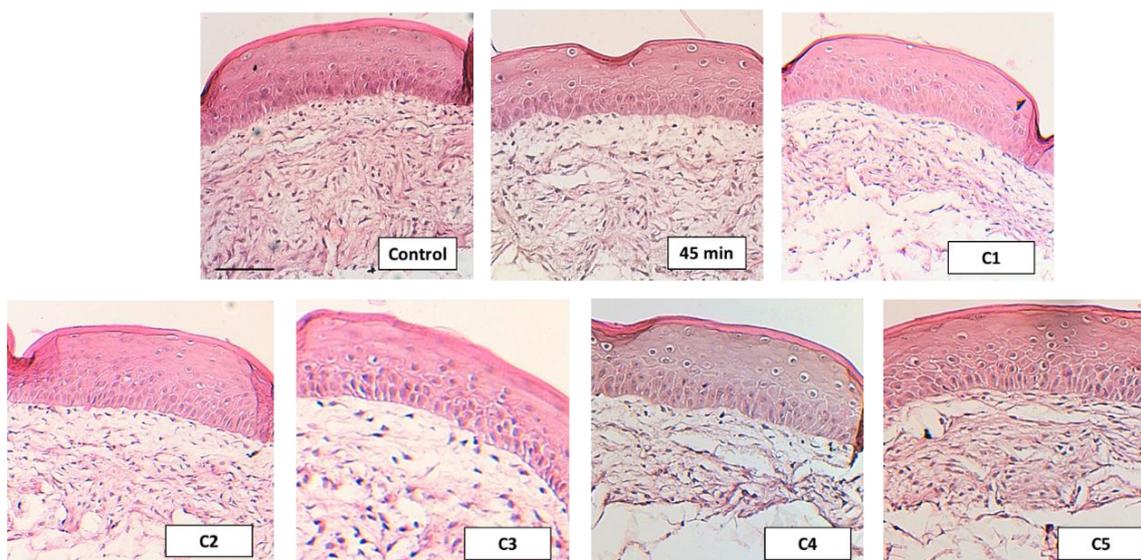


Figura 82. Protección de las formulaciones 1-5 frente a las alteraciones de la arquitectura tisular de Phenion®-FT inducidas por la luz infrarroja. Los tejidos Phenion®-FT se trataron tópicamente con $2\text{mg}/\text{cm}^2$ de las formulaciones correspondientes y se irradiaron durante 45 minutos con luz infrarroja. Las tinciones de hematoxilina y eosina se realizaron a partir de los cortes histológicos de dichos tejidos. Escala $100\ \mu\text{m}$. C1: Formulación 1, C2: Formulación 2, C3: Formulación 3, C4: Formulación 4, C5: Formulación 5.

4.8.9 Protección de las formulaciones frente la modulación de los marcadores p21 y p53 inducida por la luz azul en Phenion®-FT

Como se observó en los experimentos de evaluación de los efectos del IR sobre los tejidos Phenion®-FT, la exposición a la luz IR durante 45 minutos indujo un aumento de p53 y una disminución de p21, sin embargo, las formulaciones no protegieron frente a la modulación de estos marcadores (datos no mostrados).

4.8.10 Resumen del panel de marcadores y la fotoprotección ejercida por las formulaciones evaluadas.

Los resultados mostrados previamente permitieron determinar que en Phenion®-FT es posible evaluar el siguiente panel de marcadores de fotoprotección frente a la luz UV y azul: Determinación de la citotoxicidad celular, determinación de la inflamación por medición de IL-1 α , IL-6 e IL-8, marcador de oxidación GPX1, marcadores dérmicos implicados en procesos de fotoenvejecimiento (ELN, COL1, MMP1, MMP9) y el

marcador de la integridad de la unión dermis-epidermis COL7A1. También, se puede evaluar las alteraciones en la arquitectura tisular y los marcadores implicados en la carcinogénesis p53 y p21. En el caso concreto de la luz infrarroja, los marcadores que permitieron discernir entre condiciones fueron la citotoxicidad, inflamación (IL-1 α , IL-6 e IL-8) y los marcadores dérmicos COL1, ELN y MMP1. En términos generales, la formulación 3 es la que ofreció mejor protección frente a los efectos biológicos producidos por la luz solar completa, UVA, luz azul e IR, seguida de la formulación 5.

5 DISCUSIÓN

En los últimos años se ha puesto todos los esfuerzos en el desarrollo de métodos alternativos a la experimentación animal para la evaluación de las formulaciones cosméticas. Sin embargo, no hay estandarizaciones referentes a los estudios de fotoprotección, por esta razón, la presente tesis doctoral pretende sentar las bases para la evaluación de un panel de marcadores biológicos en tejidos 3D de piel, para su uso en estudios de fotoprotección y eficacia de formulaciones de protectores solares, así como para el screening de nuevos compuestos protectores.

Para ello, el primer objetivo del estudio, fue caracterizar dos modelos de piel 3D artificial de complejidad distinta, el modelo de epidermis SkinEthic™ RHE y de epidermis+dermis Phenion® FT , con el método de irritación cutánea validado por la OECD [103] para poder determinar cuál de los dos reproduce mejor los efectos inducidos en la piel *in vivo*. Así pues, se observó que una menor complejidad tisular conllevaba una mayor susceptibilidad a los compuestos irritantes. Para disminuir la viabilidad celular por debajo del 20%, los tejidos 3D necesitaron dosis del compuesto irritante SDS 25 veces mayores que para el ensayo de irritación en queratinocitos en monocapa, lo que corrobora, al igual que en los resultados de la arquitectura tisular, la mejor resistencia de estos modelos a la hora de usarlos en experimentación cosmética. Además, los resultados de la comparación entre los dos modelos 3D permitieron concluir que, para producir el mismo efecto citotóxico, los tejidos Phenion®-FT debían exponerse a los compuestos irritantes por un mayor tiempo y la respuesta inflamatoria en el caso de Phenion-FT fue más compleja, probablemente debido a su componente dérmico y, en consecuencia, a la intercomunicación entre los queratinocitos y fibroblastos presentes. Phenion®-FT demostró la capacidad de producir las citoquinas IL-6 e IL-8, adicionalmente a la IL-1 α , también liberada por SkinEthic™. La IL-1 α ya estaba incluida en los protocolos de validación para equivalentes epidérmicos de la ECVAM [108] y su liberación por parte de los queratinocitos puede actuar como un inductor de IL-6 e IL-8 en fibroblastos dérmicos, siendo esta inducción de dos a tres órdenes de magnitud más que en comparación con los niveles producidos por los queratinocitos [109] . Los resultados obtenidos para IL-6 concuerdan con los resultados publicados por otros autores; la IL-6 es producida por fibroblastos en la dermis y se libera después de la estimulación de IL-1 α [110]. Varios estudios en

cultivos de piel 3D demostraron que la IL-6 se liberaba solo en presencia de fibroblastos en los modelos de piel de espesor completa [109, 111, 112]. En cuanto a IL-8, Bernhofer et al. observó que no había secreción de dicha citoquina en respuesta a la irritación en equivalentes epidérmicos y que los modelos de piel de espesor total secretaban entre 100-150 veces más IL-8 que los equivalentes de epidermis sola [111]. Por lo tanto, el modelo de piel 3D Phenion®-FT, exhibe características morfológicas y biológicas más similares a la piel *in vivo* y pueden proporcionar datos más precisos para la evaluación de cosméticos.

A continuación, se evaluaron los efectos de la luz solar completa en Phenion®-FT y SkinEthic™ y de la luz UVA sola, luz azul e infrarroja en los tejidos Phenion®-FT. En todos los casos, se realizó una evaluación previa en queratinocitos NHEK en monocapa, para poder determinar qué dosis serían idóneas en el caso de los modelos 3D. En el caso de la luz solar completa, la dosis más citotóxica fue la de 10 J/cm², aunque se consideró la dosis de trabajo la de 5 J/cm², ya que, sin perder gran parte de la viabilidad, había un aumento de la citoquina inflamatoria IL-8. No obstante, para aumentar la citotoxicidad de las NHEK con luz UVA sola, fueron necesarias dosis más altas de hasta 20 J/cm² y el estímulo inflamatorio solo se dio a la dosis de 5 J/cm². Así mismo, la luz azul requirió dosis mucho más altas para afectar a las NHEK, alcanzando hasta dosis de 150 J/cm² de LED. Se consideró que la liberación de IL-8 tras la exposición a la luz azul no era un marcador adecuado, ya que solo produjo una ligera disminución, pero sí se pudo determinar la disminución progresiva de MMP1. Por otra parte, la dosis de IR se midió en tiempos de exposición. 60 minutos de IR disminuyeron la viabilidad celular, así como los niveles de MMP1 y no se observaron variaciones de IL-8. Fue destacable, que las temperaturas registradas durante la irradiación IR en monocapa aumentaron hasta 48°C, aunque estas temperaturas se detectaron mientras el haz de radiación incidía directamente sobre la sonda de medición sumergida en el medio de cultivo, y, segundos tras apagarlo, la temperatura disminuía. Los estudios indican que fibroblastos humanos en monocapa expuestos a IRA inducen aumentos en la expresión de MMP1, independientemente del efecto térmico de la IR- [113, 114], y lo mismo ocurre en humanos, aunque se ha observado una variabilidad interindividual considerable, al igual que en los estudios en fibroblastos de piel

humana cultivados [115]. Sin embargo, en este estudio, la IR disminuyó la cantidad de MMP1 en queratinocitos, lo que explica, de acuerdo con los resultados de otros autores, que la producción de MMP1 en la piel se da gracias a los fibroblastos y no a los queratinocitos. De hecho, se ha demostrado que los queratinocitos no producen MMP1 frente a la luz UV [116]. Por otra parte, se ha demostrado el aumento de MMP1 en queratinocitos ante un estímulo de luz azul [90]. Estos resultados pusieron de manifiesto que la variabilidad de respuestas inducidas, concretamente con la luz azul e IR, hace que la monocapa no sea uno de los mejores sistemas de evaluación de los efectos de las radiaciones.

Así pues, se decidió a evaluar los efectos en modelos de piel 3D. La viabilidad y citotoxicidad se evaluaron por estar incluidos en los métodos de irritación cutánea validados por la OECD, mientras que las citoquinas IL1- α , IL-6 e IL-8 se midieron para determinar la respuesta inflamatoria de los modelos ante la irradiación. En general, la disminución de la viabilidad a medida que aumentaba la dosis indujo aumentos en la citotoxicidad tanto en Phenion[®]-FT como en SkinEthic[™] RHE irradiados con luz solar completa, lo que llevó al aumento de las 3 citoquinas en el caso de Phenion[®]-FT, en las dosis de irradiación intermedias 12 J/cm² y 20 J/cm². En SkinEthic[™] aumentó IL-1 α , mientras que IL-6, al igual que se observó en los experimentos de caracterización, no presentó modificaciones. Pero, a diferencia de los ensayos de irritación, sí que hubo un aumento de IL-8, lo que indica que, en el modelo de epidermis sola, la respuesta inducida está influida por el tipo de estímulo empleado. En línea con estos resultados, otros autores describieron la liberación de IL-8 tras el tratamiento de equivalentes epidérmicos (SkinEthic[™] y EpiDerm) con IL-1 α humana recombinante [110, 117]. Por esta razón y debido a la estructura tisular más similar a la piel humana de Phenion[®]-FT, se decidió evaluar solamente la luz solar completa en Skinethic y usar Phenion[®]-FT en el resto de luces del espectro. Cuando se evaluaron las luces UVA sola, luz azul e infrarroja, se observó el aumento de la toxicidad en los tejidos Phenion[®]-FT expuestos a estas luces, así como el aumento de las 3 citoquinas inflamatorias evaluadas. Aunque no hay estudios que describan la liberación de citoquinas en Phenion[®]-FT tras la irradiación solar, luz azul o infrarroja, otros autores han evaluado estos marcadores en tejidos de piel 3D reconstruidos no comerciales. La exposición a los rayos UVA de la

piel reconstruida conduce a la regulación positiva de IL-1, IL-6 e IL-8 [71], entre ellos, en un modelo de piel reconstruida con células de origen chino, liberó IL-6 e IL-8 [118] y en otro estudio, tras la exposición a los rayos UVB en una piel humana reconstruida, se liberaron las citoquinas IL-1 e IL-6 [84]. Además, se conoce que la IL-8 aumenta en la piel humana después de la exposición a la radiación UV [119]. Los resultados de inflamación frente a la luz azul generan cierta controversia; un estudio determinó que la exposición a la luz azul no aumentó los niveles de IL-1 α en el antebrazo de voluntarios sanos [120], sin embargo, en queratinocitos NHEK, la luz azul indujo el aumento de IL-1 α , IL-6 e IL-8 [16]. En referencia a la luz infrarroja, solo un estudio determinó la liberación de IL-6 en el modelo de piel 3D comercial Epiderm-FT [121].

A continuación, se evaluaron una serie de marcadores epidérmicos y dérmicos para determinar su posible relación en el fotoenvejecimiento inducido por las distintas luces. Así pues, se midieron los niveles génicos de los marcadores dérmicos decorina (DCN), elastina (ELN) y colágeno tipo 1 (COL1A1) y de las metaloproteinasas 1 y 9 (MMP1, MMP9), así como el marcador de diferenciación epidérmica involucrina (IVL) y el marcador de la integridad de la unión dermis-epidermis colágeno tipo 7 (COL7A1). Los resultados de la luz solar completa mostraron que, dependiendo de la dosis, los marcadores podrían aumentar o disminuir su expresión, generalmente, las dosis bajas inducían un aumento de la expresión, mientras que, a las dosis más altas, y por tanto más citotóxicas los marcadores disminuían. La ELN fue el único marcador que disminuyó en todas las dosis. Este perfil de expresión corresponde a una respuesta de defensa, frente a dosis bajas hay un mecanismo de aumento de expresión para contrarrestar los efectos de la radiación, mientras que a dosis altas hay un descenso de expresión debido al daño tisular. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Meloni et al en tejidos Phenion[®]-FT irradiados con UVA a tiempos distintos a los de este estudio [89]. En la presente tesis, al irradiar con luz UVA sola, los genes que siguieron dicho patrón fueron solamente DCN y ELN, mientras que MMP1 y COL7A1 aumentaron y MMP9 disminuyó. Las diferencias observadas entre ambas luces podrían deberse a sus distintas propiedades energéticas así como las diferentes curvas de radiación. Mientras que para algunos de los biomarcadores evaluados no hay bibliografía, algunas de las respuestas vistas en este trabajo concuerdan con los

resultados de otros estudios tanto *in vivo* como *in vitro*. Así pues, se ha visto que la exposición a UVA de la piel reconstruida induce la producción de MMP1, principalmente por parte de los fibroblastos dérmicos [122, 123]. En piel humana *in vivo*, la UVB provocó el aumento de MMP1 [124] y de MMP9 [125], lo que se ha visto también en modelos reconstruidos como Epiderm-FT, en el que aumentaron la expresión de MMP1 y MMP9 [126]. Esta modulación en la expresión de metaloproteinasas llevan a la degradación de las fibras de colágeno y elastina [25], como parte del proceso de fotoenvejecimiento. En el caso de la IVL, debido a su baja y temprana expresión [89], se descartó del panel de marcadores. Cabe destacar, además, que no hay estudios que evalúen dichos marcadores en modelos de piel 3D expuestos a luz azul. Nuestros resultados en luz azul mostraron que los marcadores DCN, MMP1 y COL7A1 se modularon positiva o negativamente dependiendo de la dosis empleada, mientras que ELN y COL1A1 aumentaron con la dosis y MMP9 disminuyó. En el caso de la luz IR, la exposición en los tejidos Phenion®-FT produjo el aumento de MMP1 y la consecuente disminución de COL1A1 y ELN, mientras que MMP9, al igual que en el resto de luces evaluadas, disminuyó. Estos resultados están en línea con los estudios de piel *in vivo*, en los que la exposición a luz IR en la piel de voluntarios sanos, genera un claro aumento en la expresión génica y proteica de MMP1, que da lugar a la disminución del colágeno tipo 1 [113, 127, 128]. No obstante, a diferencia del modelo Phenion®-FT, los estudios *in vivo* describen el aumento de MMP9 inducido por la luz IR [129, 130]. Estos resultados demuestran que los modelos de piel artificial fueron capaces de mimetizar las respuestas biológicas esperadas en la piel *in vivo*, en cuanto a los marcadores relacionados con la integridad de la dermis y el fotoenvejecimiento.

A continuación, se evaluaron el estrés oxidativo y los dímeros de timina inducidos ante la exposición a las distintas luces, se pudo confirmar que todas las luces inducían un aumento del estrés oxidativo, medido por el aumento del marcador antioxidante GPX1 en los tejidos de piel 3D, lo que confirma que en dichos tejidos también se puede evaluar el efecto oxidante inducido por las luces y descrito por otros autores. El aumento de las especies reactivas de oxígeno (ERO) se ha descrito tras la irradiación UVR *in vivo* [131] y tras la exposición tanto de luz azul como de IR en fibroblastos de

piel *in vitro* [90, 130, 132]. Los dímeros de timina se evaluaron en la luz solar completa y UVA, ya que se ha demostrado que la luz azul no induce la generación de dímeros. De hecho, las fotoliasas, que son las enzimas reparadoras del ADN, activan el mecanismo de reparación de dímeros tras la exposición a la luz azul [133, 134]. No obstante, sí que se confirmó la aparición de dímeros tras la irradiación con luz solar completa y UVA en queratinocitos en monocapa NHEK y en Phenion®-FT, evaluados en el último caso mediante inmunohistoquímica. No obstante, no se consideró este procedimiento experimental como parte del panel de marcadores para experimentos de fotoprotección, por la facilidad de uniones inespecíficas del anticuerpo de dímeros de timina, y la consecuente complicación a la hora de cuantificar las diferencias entre condiciones.

Otro método para evaluar los daños en el tejido 3D es el análisis de las modificaciones en la arquitectura tisular. La luz solar completa y UVA dieron lugar a la aparición de las denominadas “sunburn cells” y muerte de los queratinocitos epidérmicos, así como la pérdida de la adhesión celular en los estratos granuloso y espinoso y la vacuolización perinuclear de los queratinocitos. En el caso de la UVA, se observó una mayor pérdida de los fibroblastos, posiblemente por su mayor penetración hasta las capas más profundas de la dermis. Para ver estos efectos con la luz azul, las dosis tuvieron que aumentarse considerablemente y se observó que, a las más altas, la luz azul sí que indujo la pérdida de fibroblastos dérmicos y la vacuolización del citoplasma celular en la epidermis. Incluso en la dosis más alta de 100 J/cm^2 , se produjo la muerte de los queratinocitos epidérmicos, y su acumulación en la capa basal con núcleos picnóticos. Sin embargo, al irradiar con luz IR, no se dañó de manera visible la estructura de la dermis o la epidermis y tan solo se observó la vacuolización. En otros modelos 3D no comerciales también se han observado los daños típicos inducidos por la radiación en la piel humana. En tejidos de piel no comerciales, se observó que la radiación UVB produjo “sunburn cells” y muerte de los queratinocitos [135, 136], así como la desaparición de los fibroblastos dérmicos tras la exposición a la UVA [137]. La información referente a la luz azul es más diversa, puesto que algunos autores indican que no induce daño cutáneo, aunque sí que han observado la vacuolización en los

tejidos de piel reconstruida tras la irradiación con esta luz [46, 138]. Estas diferencias se deben a que generalmente, en los estudios que reportan la inocuidad de la exposición a luz azul, es debido a que emplean las dosis terapéuticas utilizadas para los tratamientos dermatológicos, que son dosis muy bajas en tiempos de exposición cortos, a diferencia de las dosis empleadas en este trabajo. Por último, los efectos observados en Phenion®-FT al irradiar con luz IR están apoyados por los obtenidos en otros modelos 3D, en los que tampoco se observan grandes impactos en la morfología tisular, la única alteración observada, la vacuolización, podría deberse a los efectos térmicos de la IR sobre la piel [118].

Seguidamente, se evaluaron los marcadores p53 y p21 como parte de los eventos moleculares implicados en el desarrollo de la carcinogénesis. La irradiación con luz solar completa y con UVA indujo la modulación de la expresión de p53 en forma de campana, disminuyendo la expresión a las dosis más altas, además de la disminución de p21 en ambas luces. No es la primera vez que se describe este patrón de expresión de p53 en modelos de piel 3D, otro estudio en modelos no comerciales reportó una curva de expresión de p53 en forma de campana tras la exposición a la luz UV [140]. Además, los resultados en monocapa también son variables: Se ha visto que en queratinocitos primarios la exposición a UV aumenta p53 [141] y en queratinocitos de línea (HaCaT) irradiados con UVB los niveles de p53 permanecieron inalterados mientras que p21 disminuyó de forma sostenida [142]. En contraposición, otro estudio en HaCat con UVB describió la regulación negativa de p21 y de p53 [122]. Por lo que respecta a la luz azul, la irradiación de los tejidos 3D con LED aumentó la expresión de p53 y de p21, excepto a la dosis más alta en la que p21 descendió, mientras que frente a la radiación IR aumentó p53 y disminuyó p21. No obstante, la influencia de la luz azul e infrarroja en la carcinogénesis no se ha estudiado en profundidad. En biopsias de piel humana, se observó una disminución temporal en la expresión de p53 24h tras la exposición a luz azul [46]. Estos resultados sugieren que las funciones que ejerce p53 como “guardián del tejido” en la piel humana y el control de las rutas de apoptosis por p21 se puede trasladar a los tejidos Phenion®-FT para emplear en estudios de fotoprotección, siempre teniendo en cuenta que la respuesta en la expresión de estas proteínas está influida tanto por la dosis elegida como del tiempo posirradiación

analizado, y, por tanto, sus modulaciones pueden variar entre las distintas condiciones experimentales. En general, el aumento de p53 y la regulación a la baja de p21 implica que ante un daño irreparable se activa el mecanismo de inducción de apoptosis.

Con la finalidad de determinar los marcadores más representativos de las distintas luces del espectro, se realizó un estudio de correlaciones con los datos obtenidos de las curvas de radiación en Phenion®-FT. La mayoría de los marcadores presentaron coeficientes de Pearson altos tanto positivos como negativos por encima de 0,7. Sin embargo, algunos de ellos no alcanzaron significancia estadística. Esto no significa que no exista una correlación sólida, sino que, para confirmar la solidez de los coeficientes con alta correlación, pero que no son significativos, serían necesarios realizar más experimentos con un mayor número de muestras. Aun así, se pudo determinar que algunos de los marcadores incluidos en este estudio, demostraron coeficientes muy altos de correlación con significancia estadística. Entre ellos se encuentran la viabilidad, citotoxicidad, IL-1 α y p21 para la luz solar completa; p53 y GPX1 en UVA; la viabilidad, MMP9, COL1 y p53 en la luz azul y citotoxicidad y IL-1 α para la luz infrarroja. Estos resultados podrían sentar las bases para el desarrollo de futuros protocolos de fotoprotección con los tejidos Phenion®-FT.

En conjunto, los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral permiten afirmar que los tejidos Phenion®-FT son una buena herramienta para evaluar los distintos efectos producidos por las luces del espectro solar. Además, estos modelos 3D han permitido confirmar que, las luces menos estudiadas del espectro, la luz azul e infrarroja, son también dañinas para la piel a dosis altas. Estos resultados son de vital importancia, ya que la exposición continuada a las fuentes de luz LED de los dispositivos electrónicos, así como al efecto térmico causado por el IR, podría causar más daños en la piel de los que se creía hasta el momento.

Una vez se confirmó el potencial de los tejidos Phenion®-FT para ejercer una respuesta biológica frente a las luces del espectro, se procedió a determinar el uso de estos tejidos en ensayos de fotoprotección para evaluar tanto el compuesto natural antioxidante obacunona, como protectores solares formuladas por RNB.

Las dosis elegidas en todos los casos fueron dosis por encima de las mínimas biológicas, para asegurar la respuesta molecular de todos los marcadores evaluados. En el caso de la luz solar completa y UVA, es complicado extrapolar a qué dosis reales equivalen las empleadas en estos experimentos, ya que la dosis de UV está muy influida tanto por la fuente de irradiación como por la latitud, estación, hora del día, ángulo de elevación solar, tiempo atmosférico, espesor de la capa de ozono y contaminantes [123]. Por ejemplo, según Marionnet et al., una dosis de luz solar completa de 60 J/cm^2 correspondería aproximadamente al total de la dosis diaria de UV recibida en París a mediados de abril [79], mientras que según Rysavá et al., una dosis de 10 J/cm^2 de UVA es el equivalente a una exposición de aproximadamente 1h de luz solar en Mayo en latitud (49°N) [145]. En el caso de la luz azul, según las mediciones tomadas por Rascalou et al., la dosis de 90 J/cm^2 empleada en este trabajo sería equivalente a una exposición a dispositivos digitales de 1700 h aproximadamente, es decir, una exposición crónica con una media de 6h diarias durante 283 días [43].

Así pues, se determinó la capacidad fotoquimioprotectora de la obacunona. La obacunona previno ligeramente frente al aumento de citotoxicidad inducido por la luz solar completa tanto en queratinocitos NHEK como en los tejidos Phenion[®]-FT y, aunque apenas mostró un efecto antiinflamatorio, sí que previno la sobreexpresión del marcador dérmico MMP1 en ambos modelos, y de COL7A1 y ELN en Phenion[®]-FT. Además, demostró su efecto antioxidante mediante la disminución de ERO y aumento de expresión de genes de la respuesta antioxidante en los queratinocitos primarios, y previno frente al aumento de GPX1 en Phenion[®]-FT. Por último, la obacunona demostró proteger frente a la apoptosis mediada por caspasas. Por lo tanto, este es el primer estudio en el que se demuestra que la obacunona ejerce una importante actividad protectora frente a la luz solar en queratinocitos y modelos 3D de piel. Su efecto protector frente a la luz UV solo se había estudiado hasta el momento en células epiteliales de retina [77]. Como se ha demostrado que la activación de la señalización de Nrf2 puede proteger a las células y en la piel de ratones frente a la radiación [70, 71, 146], en la presente tesis doctoral, se comprobó que, al igual que en

las células de retina [77], en los queratinocitos epidérmicos, el efecto antioxidante de la obacunona también está mediado a través de la cascada de señalización de Nrf2.

Como se pudo confirmar la fotoquimioprotección de la obacunona en los tejidos Phenion®-FT, el siguiente paso fue la evaluación de la fotoprotección de productos cosméticos de aplicación tópica, mimetizando las condiciones reales de aplicación *in vivo* en los tejidos de piel 3D. Así pues, los marcadores expuestos en el presente trabajo permitieron evaluar las diferencias entre los tejidos Phenion®-FT irradiados y los tejidos protegidos con las distintas formulaciones de RNB, en cada una de las luces del espectro.

Todas las formulaciones empleadas coinciden en composición con los siguientes filtros: El metoxidibenzoilmetano de butilo (avobenzona), el octocrileno y el activo biológico carnosina. La avobenzona proporciona una gran absorción y es el único filtro UVA con un nivel de rendimiento muy alto y aprobado en todo el mundo. El inconveniente de su fotoinestabilidad, en este caso, se solventa mediante la combinación con el octocrileno, un filtro que absorbe UVB y a su vez proporciona estabilidad a la avobenzona [98, 147]. La carnosina, es un dipéptido que brinda protección contra la radiación UVB, en queratinocitos *in vitro* [148, 149], además de reducir la inmunosupresión sistémica inducida por UV en ratones. Aunque no se conoce con claridad como media sus efectos fotoprotectores, se ha observado que ejerce una acción antioxidante [150].

En cuanto a la protección que ejercieron las formulaciones frente a la radiación solar completa, posiblemente la que menor protección ofreció frente a los marcadores evaluados fue la formulación C1. Esta formulación incluye, además de los filtros mencionados anteriormente, el filtro UVB y UVA de corto alcance ácido fenilbenzimidazol sulfónico y los activos biológicos alantoína, pantenol, aloe vera y vitamina C. La alantoína es un humectante que ha demostrado participar en la cicatrización y promueve la proliferación celular y la longevidad [151]. En combinación con otros compuestos, ha demostrado tener efectos anti eritematosos/antiinflamatorios en modelos animales [152]. El pantenol, una provitamina B5, ejerce un efecto fotoprotector contra la radiación UVA y UVB en los queratinocitos y fibroblastos [153, 154]. Por otra parte, el Aloe Vera reduce el

fotodaño tanto *in vitro* como *in vivo*, aunque no tiene propiedades antioxidantes. La fotoprotección del Aloe Vera se ha asociado a su capacidad de mantener la integridad de las membranas celulares [155]. Por último, la vitamina C es un antioxidante natural que previene el daño inducido por los rayos UVB, tanto en modelos animales como en células humanas [149], incluso se ha testado su eficacia antioxidante frente a la luz infrarroja [156]. La combinación de estos filtros en la formulación C1 fue la que peor rendimiento de protección ejerció, coincidiendo con uno de los SPF más bajos (SPF 20). Este bajo perfil de protección podría atribuirse también a la ausencia del filtro etilhexil triazona, que sí que está presente en el resto de las formulaciones. Dicho filtro, muestra un amplio perfil de absorción en toda la región UV-B [157].

En segundo lugar, las formulaciones C2 y C5 ofrecieron una protección similar frente a la luz solar completa, y mejor que la C1. La formulación 2 incluye 3 ingredientes diferenciadores con el resto: los filtros polisilicona-15 y el tetrasulfonato de fenil dibenzimidazol disódico y el potenciador trimetoxidibencilideno pentanodiona. La polisilicona-15 es una molécula de peso molecular grande, que no penetra en la superficie de la piel. Aunque tiene propiedades de absorción UV muy bajas, en combinación con otros productos, en este caso avobenzona, da como resultado un protector solar fotoestable de amplio espectro. Este filtro funciona especialmente bien con el ácido fenilbenzimidazol sulfónico, también presente en la formulación 2, razón por la cual alcanza un SPF de 50+ [158]. Además, el tetrasulfonato de fenil dibenzimidazol disódico, ofrece protección frente a los rayos UVA2 y es soluble en agua, por lo que fomenta que el fotoprotector sea menos graso [159]. Por último, la formulación C2 también incluye el potenciador trimetoxidibencilideno pentanodiona, que es muy eficaz estabilizando la avobenzona y aumenta el SPF *in vivo* en más de un 50 % tanto en filtros orgánicos como inorgánicos [160]. La formulación C5 presentó una protección *in vitro* similar, aunque la composición difiere ligeramente de la C2. En este caso, la formulación C5 incluye menos filtros UV, sin potenciador, y lleva los mismos activos biológicos que la C2, con la adición de la alantoína, lo que le confiere un SPF de 30.

La siguiente formulación más eficaz fue la C4, cuya composición es la que menos activos biológicos incluye, solo la carnosina, mientras que en su composición de filtros

UV es la única que contiene el filtro bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina, un agente de protección solar orgánico de amplio espectro que, a diferencia de los filtros UV más antiguos, es muy fotoestable. Además, es útil para estabilizar otros agentes como la avobenzona. [161].

Por último, la formulación C3 fue la que mejor perfil de protección *in vitro* ofreció para los biomarcadores evaluados. Dicha formulación, junto con la C1 es la que lleva una combinación más simple de filtros (solo 3), aunque incluye todos los activos biológicos mencionados anteriormente. Además, incluye un activo biológico que diferencia a la formulación C3 del resto, el extracto de células madre vegetales. A diferencia de los extractos derivados de plantas, los extractos obtenidos de cultivos de células vegetales pueden ser fácilmente estandarizados ya que están libres de patógenos, agroquímicos, sustancias tóxicas, alérgenos y contaminantes, ya que se producen en condiciones controladas, cumpliendo con los procedimientos de buenas prácticas de fabricación [162]. La combinación de este extracto, junto con otros compuestos naturales y filtros orgánicos, es lo que ha permitido que la formulación C3 brinde una considerable capacidad protectora, pese a tener un SPF de 20. Adicionalmente, otro de los factores que podría estar influyendo en la capacidad protectora es la composición galénica. Generalmente, los protectores solares están disponibles en forma de cremas, lociones, geles, ungüentos, pastas, aceites, mantecas, barras y aerosoles. [163]. La formulación C3 se presenta bajo la forma farmacéutica de crema. Las cremas, tienen mayor afinidad por el manto hidrolipídico de la piel y capacidad oclusiva. Debido a la baja solubilidad en el agua y su afinidad por la barrera cutánea, tienden a permanecer más tiempo en la piel y por tanto a ser más resistentes al agua. Todo ello en conjunto, podría ser otro de los factores que contribuye al buen rendimiento protector de la formulación C3.

Cabe destacar que, aunque se comparen las composiciones de las distintas formulaciones en función de los filtros individuales que incluyan, no se puede atribuir el efecto protector de la formulación cosmética a un componente concreto, ya que la efectividad dependerá de la combinación de los distintos filtros/activos y su capacidad de potenciarse para dar lugar a un producto fotoestable y efectivo.

A rasgos generales, se observó que un mayor SPF no se traduce en una mayor protección a nivel biológico, ya que la formulación C3, con un SPF de 20, ejerció mayor protección en comparación con el resto de las formulaciones con un perfil de SPF mayor. Por ejemplo, la formulación C2 tiene un factor 50 y sin embargo no es de las que mejores resultados *in vitro* ha proporcionado. Además, tanto la formulación C2 como la C5 protegieron de manera similar teniendo un SPF de 30 y 50 respectivamente. De todas las formulaciones analizadas, la única cuyos resultados moleculares y SPF coinciden en mayor grado es la formulación C4 con un SPF de 50. Estos resultados indican que la inclusión de activos biológicos fotoprotectores y antioxidantes aumenta los niveles de protección frente a la luz solar completa, incluso cuando el SPF es bajo. Estos resultados, de acuerdo con los obtenidos por otros autores, confirman que el SPF no refleja la fotoprotección de amplio espectro, ya que no tiene en cuenta la importancia del impacto de cada una de las luces y que, al realizarse en base a la respuesta eritematosa, no predice adecuadamente el nivel de protección frente a otros daños biológicos [52, 92, 123]. Por tanto, es destacable la necesidad de métodos validados para evaluar protección de las formulaciones cosméticas a nivel biológico, y el panel de marcadores propuesto en este trabajo podría sentar las bases de futuros protocolos de fotoprotección *in vitro* en la industria cosmética.

Cuando se evaluaron los fotoprotectores frente a la luz UVA sola, se observó que la formulación que mejor protegió fue también la C3, y la C5, aunque en este caso protegieron en menor medida que frente a la luz solar completa. Esto puede deberse a que la luz UVA es menos energética que la UVB, y, por tanto, las dosis empleadas para obtener respuestas biológicas que permitan ver diferencias entre los distintos grupos son mayores que en el caso de la luz solar completa (25 J/cm² vs 45 J/cm²). Por otra parte, aunque los productos no están formulados para proteger frente al espectro visible, algunas de las formulaciones consiguieron proteger frente a los efectos de la luz azul, destacando la formulación C3 y la C2. El buen rendimiento protector frente a todas las luces del espectro de la formulación C3 podría estar relacionado con su composición más amplia de activos biológicos que ejercen acción antioxidante. Por último, posiblemente la luz frente a la cual las formulaciones ejercieron menor

protección fue la luz IR. Esto indica que, de acuerdo con los resultados de otros autores [164, 165], parte de las respuestas biológicas de esta luz pueden estar mediadas por el incremento de la temperatura inducido, ya que las formulaciones no previenen frente a los efectos térmicos. Aun así, los resultados de la evaluación la capacidad fotoprotectora de las formulaciones frente a la luz azul e IR, permitieron confirmar, al igual que en la luz solar completa y UVA, la hipótesis de que una combinación óptima entre filtros solares y activos biológicos es lo que confiere mejor rendimiento de protección, pese a que los valores de SPF no sean los más altos.

6 CONCLUSIONES

- Los modelos de piel 3D son una herramienta útil para la evaluación de los efectos de las distintas luces del espectro sobre la piel humana. Aunque los modelos de epidermis sola SkinEthik™ inducen respuestas biológicas frente a la luz UV, concretamente, los tejidos de piel completa Phenion®-FT son más apropiados por su estructura más similar a la piel *in vivo* y, en consecuencia, una respuesta biológica más compleja.
- Pese al uso de la luz azul e infrarroja en tratamientos dermatológicos, las exposiciones a altas dosis y crónicas sí que suponen un impacto perjudicial sobre la piel, participando en procesos moleculares que dan lugar al desarrollo de fotoenvejecimiento, estrés oxidativo, inflamación y carcinogénesis.
- Los biomarcadores de daño por irradiación empleados en el siguiente trabajo presentan coeficientes de correlación altos, y, por tanto, podrían emplearse para sentar las bases de la validación de protocolos de fotoprotección en modelos de piel 3D.
- Los tejidos de piel 3D Phenion®-FT demuestran tener potencial para su uso en la evaluación de la fotoquimioprotección de compuestos naturales antioxidantes, así como la fotoprotección de formulaciones cosméticas de aplicación tópica.
- La obacunona protege a los queratinocitos y los tejidos Phenion®-FT frente al daño oxidativo inducido por la luz solar completa a través de la activación de la cascada de señalización de Nrf2.
- El SPF de las formulaciones no refleja de manera rigurosa la capacidad de fotoprotección, ya que no tiene en cuenta el impacto de las radiaciones a nivel biológico.
- El rendimiento de las formulaciones fotoprotectoras depende de la combinación de filtros solares que actúen de manera sinérgica potenciando sus

efectos, así como de la adición de activos biológicos. El uso de compuestos naturales antioxidantes, como los extractos de células madre vegetales, brinda una mayor protección a nivel biológico, frente a los daños inducidos por la luz solar.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Roger M, Fullard N, Costello L, Bradbury S, Markiewicz E, O'Reilly S, Darling N, Ritchie P, Määttä A, Karakesisoglou I, Nelson G, von Zglinicki T, Dicolandrea T, Isfort R, Bascom C, Przyborski S. Bioengineering the microanatomy of human skin. *J Anat* 2019; 234: 438–455.
2. Yousef H, Alhadj M, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. *StatPearls* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
3. Eisman AB, Blanca JM, Martínez FMC. Anatomía y fisiología de la piel. *Manual de dermatología, Vol. 1, 2018, ISBN 978-84-7885-637-4, págs. 2-27* Grupo Aula Médica S.L.; 2018. p. 2–27.
4. Comprendiendo la piel [Internet]. [cited 2022 Jan 5]. Available from: <https://www.eucerin.com.mx/acerca-de-la-piel/conocimientos-basicos-sobre-la-piel/estructura-y-funcion-de-la-piel>.
5. Agarwal S, Krishnamurthy K. Histology, Skin. *StatPearls* [Internet] Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [cited 2022 Jan 5]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537325/>.
6. Menon GK, Cleary GW, Lane ME. The structure and function of the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics* 2012; 435: 3–9.
7. Ramadon D, McCrudden MTC, Courtenay AJ, Donnelly RF. Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications. *Drug Deliv. and Transl. Res.* 2021; .
8. Fore J. A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. *Ostomy Wound Manage* 2006; 52: 24–35; quiz 36–37.
9. Sok J, Pineau N, Dalko-Csiba M, Breton L, Bernerd F. Improvement of the dermal epidermal junction in human reconstructed skin by a new c-xylopyranoside derivative. *Eur J Dermatol* 2008; 18: 297–302.
10. Kilbad. hematoxylin and eosin stained slide at 10x of normal epidermis and dermis with a benign intradermal nevus. [Internet]. 2008 [cited 2022 Feb 21]. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Normal_Epidermis_and_Dermis_with_Intradermal_Nevus_10x.JPG#filehistory.

11. Nomura Y. Structural change in decorin with skin aging. *Connect Tissue Res* 2006; 47: 249–255.
12. Friedman BJ, Lim HW, Wang SQ. Photoprotection and Photoaging. In: Wang SQ, Lim HW, editors. *Principles and Practice of Photoprotection* Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 61–74.
13. Lawrence K, Al-Jamal M, Kohli I, Hamzavi I. Clinical and Biological Relevance of Visible and Infrared Radiation. In: Wang SQ, Lim HW, editors. *Principles and Practice of Photoprotection* Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 3–22.
14. Marionnet C, Pierrard C, Golebiewski C, Bernerd F. Diversity of biological effects induced by longwave UVA rays (UVA1) in reconstructed skin. *PLoS ONE* 2014; 9: e105263.
15. Marionnet C, Tricaud C, Bernerd F. Exposure to non-extreme solar UV daylight: spectral characterization, effects on skin and photoprotection. *Int J Mol Sci* 2014; 16: 68–90.
16. Dong K, Goyarts EC, Pelle E, Trivero J, Pernodet N. Blue light disrupts the circadian rhythm and create damage in skin cells. *International Journal of Cosmetic Science* 2019; 41: 558–562.
17. Cho S, Shin MH, Kim YK, Seo J-E, Lee YM, Park C-H, Chung JH. Effects of Infrared Radiation and Heat on Human Skin Aging in vivo. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 2009; 14: 15–19.
18. Chen J, Liu Y, Zhao Z, Qiu J. Oxidative stress in the skin: Impact and related protection. *Int J Cosmet Sci* 2021; 43: 495–509.
19. Addor FAS. Antioxidants in dermatology. *An Bras Dermatol* 2017; 92: 356–362.
20. Naidoo K, Birch-Machin MA. Oxidative Stress and Ageing: The Influence of Environmental Pollution, Sunlight and Diet on Skin. *Cosmetics* Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2017; 4: 4.
21. Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A, Richter K. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules* 2015; 5: 545–589.

22. Xian D, Xiong X, Xu J, Xian L, Lei Q, Song J, Zhong J. Nrf2 Overexpression for the Protective Effect of Skin-Derived Precursors against UV-Induced Damage: Evidence from a Three-Dimensional Skin Model. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019: 7021428.
23. Wondrak GT, Cabello CM, Villeneuve NF, Zhang S, Ley S, Li Y, Sun Z, Zhang DD. Cinnamoyl-based Nrf2-activators targeting human skin cell photo-oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 385–395.
24. Nisakorn Saewan and Ampa Jimtaisong. Photoprotection of natural flavonoids. *JAPS*.
25. Dunaway S, Odin R, Zhou L, Ji L, Zhang Y, Kadekaro AL. Natural Antioxidants: Multiple Mechanisms to Protect Skin From Solar Radiation. *Frontiers in Pharmacology* 2018; 9.
26. Perkins MA, Osterhues MA, Farage MA, Robinson MK. A noninvasive method to assess skin irritation and compromised skin conditions using simple tape adsorption of molecular markers of inflammation. *Skin Res Technol* 2001; 7: 227–237.
27. Gröne A. Keratinocytes and cytokines. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 88: 1–12.
28. Nickoloff BJ, Naidu Y. Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30: 535–546.
29. Grandi V, Fava P, Rupoli S, Alberti Violetti S, Canafoglia L, Quaglino P, Berti E, Pimpinelli N, Cutaneous Lymphoma Task Force (Commissione Linfomi Cutanei) of Lymphoma Italian Foundation (Fondazione Italiana Linfomi, FIL). Standardization of regimens in Narrowband UVB and PUVA in early stage mycosis fungoides: position paper from the Italian Task Force for Cutaneous Lymphomas. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2018; 32: 683–691.
30. Han A, Chien AL, Kang S. Photoaging. *Dermatologic Clinics* 2014; 32: 291–299.
31. Laga AC, Murphy GF. The Translational Basis of Human Cutaneous Photoaging: On Models, Methods, and Meaning. *The American Journal of Pathology* 2009; 174: 357–360.
32. Thompson KG, Kim N. Distinguishing Myth from Fact: Photocarcinogenesis and Phototherapy. *Dermatol Clin* 2020; 38: 25–35.
33. De Silva WGM, Abboud M, Yang C, Dixon KM, Rybchyn MS, Mason RS. Protection from Ultraviolet Damage and Photocarcinogenesis by Vitamin D Compounds. *Adv Exp Med Biol* 2020; 1268: 227–253.

34. Martens MC, Seebode C, Lehmann J, Emmert S. Photocarcinogenesis and Skin Cancer Prevention Strategies: An Update. *Anticancer Res* 2018; 38: 1153–1158.
35. Ngoc LTN, Tran VV, Moon J-Y, Chae M, Park D, Lee Y-C. Recent Trends of Sunscreen Cosmetic: An Update Review. *Cosmetics* Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2019; 6: 64.
36. Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 195: 298–308.
37. Sorbellini E, Rucco M, Rinaldi F. Photodynamic and photobiological effects of light-emitting diode (LED) therapy in dermatological disease: an update. *Lasers Med Sci* 2018; 33: 1431–1439.
38. Russell BA, Kellett N, Reilly LR. A study to determine the efficacy of combination LED light therapy (633 nm and 830 nm) in facial skin rejuvenation. *J Cosmet Laser Ther* 2005; 7: 196–200.
39. Ash C, Harrison A, Drew S, Whittall R. A randomized controlled study for the treatment of acne vulgaris using high-intensity 414 nm solid state diode arrays. *J Cosmet Laser Ther* 2015; 17: 170–176.
40. Griffiths CEM, van de Kerkhof P, Czarnecka-Operacz M. Psoriasis and Atopic Dermatitis. *Dermatol Ther (Heidelb)* 2017; 7: 31–41.
41. Bryld LE, Jemec GBE. Photodynamic therapy in a series of rosacea patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007; 21: 1199–1202.
42. Opländer C, Hidding S, Werners FB, Born M, Pallua N, Suschek CV. Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2011; 103: 118–125.
43. Rascalou A, Lamartine J, Poydenot P, Demarne F, Bechetoille N. Mitochondrial damage and cytoskeleton reorganization in human dermal fibroblasts exposed to artificial visible light similar to screen-emitted light. *Journal of Dermatological Science* 2018; 91: 195–205.
44. Lorrio S, Rodríguez-Luna A, Delgado-Wicke P, Mascaraque M, Gallego M, Pérez-Davó A, González S, Juarranz Á. Protective Effect of the Aqueous Extract of *Deschampsia antarctica* (EDAFENCE®) on Skin Cells against Blue Light Emitted from Digital Devices. *Int J Mol Sci*

- [Internet] 2020 [cited 2020 May 20]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7038134/>.
45. Nakashima Y, Ohta S, Wolf AM. Blue light-induced oxidative stress in live skin. *Free Radical Biology and Medicine* 2017; 108: 300–310.
 46. Kleinpenning MM, Smits T, Frunt MHA, Erp PEJV, Kerkhof PCMVD, Gerritsen RMJP. Clinical and histological effects of blue light on normal skin. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 2010; 26: 16–21.
 47. recomendacion_pSolares_sept06.pdf [Internet]. [cited 2022 Jan 25]. Available from: https://www.aemps.gob.es/cosmeticosHigiene/cosmeticos/docs/recomendacion_pSolares_sept06.pdf.
 48. Wondrak GT. Sunscreen-Based Skin Protection Against Solar Insult: Molecular Mechanisms and Opportunities. In: Alberts D, Hess LM, editors. *Fundamentals of Cancer Prevention* Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. p. 301–320.
 49. European Commission. M/389 STANDARDISATION MANDATE ASSIGNED TO CEN CONCERNING METHODS FOR TESTING EFFICACY OF SUNSCREEN PRODUCTS [Internet]. METHODS FOR TESTING EFFICACY OF SUNSCREEN PRODUCTS [cited 2022 Jan 24]. Available from: <https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/mandates/index.cfm?fuseaction=search.detail&id=346>.
 50. Skotarczak K, Osmola-Mańkowska A, Lodyga M, Polańska A, Mazur M, Adamski Z. Photoprotection: facts and controversies. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015; 19: 98–112.
 51. Daly S, Ouyang H, Maitra P. Chemistry of Sunscreens. In: Wang SQ, Lim HW, editors. *Principles and Practice of Photoprotection* Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 159–178.
 52. Lejeune F, Christiaens F, Bernerd F. Evaluation of sunscreen products using a reconstructed skin model exposed to simulated daily ultraviolet radiation: relevance of filtration profile and SPF value for daily photoprotection. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2008; 24: 249–255.
 53. contents_guideline3.pdf [Internet]. [cited 2022 Jan 25]. Available from: http://www.jcss.jp/en/journal/pdf/contents_guideline3.pdf.

54. Karen Duis, Thomas Junker, Anja Coors. Review of the environmental fate and effects of two UV filter substances used in cosmetic products. *Science of the Total Environment* 2022; 808.
55. Savić S, Paunović J. Safety of cosmetic products in the light of European legislation: Cosmetic Regulation (EC) No 1223/2009. *Arhiv za farmaciju Savez farmaceutskih udruženja Srbije*, Beograd; 2018; 68: 911–933.
56. Cosmetic ingredient database (Cosing) - List of UV filters allowed in cosmetic products - Data Europa EU [Internet]. [cited 2022 Jan 25]. Available from: <https://data.europa.eu/data/datasets/cosmetic-ingredient-database-list-of-uv-filters-allowed-in-cosmetic-products?locale=en>.
57. Suozzi K, Turban J, Girardi M. Cutaneous Photoprotection: A Review of the Current Status and Evolving Strategies. *Yale J Biol Med* 2020; 93: 55–67.
58. Garnacho Saucedo GM, Salido Vallejo R, Moreno Giménez JC. Efectos de la radiación solar y actualización en fotoprotección. *An Pediatr (Barc)* Elsevier; 2020; 92: 377.e1-377.e9.
59. Rai R, Shanmuga SC, Srinivas C. Update on photoprotection. *Indian J Dermatol* 2012; 57: 335–342.
60. María Isabel Moreno¹, , Luis Hernando Moreno². Fotoprotección. *Rev Asoc Colomb Dermatol*. 2010; : 18: 31-39.
61. Gabros S, Nessel TA, Zito PM. Sunscreens And Photoprotection. *StatPearls* [Internet] Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cited 2022 Jan 24]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537164/>.
62. Geoffrey K, Mwangi AN, Maru SM. Sunscreen products: Rationale for use, formulation development and regulatory considerations. *Saudi Pharm J* 2019; 27: 1009–1018.
63. Milito A, Castellano I, Damiani E. From Sea to Skin: Is There a Future for Natural Photoprotectants? *Marine Drugs* Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2021; 19: 379.
64. Shaath NA. Ultraviolet filters. *Photochem Photobiol Sci* 2010; 9: 464–469.

-
65. Kullavanijaya P, Lim HW. Photoprotection. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52: 937–958; quiz 959–962.
66. Sohn M. UV Booster and Photoprotection. In: Wang SQ, Lim HW, editors. *Principles and Practice of Photoprotection* Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 227–245.
67. Wang P-W, Hung Y-C, Lin T-Y, Fang J-Y, Yang P-M, Chen M-H, Pan T-L. Comparison of the Biological Impact of UVA and UVB upon the Skin with Functional Proteomics and Immunohistochemistry. *Antioxidants (Basel)* 2019; 8.
68. Chaiprasongsuk A, Janjetovic Z, Kim T-K, Jarrett SG, D’Orazio JA, Holick MF, Tang EKY, Tuckey RC, Panich U, Li W, Slominski AT. Protective effects of novel derivatives of vitamin D3 and lumisterol against UVB-induced damage in human keratinocytes involve activation of Nrf2 and p53 defense mechanisms. *Redox Biology* 2019; 24: 101206.
69. Rojo de la Vega M, Krajisnik A, Zhang DD, Wondrak GT. Targeting NRF2 for Improved Skin Barrier Function and Photoprotection: Focus on the Achiote-Derived Apocarotenoid Bixin. *Nutrients* [Internet] 2017 [cited 2020 Oct 8]; 9 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5748821/>.
70. Saw CL, Huang M-T, Liu Y, Khor TO, Conney AH, Kong A-N. Impact of Nrf2 on UVB-induced skin inflammation/photoprotection and photoprotective effect of sulforaphane: PHOTOPROTECTION OF Nrf2 AND SULFORAPHANE. *Mol. Carcinog.* 2011; 50: 479–486.
71. Tao S, Justiniano R, Zhang DD, Wondrak GT. The Nrf2-inducers tanshinone I and dihydrotanshinone protect human skin cells and reconstructed human skin against solar simulated UV. *Redox Biology* 2013; 1: 532–541.
72. Zhou J, Wang T, Wang H, Jiang Y, Peng S. Obacunone attenuates high glucose-induced oxidative damage in NRK-52E cells by inhibiting the activity of GSK-3 β . *Biochem Biophys Res Commun* 2019; 513: 226–233.
73. Obacunone (A13-37934) | $\geq 99\%$ (HPLC) | Selleck | Aromatase inhibitor [Internet]. [selleckchem.com](https://www.selleckchem.com) [cited 2022 Feb 21]. Available from: <https://www.selleckchem.com/products/obacunone.html>.

-
74. Bai Y, Wang W, Wang L, Ma L, Zhai D, Wang F, Shi R, Liu C, Xu Q, Chen G, Lu Z. Obacunone Attenuates Liver Fibrosis with Enhancing Anti-Oxidant Effects of GPx-4 and Inhibition of EMT. *Molecules* 2021; 26: E318.
75. Gao Y, Hou R, Liu F, Liu H, Fei Q, Han Y, Cai R, Peng C, Qi Y. Obacunone causes sustained expression of MKP-1 thus inactivating p38 MAPK to suppress pro-inflammatory mediators through intracellular MIF. *J Cell Biochem* 2018; 119: 837–849.
76. Luo X, Yu Z, Yue B, Ren J, Zhang J, Mani S, Wang Z, Dou W. Obacunone reduces inflammatory signalling and tumour occurrence in mice with chronic inflammation-induced colorectal cancer. *Pharm Biol* 2020; 58: 886–897.
77. Huang D-R, Dai C-M, Li S-Y, Li X-F. Obacunone protects retinal pigment epithelium cells from ultra-violet radiation-induced oxidative injury. *Aging (Albany NY)* 2021; 13: 11010–11025.
78. Pellevoisin C, Bouez C, Cotovio J. 1 - Cosmetic industry requirements regarding skin models for cosmetic testing. In: Marques AP, Pirraco RP, Cerqueira MT, Reis RL, editors. *Skin Tissue Models* [Internet] Boston: Academic Press; 2018 [cited 2020 Apr 22]. p. 3–37 Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128105450000012>.
79. Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. *J Pharmacol Exp Ther* American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics; 1944; 82: 377–390.
80. OECD. Test No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion [Internet]. 2002 [cited 2020 Apr 22]. Available from: <https://doi.org/10.1787/9789264070622-en>.
81. Pedrosa T do N, Catarino CM, Pennacchi PC, Assis SR de, Gimenes F, Consolaro MEL, Barros SB de M, Maria-Engler SS. A new reconstructed human epidermis for in vitro skin irritation testing. *Toxicology in Vitro* 2017; 42: 31–37.
82. Capallere C, Plaza C, Meyrignac C, Arcioni M, Brulas M, Busuttil V, Garcia I, Bauza É, Botto J-M. Property characterization of reconstructed human epidermis equivalents, and performance as a skin irritation model. *Toxicol In Vitro* 2018; 53: 45–56.

83. Alejandro A, García-Bilbao A, Aristimuño C. Avances en la evaluación de la sensibilización dérmica mediante métodos alternativos | Revista de Toxicología de AETOX. *Revista de toxicología* 2014; 36.
84. Marionnet C, Bernerd F. Organotypic models for evaluating sunscreens. *Principles and Practice of Photoprotection* 2016; : 199–225.
85. Marionnet C, Bernerd F. In Vitro Skin Models for the Evaluation of Sunscreen-Based Skin Photoprotection: Molecular Methodologies and Opportunities. *Current Medicinal Chemistry* 2017; 26: 1874–1890.
86. Marionnet C, Grether-Beck S, Seité S, Marini A, Jaenicke T, Lejeune F, Bastien P, Rougier A, Bernerd F, Krutmann J. A broad-spectrum sunscreen prevents UVA radiation-induced gene expression in reconstructed skin in vitro and in human skin in vivo. *Exp. Dermatol.* 2011; 20: 477–482.
87. Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.* 1998; 50: 197–263.
88. Bernerd F, Vioux C, Asselineau D. Evaluation of the protective effect of sunscreens on in vitro reconstructed human skin exposed to UVB or UVA irradiation. *Photochem. Photobiol.* 2000; 71: 314–320.
89. Meloni M, Farina A, de Servi B. Molecular modifications of dermal and epidermal biomarkers following UVA exposures on reconstructed full-thickness human skin. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2010; 9: 439–447.
90. Avola R, Graziano ACE, Pannuzzo G, Bonina F, Cardile V. Hydroxytyrosol from olive fruits prevents blue-light-induced damage in human keratinocytes and fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 2019; 234: 9065–9076.
91. Barolet D, Christiaens F, Hamblin MR. Infrared and Skin: Friend or Foe. *J Photochem Photobiol B* 2016; 155: 78–85.
92. Marionnet C, Pierrard C, Lejeune F, Bernerd F. Modulations of gene expression induced by daily ultraviolet light can be prevented by a broad spectrum sunscreen. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 2012; 116: 37–47.

93. Rojo de la Vega M, Zhang DD, Wondrak GT. Topical Bixin Confers NRF2-Dependent Protection Against Photodamage and Hair Graying in Mouse Skin. *Front Pharmacol* 2018; 9: 287.
94. Rojo de la Vega M, Krajisnik A, Zhang DD, Wondrak GT. Targeting NRF2 for Improved Skin Barrier Function and Photoprotection: Focus on the Achiote-Derived Apocarotenoid Bixin. *Nutrients* 2017; 9: E1371.
95. Farooqi AA, Li R-N, Huang H-W, Ismail M, Yuan S-SF, Wang H-MD, Liu J-R, Tang J-Y, Chang H-W. Natural Products Mediated Regulation of Oxidative Stress and DNA Damage in Ultraviolet Exposed Skin Cells. *Curr Pharm Biotechnol* 2015; 16: 1078–1084.
96. Petruk G, Del Giudice R, Rigano MM, Monti DM. Antioxidants from Plants Protect against Skin Photoaging. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018: 1454936.
97. Chatelain E, Gabard B. Photostabilization of butyl methoxydibenzoylmethane (Avobenzone) and ethylhexyl methoxycinnamate by bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb S), a new UV broadband filter. *Photochem Photobiol* 2001; 74: 401–406.
98. Berardesca E, Zuberbier T, Sanchez Viera M, Marinovich M. Review of the safety of octocrylene used as an ultraviolet filter in cosmetics. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2019; 33 Suppl 7: 25–33.
99. Polysilicone-15 [Internet]. [cited 2022 Feb 10]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB11271>.
100. Sobanska AW, Pyzowski J. Quantification of Sunscreen Ethylhexyl Triazone in Topical Skin-Care Products by Normal-Phase TLC/Densitometry. *ScientificWorldJournal* 2012; 2012: 807516.
101. Balaguer A, Chisvert A, Salvador A. Sequential-injection determination of traces of disodium phenyl dibenzimidazole tetrasulphonate in urine from users of sunscreens by on-line solid-phase extraction coupled with a fluorimetric detector. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006; 40: 922–927.

102. Synoxyl® HSS by Sytheon - Personal Care & Cosmetics [Internet]. [cited 2022 Feb 10]. Available from: <https://www.ulprospector.com/en/eu/PersonalCare/Detail/4724/372727/Synoxyl-HSS>.
103. OECD. Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method [Internet]. 2019 [cited 2020 Apr 22]. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-439-in-vitro-skin-irritation-reconstructed-human-epidermis-test-method_9789264242845-en.
104. Lin H. Lateral Flow-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay as a Point-of-Care Technique to Predict Type I Reversal Reactions in Lepromatous Patients. *Biology in South India* 2016; : 1–5.
105. Johnson M, Brzoska P. Uso de la PCR en tiempo real para la detección de patógenos. : 5.
106. Man TP. How to Prepare Samples for Western Blot Analysis [Internet]. [cited 2021 Sep 8]. Available from: <https://info.gbiosciences.com/blog/how-to-prepare-samples-for-western-blot-analysis-1>.
107. Cristina Estornut, Paula Montero, Antonio Andrés, Julio Cortijo, M. José Villarroel. Uso de modelos de piel artificial en la investigación dermocosmética. *SEQC / Sociedad Española de Químicos Cosméticos* [Internet] [cited 2022 Feb 22]; Available from: <https://www.e-seqc.org/revista/73/revista-ncp-n-377/>.
108. Spielmann H, Hoffmann S, Liebsch M, Botham P, Fentem JH, Eskes C, Roguet R, Cotovio J, Cole T, Worth A, Heylings J, Jones P, Robles C, Kandárová H, Gamer A, Remmele M, Curren R, Raabe H, Cockshott A, Gerner I, Zuang V. The ECVAM International Validation Study on in Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. *Altern Lab Anim* SAGE Publications Ltd STM; 2007; 35: 559–601.
109. Boxman IL, Ruwhof C, Boerman OC, Löwik CW, Ponc M. Role of fibroblasts in the regulation of proinflammatory interleukin IL-1, IL-6 and IL-8 levels induced by keratinocyte-derived IL-1. *Arch. Dermatol. Res.* 1996; 288: 391–398.
110. Welss T, Basketter DA, Schröder KR. In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicology in Vitro* 2004; 18: 231–243.

111. Bernhofer LP, Seiberg M, Martin KM. The Influence of the Response of Skin Equivalent Systems to Topically Applied Consumer Products by Epithelial--Mesenchymal Interactions. *Toxicology in Vitro* 1999; 13: 219–229.
112. Ponc M, Kempenaar J. Use of human skin recombinants as an in vitro model for testing the irritation potential of cutaneous irritants. *Skin Pharmacol*. 1995; 8: 49–59.
113. Robert C, Bonnet M, Marques S, Numa M, Doucet O. Low to moderate doses of infrared A irradiation impair extracellular matrix homeostasis of the skin and contribute to skin photodamage. *Skin Pharmacol Physiol* 2015; 28: 196–204.
114. Schieke SM, Stege H, Kürten V, Grether-Beck S, Sies H, Krutmann J. Infrared-A Radiation-Induced Matrix Metalloproteinase 1 Expression is Mediated Through Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 Activation in Human Dermal Fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology* 2002; 119: 1323–1329.
115. P S, J L, Me D, H S, C M, S B, J K. Infrared radiation-induced matrix metalloproteinase in human skin: implications for protection. *The Journal of investigative dermatology* [Internet] J Invest Dermatol; 2008 [cited 2022 Feb 4]; 128 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18449210/>.
116. Fagot D, Asselineau D, Bernerd F. Matrix metalloproteinase-1 production observed after solar-simulated radiation exposure is assumed by dermal fibroblasts but involves a paracrine activation through epidermal keratinocytes. *Photochem Photobiol* 2004; 79: 499–505.
117. Coquette A, Berna N, Vandenbosch A, Rosdy M, De Wever B, Poumay Y. Analysis of interleukin-1 α (IL-1 α) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in in vitro reconstructed human epidermis for the prediction of in vivo skin irritation and/or sensitization. *Toxicology in Vitro* 2003; 17: 311–321.
118. Liu Y, Wang R, He X, Dai H, Betts RJ, Marionnet C, Bernerd F, Planel E, Wang X, Nocairi H, Cai Z, Qiu J, Ding C. Validation of a predictive method for sunscreen formula evaluation using gene expression analysis in a Chinese reconstructed full-thickness skin model. *Int J Cosmet Sci* 2019; 41: 147–155.

119. Storey A, Rogers JS, McArdle F, Jackson MJ, Rhodes LE. Conjugated linoleic acids modulate UVR-induced IL-8 and PGE 2 in human skin cells: potential of CLA isomers in nutritional photoprotection. *Carcinogenesis Oxford Academic*; 2007; 28: 1329–1333.
120. Falcone D, Uzunbajakava NE, van Abeelen F, Oversluizen G, Peppelman M, van Erp PEJ, van de Kerkhof PCM. Effects of blue light on inflammation and skin barrier recovery following acute perturbation. Pilot study results in healthy human subjects. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2018; 34: 184–193.
121. Nam J-J, Min J-E, Son M-H, Oh J-H, Kang S. Ultraviolet- and infrared-induced 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activating skin photoaging is inhibited by red ginseng extract containing high concentration of ginsenoside Rg3(S). *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 2017; 33: 311–320.
122. Bernerd F, Asselineau D. UVA exposure of human skin reconstructed in vitro induces apoptosis of dermal fibroblasts: subsequent connective tissue repair and implications in photoaging. *Cell Death & Differentiation* Nature Publishing Group; 1998; 5: 792–802.
123. Vioux-Chagnoleau C, Lejeune F, Sok J, Pierrard C, Marionnet C, Bernerd F. Reconstructed human skin: From photodamage to sunscreen photoprotection and anti-aging molecules. *Journal of Dermatological Science Supplement* 2006; 2: S1–S12.
124. Brennan M, Bhatti H, Nerusu KC, Bhagavathula N, Kang S, Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ. Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. *Photochem Photobiol* 2003; 78: 43–48.
125. Keurentjes AJ, Jakasa I, van Dijk A, van Putten E, Brans R, John SM, Rustemeyer T, van der Molen HF, Kezic S. Stratum corneum biomarkers after in vivo repeated exposure to sub-erythemal dosages of ultraviolet radiation in unprotected and sunscreen (SPF 50+) protected skin. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 2022; 38: 60–68.
126. Afaq F, Zaid MA, Khan N, Dreher M, Mukhtar H. Protective effect of pomegranate derived products on UVB-mediated damage in human reconstituted skin. *Exp Dermatol* 2009; 18: 553–561.
127. Nam J-J, Min J-E, Son M-H, Oh J-H, Kang S. Ultraviolet- and infrared-induced 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activating skin photoaging is inhibited by red

- ginseng extract containing high concentration of ginsenoside Rg3(S). *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2017; 33: 311–320.
128. Jagdeo JR, Adams LE, Brody NI, Siegel DM. Transcranial red and near infrared light transmission in a cadaveric model. *PLoS One* 2012; 7: e47460.
129. Cho S, Lee MJ, Kim MS, Lee S, Kim YK, Lee DH, Lee CW, Cho KH, Chung JH. Infrared plus visible light and heat from natural sunlight participate in the expression of MMPs and type I procollagen as well as infiltration of inflammatory cell in human skin in vivo. *Journal of Dermatological Science* 2008; 50: 123–133.
130. Akhalaya MYa, Maksimov GV, Rubin AB, Lademann J, Darvin ME. Molecular action mechanisms of solar infrared radiation and heat on human skin. *Ageing Research Reviews* 2014; 16: 1–11.
131. Buster KJ, Ledet JJ. Photoprotection and Skin of Color. In: Wang SQ, Lim HW, editors. *Principles and Practice of Photoprotection* Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 105–124.
132. Mamalis A, Koo E, Jagdeo J. Resveratrol Prevents Reactive Oxygen Species-Induced Effects of Light-Emitting Diode-Generated Blue Light in Human Skin Fibroblasts. *Dermatol Surg* 2016; 42: 727–732.
133. Banaś AK, Zgłobicki P, Kowalska E, Bażant A, Dziga D, Strzałka W. All You Need Is Light. Photorepair of UV-Induced Pyrimidine Dimers. *Genes Multidisciplinary Digital Publishing Institute*; 2020; 11: 1304.
134. Thompson CL, Sancar A. Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock. *Oncogene* 2002; 21: 9043–9056.
135. Bernerd F, Asselineau D. An organotypic model of skin to study photodamage and photoprotection in vitro. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2008; 58: S155–S159.
136. Torricelli P, Fini M, Fanti PA, Dika E, Milani M. Protective effects of Polypodium leucotomos extract against UVB-induced damage in a model of reconstructed human epidermis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2017; 33: 156–163.

-
137. Duval C, Schmidt R, Regnier M, Facy V, Asselineau D, Bernerd F. The use of reconstructed human skin to evaluate UV-induced modifications and sunscreen efficacy. *Exp. Dermatol.* 2003; 12 Suppl 2: 64–70.
138. Tjioe M, Smits T, Blokk WAM, van de Kerkhof PCM, Gerritsen M-JP. High-dose long wave visible light induces perinuclear vacuolization in vivo but does not result in early photoageing and apoptosis. *Exp Dermatol* 2003; 12: 610–614.
139. König A, Zöller N, Kippenberger S, Bernd A, Kaufmann R, Layer PG, Heslich A. Non-thermal near-infrared exposure photobiomodulates cellular responses to ionizing radiation in human full thickness skin models. *J Photochem Photobiol B* 2018; 178: 115–123.
140. Marrot L, Planel E, Ginestet A-C, Belaïdi J-P, Jones C, Meunier J-R. In vitro tools for photobiological testing: molecular responses to simulated solar UV of keratinocytes growing as monolayers or as part of reconstructed skin. *Photochem Photobiol Sci* 2010; 9: 448–458.
141. Chaturvedi V, Qin J-Z, Stennett L, Choubey D, Nickoloff BJ. Resistance to UV-induced apoptosis in human keratinocytes during accelerated senescence is associated with functional inactivation of p53. *J Cell Physiol* 2004; 198: 100–109.
142. Lei X, Liu B, Han W, Ming M, He Y-Y. UVB-Induced p21 degradation promotes apoptosis of human keratinocytes. *Photochem Photobiol Sci* 2010; 9: 1640–1648.
143. Chen A, Huang X, Xue Z, Cao D, Huang K, Chen J, Pan Y, Gao Y. The Role of p21 in Apoptosis, Proliferation, Cell Cycle Arrest, and Antioxidant Activity in UVB-Irradiated Human HaCaT Keratinocytes. *Med Sci Monit Basic Res* 2015; 21: 86–95.
144. Sabziparvar AA, Shine KP, Forster PM de F. A Model-Derived Global Climatology of UV Irradiation at the Earth's Surface. *Photochem Photobiol* 1999; 69: 193–202.
145. Ryšavá A, Čížková K, Franková J, Roubalová L, Ulrichová J, Vostálová J, Vrba J, Zálešák B, Rajnochová Svobodová A. Effect of UVA radiation on the Nrf2 signalling pathway in human skin cells. *J Photochem Photobiol B* 2020; 209: 111948.

146. Schäfer M, Dütsch S, Keller U auf dem, Navid F, Schwarz A, Johnson DA, Johnson JA, Werner S. Nrf2 establishes a glutathione-mediated gradient of UVB cytoprotection in the epidermis. *Genes Dev.* 2010; 24: 1045–1058.
147. Mancuso JB, Maruthi R, Wang SQ, Lim HW. Sunscreens: An Update. *Am J Clin Dermatol* 2017; 18: 643–650.
148. Reeve VE, Bosnic M, Rozinova E. Carnosine (beta-alanylhistidine) protects from the suppression of contact hypersensitivity by ultraviolet B (280-320 nm) radiation or by cis urocanic acid. *Immunology* 1993; 78: 99–104.
149. EMANUELE E, BERTONA M, SANCHIS-GOMAR F, PAREJA-GALEANO H, LUCIA A. Protective effect of trehalose-loaded liposomes against UVB-induced photodamage in human keratinocytes. *Biomed Rep* 2014; 2: 755–759.
150. Chen AC, Damian DL, Halliday GM. Oral and systemic photoprotection. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 2014; 30: 102–111.
151. Calvert S, Tacutu R, Sharifi S, Teixeira R, Ghosh P, de Magalhães JP. A network pharmacology approach reveals new candidate caloric restriction mimetics in *C. elegans*. *Aging Cell* 2016; 15: 256–266.
152. Tauschel HD, Rudolph C. [Investigations on the percutaneous activity of a combination of heparin, allantoin and dexpanthenol in a specific ointment base, Antiinflammatory effect on UV-erythema in the guinea pig]. *Arzneimittelforschung* 1982; 32: 1096–1100.
153. Zholobak NM, Shcherbakov AB, Bogorad-Kobelska AS, Ivanova OS, Baranchikov AYe, Spivak NYa, Ivanov VK. Panthenol-stabilized cerium dioxide nanoparticles for cosmeceutic formulations against ROS-induced and UV-induced damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2014; 130: 102–108.
154. Zanatta CF, Mitjans M, Urgatondo V, Rocha-Filho PA, Vinardell MP. Photoprotective potential of emulsions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) against UV irradiation on keratinocytes and fibroblasts cell lines. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 70–75.
155. Rodrigues D, Viotto AC, Checchia R, Gomide A, Severino D, Itri R, Baptista MS, Martins WK. Mechanism of Aloe Vera extract protection against UVA: shelter of lysosomal membrane avoids photodamage. *Photochem Photobiol Sci* 2016; 15: 334–350.

156. Grether-Beck S, Marini A, Jaenicke T, Krutmann J. Effective photoprotection of human skin against infrared A radiation by topically applied antioxidants: results from a vehicle controlled, double-blind, randomized study. *Photochem Photobiol* 2015; 91: 248–250.
157. Baker LA, Clark SL, Habershon S, Stavros VG. Ultrafast Transient Absorption Spectroscopy of the Sunscreen Constituent Ethylhexyl Triazone. *J. Phys. Chem. Lett.* American Chemical Society; 2017; 8: 2113–2118.
158. Hexsel CL, Bangert SD, Hebert AA, Lim HW. Current sunscreen issues: 2007 Food and Drug Administration sunscreen labelling recommendations and combination sunscreen/insect repellent products. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2008; 59: 316–323.
159. Disodium Phenyl Dibenzimidazole Tetrasulfonate (Explained + Products) [Internet]. [cited 2022 Mar 30]. Available from: <https://incidecoder.com/ingredients/disodium-phenyl-dibenzimidazole-tetrasulfonate>.
160. Chaudhuri RK, Ollengo MA, Singh P, Martincigh BS. 3-(3,4,5-Trimethoxybenzylidene)-2,4-pentanedione: Design of a novel photostabilizer with in vivo SPF boosting properties and its use in developing broad-spectrum sunscreen formulations. *Int J Cosmet Sci* 2017; 39: 25–35.
161. Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine (Explained + Products) [Internet]. [cited 2022 Mar 30]. Available from: <https://incidecoder.com/ingredients/bis-ethylhexyloxyphenol-methoxyphenyl-triazine>.
162. Georgiev V, Slavov A, Vasileva I, Pavlov A. Plant cell culture as emerging technology for production of active cosmetic ingredients. *Eng Life Sci* 2018; 18: 779–798.
163. Latha MS, Martis J, Shobha V, Sham Shinde R, Bangera S, Krishnankutty B, Bellary S, Varughese S, Rao P, Naveen Kumar BR. Sunscreening Agents. *J Clin Aesthet Dermatol* 2013; 6: 16–26.
164. Schieke SM, Schroeder P, Krutmann J. Cutaneous effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2003; 19: 228–234.

165. Piazena H, Pittermann W, Müller W, Jung K, Kelleher DK, Herrling T, Meffert P, Uebelhack R, Kietzmann M. Effects of water-filtered infrared-A and of heat on cell death, inflammation, antioxidative potential and of free radical formation in viable skin--first results. *J Photochem Photobiol B* 2014; 138: 347–354.

8 ABREVIATURAS

AP-1	Proteína activadora 1
ARE	Elementos de respuesta antioxidante
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina de suero bovino
CAT	Catalasa
CO ₂	Dióxido de carbono
COL1A1	Colágeno tipo 1 alfa 1
COL7A1	Colágeno tipo 7 alfa 1
COLIPA	Asociación Europea de la Industria Cosmética
CPD	Dímeros ciclobutánicos de pirimidina
Ct	Ciclo umbral
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DCN	Decorina
DEM	Dosis eritematosa mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELN	Elastina
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GAG	Glicosaminoglicanos
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GPX1	Glutación peroxidasa 1
H ₂ DCF-DA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HO	Hidroxilo

HO1	Hemooxigenasa 1
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IR	Radiación Infrarroja
IVL	Involucrina
Keap1	Proteína represora 1 asociada a ECH similar a Kelch
KGM-2	Medio de crecimiento de queratinocitos
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinasa
MMP1	Metaloproteinasa 1
MMP9	Metaloproteinasa 9
MTT	Bromuro de Difeniltetrazlio
NF-Kb	Factor nuclear kappa B
NHEK	Queratinocitos primarios humanos normales
NQO1	NAD(P)H quinona oxidoreductasa
Nrf2	Factor nuclear derivado de eritroide 2
O ²⁻	Superóxido
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
P21	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina
P53	Proteína supresora de tumores p53.
PBS	Tampón fosfato salino

PG	Proteoglicanos
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RHE	Epidermis humana reconstruida
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN
ROOH	Peróxidos orgánicos.
siARN	ARN de interferencia
SOD	Superóxido dismutasa
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UV	Radiación Ultravioleta
UVA	Radiación ultravioleta-A
UVB	Radiación ultravioleta-B
VIS	Visible

9 ANEXOS

ANEXO 1

Publicación científica

“Uso de modelos de piel artificial
en la investigación dermocosmética”

Uso de modelos de piel artificial en la investigación dermocosmética

Cristina Estornut^a, Paula Montero^a, Antonio Andrés^b, Julio Cortijo^a y M. José Villarroyel^b

^a Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Univerisidad de Valencia.

^b RNB. Laboratorio cosmético.

Los nuevos modelos de piel artificial presentan un gran potencial en la investigación dermocosmética, tanto desde el punto de vista de la seguridad como el de la eficacia de los productos. Para poder valorar la capacidad de predicción de estos modelos se ha estudiado el comportamiento de dos modelos de epidermis reconstituida SkinEthic™ RHE y Phenion® Full-Thickness, y se han estudiado los biomarcadores que pueden relacionarse con los datos registrados de cosmetovigilancia.

Introducción

En el proceso de desarrollo de nuevas formulaciones cosméticas, se presta especial atención al potencial de irritación de la piel. La irritación cutánea, se define como el daño reversible de la piel después de la aplicación de una sustancia de prueba hasta 4 h (Pellevoisin et al., 2018) y es una de las principales causas de la inflamación dérmica (Wahlberg, 1996).

Durante años, la evaluación de la irritación aguda se ha realizado mediante el modelo de experimentación en piel de conejo conocido como el test Draize (Draize et al., 1944), en base a las directrices de la guía 404 (OECD, 2002) de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD). No obstante, debido a las consideraciones éticas, en 2009 se prohibió la experimentación animal en cosméticos en la Unión Europea, mediante el reglamento 1223/2009.

Por esta razón, el Laboratorio de Referencia para la Validación de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal de la Unión Europea (EURL-ECVAM) se ha dedicado a evaluar modelos de epidermis humana reconstituida (RHE) adecuados para identificar compuestos irritantes cutáneos con el fin de desarrollar alternativas *in vitro* (Alejandro et al., 2014). Todos los tejidos artificiales validados se encuentran recogidos en la guía TG 439 para el potencial de irritación cutánea *in vitro* de productos químicos de la OECD (OECD, 2019) y se va

actualizando a medida que se evalúan nuevos modelos. En consecuencia, los compuestos irritantes se identifican en los modelos RHE validados por su capacidad para disminuir la viabilidad celular en base al ensayo MTT (OECD, 2019). Por otra parte, se ha demostrado que la liberación de mediadores proinflamatorios de los equivalentes de la piel en respuesta a un irritante es útil para la predicción del potencial de irritación de la piel, en comparación con los resultados clínicos en humanos (Walters et al., 2016). Entre los parámetros adicionales que se pueden evaluar se encuentra la respuesta inflamatoria de la piel frente a estímulos irritantes, manifestada mediante la liberación de citocinas inflamatorias, como IL-1 α y citocinas quimiotácticas como IL-8 y IL-6.

Por tanto, el objetivo de este trabajo consistió en evaluar el potencial irritante mediante la determinación de mediadores de proinflamatorios en modelos de piel reconstituida en productos cosméticos, formulados por RNB, en el modelo de queratinocitos en monocapa y en los modelos comerciales de epidermis reconstituida SkinEthic™ RHE (EpiSkin™, L'Oréal Lyon France) y de piel completa Phenion® Full-Thickness (Henkel, Düsseldorf, Germany), con la finalidad de hacer una evaluación comparativa de los marcadores mediante un análisis de correlación realizado con los datos de cosmetovigilancia de RNB y valorar así qué marcador presenta una mayor correlación con los datos obtenidos tras la puesta en el mercado del producto.

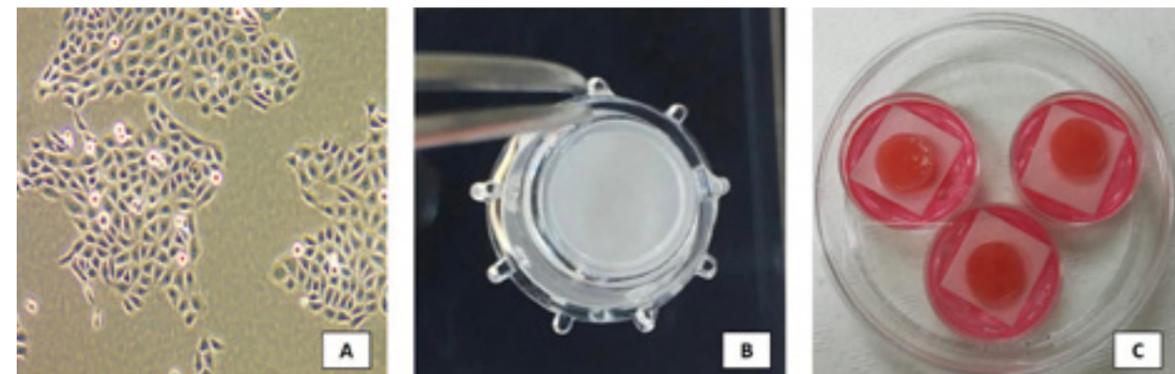


Figura 1. (A) Cultivo de células NHEK en monocapa. (B) Pocillo del modelo de epidermis reconstituida SkinEthic™ RHE. (C) Tejidos del modelo Phenion® Full-Thickness.

Material y Métodos

Línea celular y tejidos de epidermis humana reconstituida

Los queratinocitos primarios de epidermis humana (NHEK) se obtuvieron de promocell. El modelo SkinEthic™ RHE (EpiSkin™, L'Oréal Lyon France) es una epidermis humana reconstituida *in vitro* a partir de queratinocitos humanos cultivados en la interfaz aire-líquido en un filtro de policarbonato inerte y con un medio químicamente definido. Este modelo es histológicamente similar a la epidermis humana *in vivo* (www.episkin.com). El modelo Phenion® Full-Thickness (Henkel, Düsseldorf, Germany) se compone de queratinocitos y fibroblastos derivados del mismo donante humano y se diferencia y estratifica de manera similar a la piel humana nativa, lo que incluye la generación de una capa córnea (www.phenion.com).

Compuestos a testar

Para este estudio se utilizaron seis cosméticos de uso tópico fabricados por RNB algunos ya disponibles en el mercado y otros listos para la venta. Estos cosméticos

Tabla 1. Compuestos cosméticos utilizados

Referencia propia	Referencia RNB
Crema 1	Fotoprotector FPS20. Fórmula marco 9.1-2011
Crema 2	Crema facial Fórmula marco 1.1-2011
Crema 3	Crema facial SPF 15. Formula marco 1.6-2011
Crema 4	Fotoprotector SPF50+ Fórmulas marco 9.1-2011
Crema 5	Fotoprotector FPS30. Fórmula marco 9.1-2011
Crema 6	Crema facial SPF 10. Fórmula marco 1.6-2011

incluyen cremas faciales y protectores solares, en la Tabla 1 se indica el tipo de producto y la formula marco correspondiente.

Tratamiento de la monocapa y los tejidos de epidermis humana reconstituida

A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos utilizados se obtuvieron de Sigma Chemical Co. Los queratinocitos primarios NHEK se sembraron en placas de 24 pocillos con medio KGM-2 (Lonza) a una densidad de 5x10⁴ células/pocillo. Se prepararon los controles positivos dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0,2% y ácido acético glacial a 0,9 y 1,9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, así como las cremas a las distintas concentraciones: 1%, 0,1% y 0,025%. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 90% el medio se reemplazó por los respectivos tratamientos y se incubaron durante 1 h a 37 ° C y 5% de CO₂.

A la recepción de los modelos de epidermis reconstituida, los tejidos se manejaron de acuerdo con las indicaciones de los fabricantes. La prueba de irritación para el modelo SkinEthic™ RHE se realizó según las directrices del protocolo TG 439 (OECD, 2019). Se aplicaron tópicamente 32 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de cada una de las cremas, así como de los controles positivos (SDS 5%, ácido acético 2, 20, 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y del control negativo (solución salina tamporada con fosfato, PBS) durante 42 minutos. Se empleó una malla de nylon en la parte superior de la epidermis para facilitar la distribución de los compuestos. Tras el período de exposición, los tejidos se lavaron con PBS y se les añadió medio fresco durante un período de incubación de 42 h, a 37 ° C y 5% de CO₂.

Del mismo modo que el modelo SkinEthic™ RHE, el ensayo de irritación para Phenion® Full-Thickness se llevó a cabo en primer lugar en base a las directrices de la OECD (OECD, 2019). Sin embargo, el tejido de piel reconstituida Phenion® FT presentaba unas viabilidades

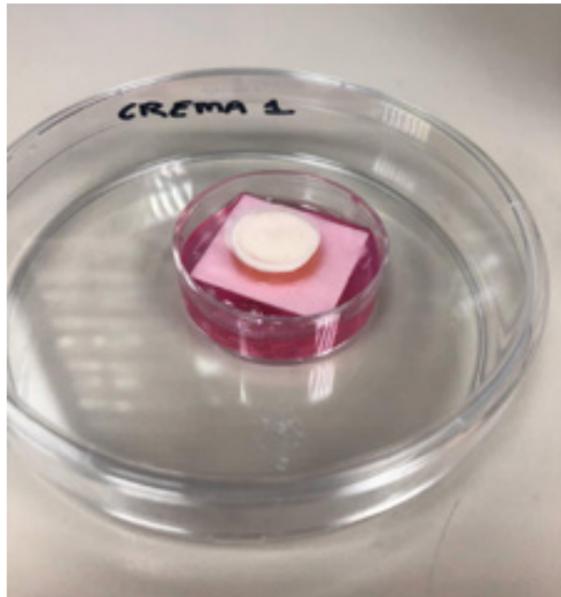


Figura 2. Protocolo de aplicación tópica de las cremas mediante malla de nylon en Phenion® FT.

celulares superiores al 50% en todos los casos (datos no mostrados). Esto llevó a la elaboración de un nuevo método para la determinación de la respuesta a sustancias irritantes para el modelo Phenion® FT. Según este protocolo, se aplicaron tópicamente 100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de cada una de las cremas, así como de los controles positivos (SDS 5%, ácido acético 2, 20, 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y se distribuyeron en la superficie epitelial con la ayuda de una malla de nylon durante períodos de incubación de 4 h. Seguidamente, los tejidos se lavaron con PBS y se les añadió medio fresco para ser incubados durante 24h.

En todos los casos, tras el período de incubación se recogieron, por una parte, los sobrenadantes de medio de cultivo y se almacenaron en alícuotas -70°C para el posterior análisis de mediadores proinflamatorios solubles y, por otra parte, se midió la viabilidad celular mediante el ensayo MTT para la evaluación de la irritación cutánea *in vitro*.

Análisis histológico: Tinción hematoxilina eosina

Para la evaluación histológica de la morfología de los modelos 3D, los tejidos se sumergieron en una solución de paraformaldehído al 4% durante 24h, se deshidrataron en un gradiente de alcoholes y se incluyeron en parafina. Una vez parafinados, se obtuvieron secciones de 4 μm con el microtomo Leica Biosystems. A continuación, se rehidrataron con baños sucesivos de xileno, alcohol y agua. La tinción con hematoxilina y eosina

(H&E) se realizó colocando los portaobjetos en hematoxilina diluida $\frac{1}{2}$ durante 2 minutos y en eosina activada 5 minutos y posteriormente se deshidrataron en varios lavados de alcohol y xileno antes de montarse en los portaobjetos con el medio de montaje DPX. Los cortes se examinaron usando un microscopio Eclipse E600 (Nikon) con un objetivo 20X.

Ensayo de viabilidad celular MTT

Tras los períodos de incubación correspondientes, se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico MTT. El MTT es absorbido por las células vivas y luego metabolizado por las enzimas mitocondriales para reducirse en el producto púrpura formazán que es impermeable a las membranas celulares. De esta manera, el formazán queda acumulado dentro de las células vivas. Las células y los modelos se incubaron en solución MTT 1mg/ml durante 3 horas a 37°C , y 5% CO_2 . A continuación, se retiró el exceso de MTT y los tejidos se colocaron durante 2 horas en una placa con isopropanol con la finalidad de extraer el formazán del tejido. Seguidamente, se transfirieron 100 μl de cada extracción a una placa de 96 pocillos para la medición de la absorbancia (densidad óptica DO) a 570 nm utilizando en el lector de microplacas Victor 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer). Los resultados se expresaron como el porcentaje de viabilidad en relación con los controles negativos.

Determinación de Interleuquinas

Con la finalidad de determinar cuantitativamente los niveles de citoquinas en los sobrenadantes recogidos tras los tratamientos se analizó la liberación de IL-6, IL-8 e IL-1 α , siguiendo el protocolo recomendado por los fabricantes de los kits Human IL-6 DuoSet ELISA (n° Cat. DY206-05, R&D), Human IL-8 DuoSet ELISA (n° Cat. DY208, R&D) y Human IL-1 α DuoSet ELISA (n° Cat. DY200, R&D). Estos kits se basan en la técnica de ELISA cuantitativo en sándwich, utilizando una placa que se incubaba con el anticuerpo específico contra la citoquina de interés. Así pues, dichas placas se incubaron por un lado con concentraciones seriadas del reactivo estándar proporcionado por el kit para establecer una recta patrón y, por otro lado, con las muestras correspondientes. La emisión de señal se basa en el hecho de que el anticuerpo secundario proporcionado por el kit tiene asociado un enzima que modifica el sustrato 3,3', 5,5'- tetrametilbencidina (TMB), dando lugar a un producto coloreado cuya intensidad será proporcional a la concentración de anticuerpo unido en el paso inicial. A continuación, se midió la absorbancia a 450 nm en el espectrofotómetro Victor 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer). Los datos

de concentración de cada una de las citoquinas se calcularon a partir de la recta patrón.

Análisis estadístico

Todos los valores experimentales se representaron como media \pm el error de la media (SEM) a partir de experimentos por triplicado y tres replicados ($n = 3$). Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA). Los valores de P de 0.05 o menos se consideraron significativos. Los resultados se analizaron con el programa estadístico Graphpad prism 8.

Correlación de datos

Se estudia si existe relación entre los datos de cosmetovigilancia de varias cremas respecto a los atributos medidos sobre pieles artificiales de dos proveedores (Phenion® FT y SkinEthic™ RHE). Con este objetivo, se aplica el método de regresión lineal múltiple, utilizando como criterio de selección de variables el método "forward-stepwise" al set de datos, donde la matriz X

representa los atributos medidos en las pieles artificiales sobre cada una de las cremas: viabilidad, interleucinas, etc. Mientras que la matriz Y corresponde a la cosmetovigilancia histórica de cada una de las cremas.

Resultados

Efecto en la viabilidad celular en cultivos monocapa 2D de queratinocitos primarios

En este estudio se determinó que la totalidad de las cremas mostraba diferencias significativas cuando se aplicaba al 1% respecto al control negativo y, exceptuando la crema 1, una viabilidad del 50% o menor a esta misma concentración. Se observaron además diferencias significativas respecto al control de todas las cremas aplicadas al 0.1%, mientras que las viabilidades eran mayores del 50% para todas las cremas excepto la 3 y la 5 a esta concentración. Por último, para la concentración más baja (0.025%), todas las cremas menos la 6 mostraron diferencias significativas respecto al control, pero, exceptuando la 3, todas mostraron viabilidades mayores al 50% (Fig. 3).

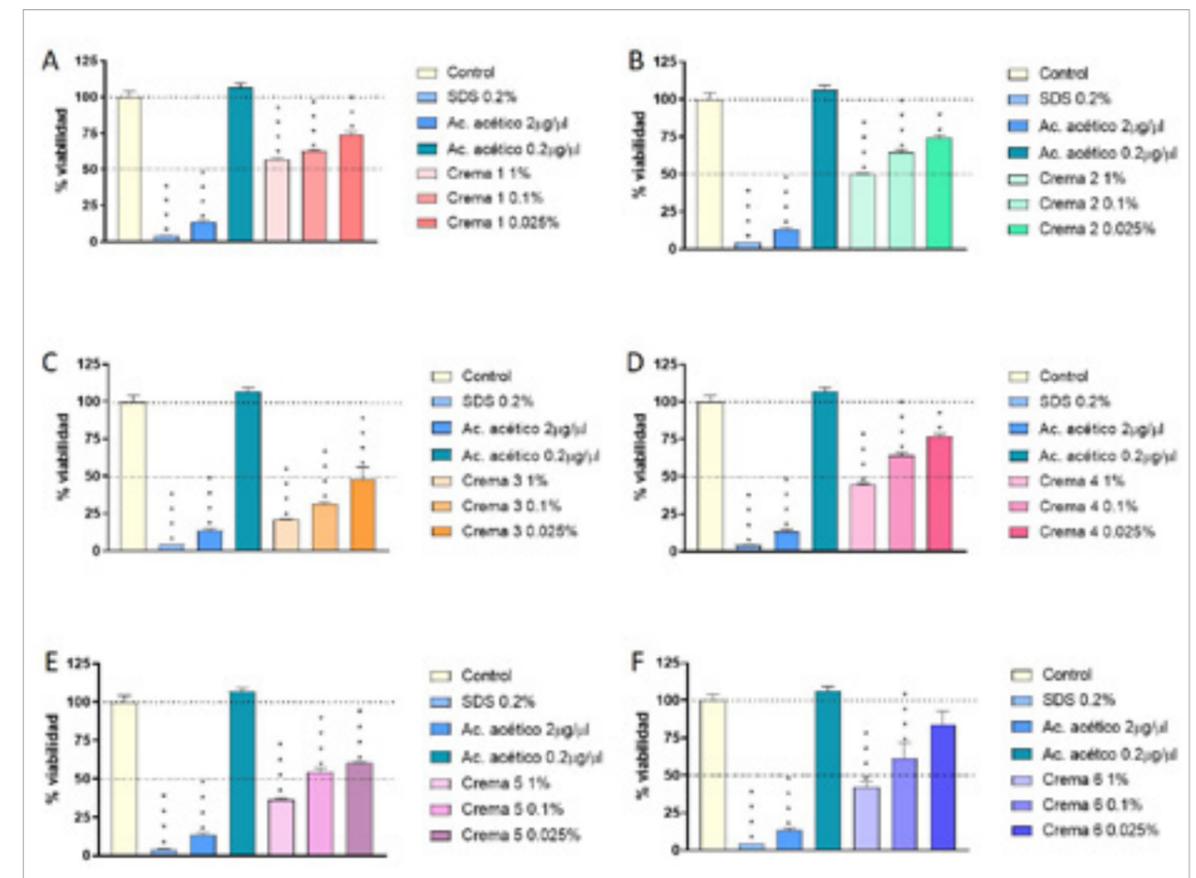


Figura 3. Comparación de la viabilidad en queratinocitos humanos de diferentes concentraciones (1%, 0.1% y 0.025%) de los 6 compuestos de uso tópico: crema 1 (A), crema 2 (B), crema 3 (C), crema 4 (D), crema 5 (E) y crema 6 (F). El porcentaje de viabilidad se calculó respecto al control negativo (* diferencias respecto al control negativo).

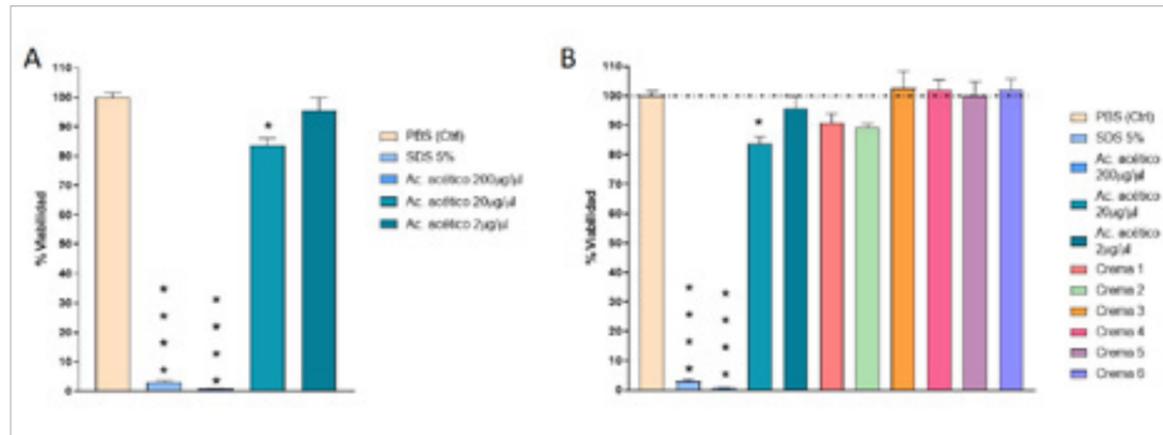


Figura 4. Comparación de la viabilidad en modelo de piel 3D SkinEthic™ RHE tras su exposición a (A) compuestos irritantes (SDS 5%, ácido acético 2µg/µl, 20µg/µl y 200µg/µl) y (B) a las 6 cremas (32µl/cm²) durante 42min y una incubación posterior de 42h. El porcentaje de viabilidad se calculó respecto al control negativo (PBS) (* diferencias respecto al control negativo).

Efecto en la liberación de IL8 en cultivos monocapa 2D de queratinocitos primarios

En cuanto al marcador de inflamación en monocapa, se observó que el control negativo produjo una liberación de 3.63 ± 0.17 ng/ml de IL-8, mientras que, en el control positivo, SDS, la producción de IL-8 aumentó significativamente hasta 4.91 ± 0.58 ng/ml. En este caso, ninguna de las cremas produjo un incremento significativo en la liberación de IL-8 respecto al control negativo (datos no mostrados).

Efecto en la viabilidad celular en modelos 3D de piel reconstruida SkinEthic™ RHE

En la determinación de la respuesta del modelo 3D SkinEthic™ RHE a sustancias irritantes (SDS 5% y ácido

acético a diferentes concentraciones), se observó una viabilidad menor del 10% para el SDS 5%, tal como indica la OECD (OECD, 2019). Como se muestra en la Fig. 4 (A), los tejidos a los que se les había aplicado ácido acético a una concentración de 2 µg/µl presentaban una viabilidad superior al 90%. La aplicación de ácido acético a 20 µg/µl, sin embargo, reducía la viabilidad de forma significativa respecto al control negativo pero superior al 70%, lo que no se considera citotóxico. Por otro lado, los tejidos tratados con ácido acético a una concentración de 200 µg/µl presentaban una viabilidad inferior al 5%.

Se procedió, entonces, a la determinación del efecto citotóxico de los 6 cosméticos de uso tópico y se observó que la totalidad de los 6 cosméticos presentaban una viabilidad superior al 80% y en la mayoría de los casos, la viabilidad era de un 100% (Fig. 4, B; Fig. 8, A).

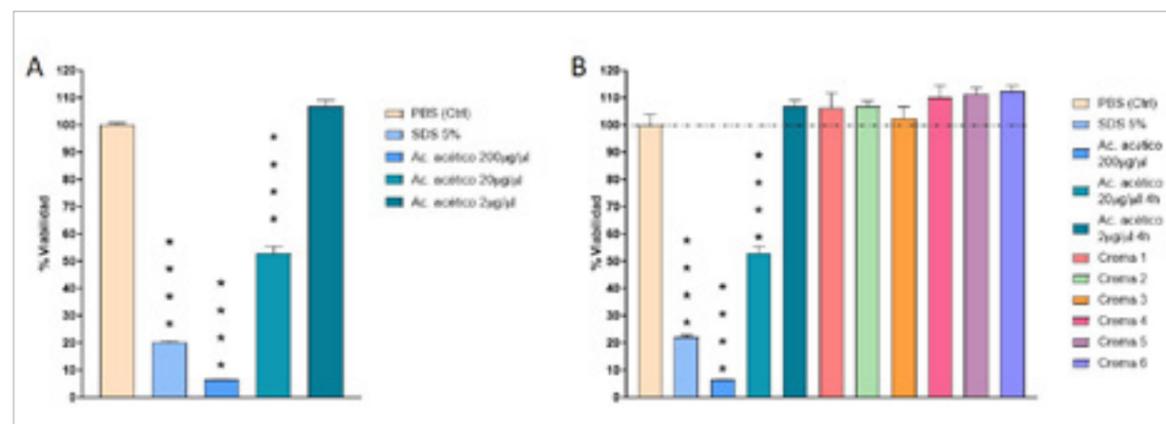


Figura 5. Comparación de la viabilidad en modelo de piel 3D Phenion® Full-Thickness tras su exposición a (A) compuestos irritantes (SDS 5%, ácido acético 2µg/µl, 20µg/µl y 200µg/µl) y (B) a las 6 cremas (100µl/cm²) durante 4h y una incubación posterior de 24h. El porcentaje de viabilidad se calculó respecto al control negativo (PBS) (* diferencias respecto al control negativo).

Efecto en la viabilidad celular en modelos 3D de piel reconstruida Phenion® Full-Thickness

La Fig. 5 (A) muestra cómo tras 4h de exposición los tejidos tratados con ácido acético 20µg/µl presentaban una viabilidad del 50%, significativamente menor a la presentada tras 42min de exposición (~100%) (datos no mostrados). Además, se observó que la aplicación de ácido acético a 200µg/µl reducía la viabilidad celular hasta un 6%. Asimismo, se observó que la viabilidad celular presentada por los tejidos tratados 4h con SDS 5% fue menor al 20%. En el caso de las cremas, se observó que todas presentaban una viabilidad del 100% (Fig. 5, B; Fig. 8, A).

Evaluación morfológica de la irritación en los modelos de epidermis reconstruida SkinEthic™ RHE y el modelo de dermis reconstruida Phenion® Full-Thickness

Con la finalidad de estudiar la morfología tisular de los modelos de piel reconstruida y verificar el efecto de la aplicación de compuestos irritantes y cosméticos, se llevaron a cabo tinciones histológicas de hematoxilina-eosina.

Tal como se muestra en la Fig. 6, el modelo SkinEthic™ RHE presenta todas las capas celulares esperadas. Se pueden distinguir la capa de células basales representada por células columnares, el estrato espinoso con

células espinosas, la capa granular con queratinocitos cargados con gránulos de queratohialina y finalmente, el estrato córneo con queratinocitos desnucleados. Asimismo, el modelo Phenion® FT presenta además de las capas epidérmicas características mencionadas, una capa dérmica formada por fibroblastos embebidos en una matriz de colágeno.

En las imágenes histológicas de los tejidos tratados con SDS 5%, se observó el desprendimiento de células en el estrato córneo, así como, en el caso concreto del tejido SkinEthic™ RHE, la pérdida de queratinocitos en el estrato granuloso. En ambos modelos, el SDS 5% produjo alteraciones morfológicas de la arquitectura tisular. Sin embargo, tal como muestran la Fig. 6, el tratamiento con los compuestos cosméticos no generó ningún cambio morfológico en la estructura de los modelos de piel reconstruida, lo que demuestra que los compuestos no generan ningún efecto irritante sobre la piel, tal como evidenciaron los ensayos de viabilidad por MTT realizados.

Efecto en la liberación de IL-1α, IL-6 e IL-8 en modelos 3D de piel reconstruida SkinEthic™ RHE

En el modelo SkinEthic™ RHE, tras una exposición de 42min y una incubación de 42h, se observó una liberación de IL-1α de 24.09 ± 3.59 pg/ml por parte del control negativo. En el caso del control positivo, SDS, los

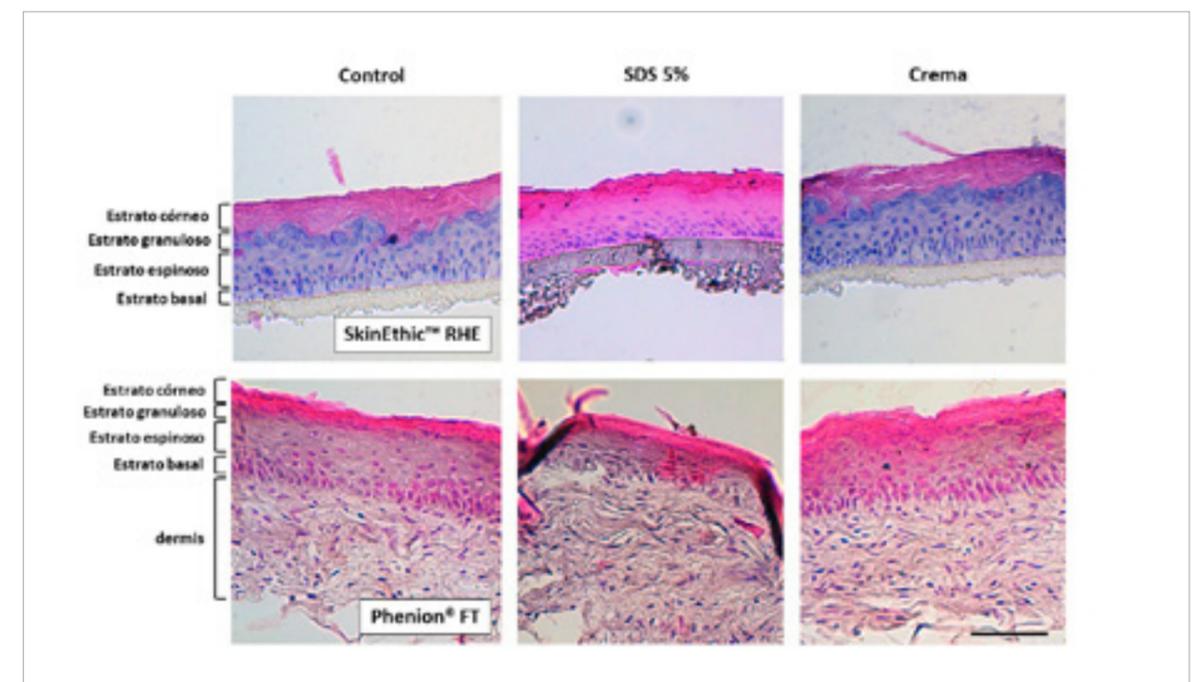


Figura 6. Efectos de la exposición al irritante SDS 5% y a las cremas en los modelos 3D SkinEthic™ RHE y Phenion® Full-Thickness. Tinción hematoxilina eosina. Escala 100 µm.

niveles de liberación aumentaron significativamente hasta 231.56 ± 32.03 pg/ml. Los tejidos tratados con las cremas 1, 3 y 4 produjeron una mayor liberación de IL-1 α comparado al control negativo, pero no significativa (62.26 ± 25.19 pg/ml, 55.81 ± 13.89 pg/ml y 78.02 ± 25.27 pg/ml, respectivamente) y muy lejos de los niveles liberados por el control positivo SDS 5%. El resto de las cremas no produjo un incremento en la liberación de esta interleuquina en comparación al control negativo (Fig. 8, B) (datos no mostrados). Por otro lado, no se observaron cambios en la liberación de IL-8 y IL-6 respecto al control (datos no mostrados).

Efecto en la liberación de IL-1 α , IL-6 e IL-8 en modelos 3D de piel reconstruida Phenion® Full-Thickness

Para este modelo, se observó que, tras 42min de exposición y 42h de incubación, el control negativo (PBS) producía una liberación de 14.38 ± 2.20 pg/ml de IL-1 α , mientras que en el control positivo (SDS) la liberación de interleuquina aumentó de forma significativa hasta 203.90 ± 4.18 pg/ml. Ninguna de las cremas, en este caso, produjo un incremento en la liberación de IL-1 α destacable y significativo respecto al control negativo (Fig. 8, B) (datos no mostrados). Respecto a IL-8, el control negativo produjo una liberación de 16.66 ± 2.20 pg/ml; el control positivo (SDS) produjo un incremento significativo en liberación de IL-8 respecto al control y llegó a 105.30 ± 18.89 pg/ml; y, en este caso, las cremas 3, 5 y 6 produjeron un pequeño aumento no significativo, muy alejado del producido por el SDS 5%, en la liberación de IL-8 de 22.73 ± 4.67 , 19.76 ± 0.18 y 21.50 ± 3.99 , respectivamente. El resto de las cremas testadas no generó ningún incremento remarcable en la liberación de esta interleuquina (datos no mostrados). En cuanto a la interleuquina 6, el control negativo liberó 6.14 ± 0.51 ng/ml, mientras que en el control positivo (SDS) se produjo un aumento significativo en la liberación hasta los 34.06 ± 3.52 ng/ml. Las cremas 3 y 5 mostraron un ligero aumento no significativo en la liberación de esta interleuquina (9.31 ± 0.64 ng/ml y 8.08 ± 0.73 ng/ml, respectivamente), pero muy lejos de la liberación obtenida por los tejidos tratados con SDS 5%. Las cuatro cremas restantes no produjeron ningún incremento notable (datos no mostrados).

En este mismo modelo, Phenion® FT, se observó que tras 4h de exposición y 24h de incubación, la totalidad de los 6 compuestos producían un incremento en la liberación de IL-1 α respecto al control negativo, aunque no significativo; a diferencia del SDS, que generaba un aumento significativo en la liberación de esta interleuquina. (Fig. 7).

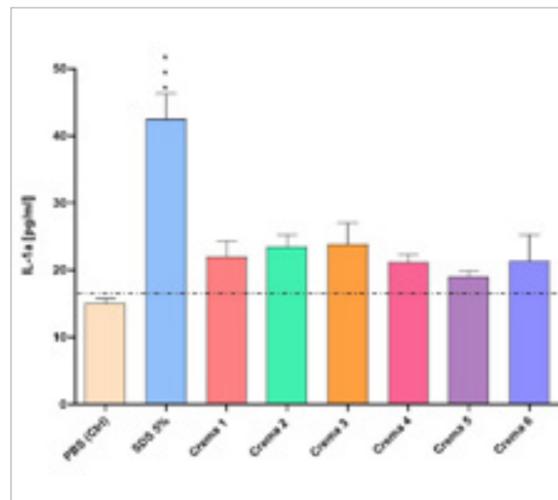


Figura 7. Comparación de los niveles de liberación de IL-1 α en modelo de piel 3D Phenion® Full-Thickness tras su exposición a compuestos irritantes (SDS 5%, ácido acético $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $20\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y $200\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y (B) a las 6 cremas durante 4h y una incubación posterior de 24h (* diferencias respecto al control negativo (PBS)).

Discusión

En los últimos años se han puesto todos los esfuerzos en el desarrollo de métodos alternativos a la experimentación animal para la evaluación del potencial irritante de las formulaciones cosméticas. Por esta razón, en este trabajo se evaluaron los diferentes biomarcadores de irritación, tras la aplicación de distintas cremas, en 3 modelos *in vitro*, con niveles de complejidad progresiva: queratinocitos en monocapa, epidermis reconstruida SkinEthic™ RHE y modelo de piel completa Phenion® Full-Thickness, con la finalidad de estudiar el potencial irritante de dichas formulaciones cosméticas, y comparar estos resultados con los datos registrados de cosmetovigilancia para establecer una posible correlación entre estos datos y los biomarcadores *in vitro*. Para este propósito, se empleó como control positivo el SDS al 5%, establecido por la OECD en la guía TG 439 para determinar el potencial de irritación cutánea *in vitro*. Se empleó además como control positivo adicional el ácido acético, compuesto irritante utilizado en la guía TG 431 para la determinación de corrosión *in vitro*.

En este estudio, se observó que una menor complejidad tisular conllevaba una mayor susceptibilidad a los compuestos irritantes. Así, por ejemplo, para una misma concentración de ácido acético ($2\mu\text{g}/\mu\text{l}$) la viabilidad en los cultivos monocapa de queratinocitos era menor del 2%, mientras que en los modelos de piel 3D, era superior al 90%. Asimismo, para una misma concentración de irritante (SDS o ácido acético) y mismo tiempo de exposición, el modelo Phenion® FT presentaba siempre viabilidades mayores que el modelo SkinEthic™ RHE.

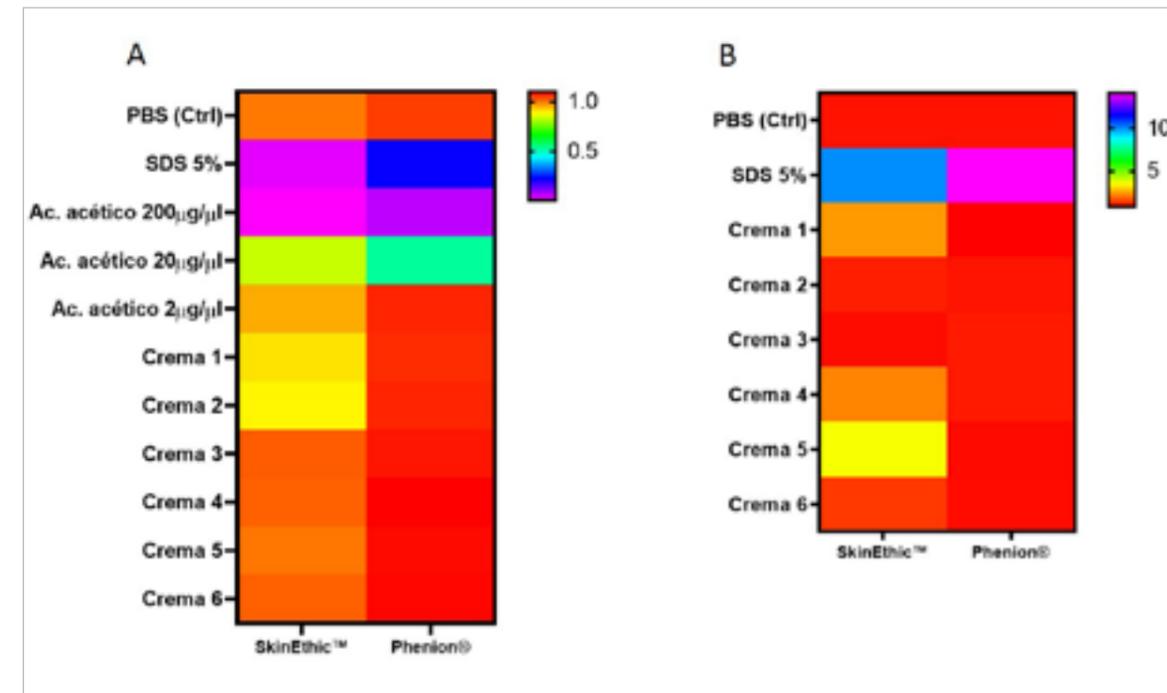


Figura 8. (A) Comparación de la viabilidad usando los modelos de piel 3D SkinEthic™ RHE y Phenion® Full-Thickness. El ratio de viabilidad se normalizó respecto al control negativo (PBS). Los colores cercanos al rojo representan una mayor viabilidad mientras que los colores cercanos al azul representan un mayor efecto citotóxico, es decir, una menor viabilidad. (B) Comparación de los niveles de secreción de IL-1 α en los modelos de piel 3D SkinEthic™ RHE y Phenion® Full-Thickness. Los niveles de secreción relativos se normalizaron respecto al control negativo (PBS). Los colores cercanos al rojo denotan que no hay cambios apreciables respecto al control negativo. Los colores cercanos al verde representan un incremento en la liberación de IL-1 α 5 veces superior al control negativo. Los colores cercanos al azul o violeta representan un incremento en la liberación de IL-1 α 10 veces o más respecto al control negativo.

Esto estaba en línea con lo esperable. El modelo de piel reconstruida 3D SkinEthic™ RHE está compuesto de queratinocitos bien diferenciados que simulan la composición natural de la epidermis, esto proporciona una cierta función de barrera que está ausente en el cultivo de células monocapa. El modelo Phenion® FT crece en complejidad al estar compuesto de queratinocitos y fibroblastos diferenciados formando ambas capas de la piel, dermis y epidermis, lo que, proporciona aún una barrera de protección mayor que en el caso del modelo de epidermis única.

Los análisis histológicos mostraron la composición morfológica de ambos modelos. Tanto el modelo SkinEthic™ RHE como el modelo Phenion® FT presentaban las capas características de la epidermis: estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso y por último un estrato córneo bien diferenciado. La capa córnea está compuesta de corneocitos, queratinocitos denucleados que en su trayectoria hacia la capa más externa de la epidermis se cargan de queratina. Esta capa está metabólicamente inactiva y su función es la de ejercer como barrera protectora de la piel frente a agentes externos, lo que la convierte en la primera línea de defensa del organismo (Biga et al., 2019). Es, por lo tanto, un elemento clave en la generación de

modelos 3D de piel reconstruida. El modelo Phenion® FT, además de una epidermis altamente estructurada, presentaba una capa dérmica, constituida por fibroblastos embebidos en una matriz colagenizada. Se observó que en los tejidos tratados con SDS 5% el estrato córneo sufría cierto daño con desprendimiento de células. En el modelo SkinEthic™ RHE, además, se pudo observar cambios en el estrato granuloso, con una importante pérdida de queratinocitos. Esto puso de manifiesto, de nuevo, que la mayor complejidad en el modelo Phenion® FT le aporta mayor protección frente a agentes irritantes. Bien es cierto que, en ambos modelos, el uso de SDS 5% generó cambios morfológicos, pero se mantuvo la estructura tisular, mientras que, en el caso de los cultivos en monocapa, el tratamiento con SDS al 0,2% generaba la muerte total de las células y su pérdida.

Por lo tanto, los modelos de piel reconstruida 3D, especialmente el modelo Phenion® FT, exhiben más características morfológicas y pueden proporcionar datos más precisos para la evaluación de la toxicidad cutánea de compuestos cosméticos que los cultivos celulares en monocapa. Los resultados en monocapa permiten determinar si un compuesto es capaz de causar daño celular y, por lo tanto, irritación, pero no determina si el compuesto

puede penetrar en el estrato córneo de la epidermis para ejercer sus efectos irritantes (Gibbs, 2009).

Para determinar el efecto irritante de los compuestos cosméticos de uso tópico se utilizó en primer lugar un cultivo en monocapa de queratinocitos primarios humanos. Esto permitió determinar, *in vitro*, desde el nivel menos complejo, el potencial citotóxico de los seis compuestos cosméticos. Se utilizaron las concentraciones 1%, 0.1% y 0.025% de las cremas y una concentración de SDS de 0.2% como control positivo, similares a las utilizadas en otros ensayos previos (Ward et al., 1998) (Zanoni et al., 2014) (Lu et al., 2017) (Hwang et al., 2018) (Wei et al., 2020) que pretendían simular el efecto *in vitro* que ejerce un compuesto al 100% sobre la piel. La totalidad de las cremas, exceptuando la 3, presentaban una viabilidad mayor del 50% al 0.1% y 0.025%. Se consideró, por lo tanto, que las cremas 1, 2, 4, 5 y 6 no presentaban potencial citotóxico a nivel de cultivo celular en monocapa. En el caso de la 3, sí presentaba cierto potencial citotóxico (viabilidad <50%).

A continuación, se procedió a la determinación del posible potencial irritante de los 6 cosméticos de uso tópico en modelos 3D de piel reconstruida. Se utilizó en primer lugar el modelo SkinEthic™ RHE, avalado por la guía 439 de la OECD para la prueba de irritación *in vitro* (OECD, 2019). Por otra parte, se utilizó el modelo Phenion® FT, que a diferencia del modelo de la marca Episkin® no está recogido en las guías de la OECD pero tiene referencias de su alta calidad y reproducibilidad (Ackermann et al., 2010) (Mewes et al., 2007). Para este modelo, en un primer momento se utilizaron los tiempos utilizados para el modelo SkinEthic™ RHE, sin embargo, se observó que esta metodología no era la adecuada para la determinación de los posibles efectos citotóxicos de los compuestos cosméticos, quedaba patente que el modelo Phenion® FT, con capa epidérmica y dérmica, ofrecía una mayor función protectora que el modelo de epidermis única, SkinEthic™ RHE. Los ensayos de viabilidad en estos tejidos determinaron que ninguna de las 6 cremas testadas presentaba efectos citotóxicos, ya que sus viabilidades eran todos los casos superiores al 80% y en la mayoría de los casos cercanas al 100%.

Los análisis histológicos realizados tras la exposición de los tejidos con los compuestos cosméticos, para ambos modelos, mostraron que no se producían cambios en la morfología tisular debido a la aplicación de las cremas. Lo que confirma los resultados obtenidos tras los ensayos de viabilidad.

Por lo tanto, se determinó que ninguno de los 6 cosméticos de uso tópico producía efectos citotóxicos sobre la piel *in vitro* y se consideraron no irritantes.

Por otro lado, se decidió estudiar la respuesta inflamatoria frente a las cremas, en los distintos modelos de irritación cutánea. La respuesta inflamatoria, es uno de los eventos iniciales antes de que se observe daño en la piel (Gibbs, 2009). Para que un compuesto sea irritante, primero debe penetrar el estrato córneo y alcanzar las capas epidérmicas, por lo que los queratinocitos juegan papeles cruciales en la vigilancia inmune de la epidermis (Steinhoff et al., 2001). Así pues, en este estudio se decidió hacer un primer cribado en monocapa de queratinocitos para determinar los eventos inflamatorios desencadenados por las cremas. En respuesta al estrés físico o químico, los queratinocitos producen y liberan diversas citocinas inflamatorias, entre ellas, IL-1 α e IL-8, desempeñan papeles críticos en la epidermis: La IL-1 α se produce constitutivamente en los queratinocitos, se libera como respuesta primaria a diversos estímulos e induce la liberación adicional de mediadores secundarios, como la IL-8, que promueve la migración de células dendríticas y el reclutamiento de monocitos y neutrófilos como pasos clave en la fase de inicio de la inflamación cutánea (Coquette et al., 2003). Por esta razón, se decidió estudiar la citoquina IL-8, como respuesta inflamatoria secundaria en monocapa. Los resultados mostraron que las cremas no produjeron aumentos significativos de liberación de IL-8 con respecto al control, demostrando que la inflamación producida por las cremas en los queratinocitos fue mínima, y en consistencia con los resultados obtenidos para la viabilidad.

El potencial inflamatorio de las cremas se estudió también en los modelos comerciales de epidermis reconstruida SkinEthic™ RHE y de piel completa Phenion® FT. En este caso, se estudió como citoquina responsable del inicio de la inflamación, la IL-1 α , por estar incluida en los protocolos de validación para equivalentes epidérmicos de la ECVAM (Spielmann et al., 2007). Además, se ha demostrado su validez para la medida del estado inflamatorio en diversos modelos 3D (Welss et al., 2004), incluso su correlación con la medida del parámetro TEWL en ensayos *in vivo* (Walters et al., 2016). La liberación de IL-1 α de los queratinocitos activados puede actuar como un inductor de IL-6 e IL-8 en fibroblastos dérmicos, siendo esta inducción de dos a tres órdenes de magnitud más que en comparación con los niveles producidos por los queratinocitos (Boxman et al., 1996). Por tanto, se estudiaron también IL-8, como citoquina secundaria con fuertes efectos quimiotácticos sobre neutrófilos y linfocitos polimorfonucleares, así como la IL-6, una citocina pleiotrópica que influye como potente factor de diferenciación de células B y estimula la proliferación de queratinocitos (Grossman et al., 1989).

En primer lugar, se observó que en el modelo de epidermis SkinEthic™ RHE se produjo un ligero aumento en la

producción de IL-1 α frente a la exposición de las cremas 1,4 y 5, aunque este aumento no fue significativo con respecto al control. No obstante, cuando se testaron las cremas en el modelo de piel completa Phenion® FT, se demostró que estas no indujeron un aumento en la producción de IL-1 α tras 42 minutos de exposición. Sin embargo, tras aumentar el tiempo a 4h, la liberación de IL-1 α incrementó ligeramente, aunque estos incrementos no fueron estadísticamente significativos. Por tanto, se concluyó que en el modelo que más se asemeja a la estructura de la piel *in vivo*, la respuesta inflamatoria primaria inducida por las cremas testadas fue prácticamente nula.

En el caso de las citoquinas IL-6 y IL-8 en el modelo SkinEthic™ RHE (datos no mostrados), los niveles de dichas citoquinas no permitieron observar diferencias entre las distintas condiciones. Los resultados obtenidos para IL-6 concuerdan con los resultados previamente publicados: de acuerdo con distintos autores, la IL-6 es producida por fibroblastos en la dermis y se libera después de la estimulación de IL-1 α (Welss et al., 2004). Varios estudios que usaron cultivos de piel *in vitro* demostraron que la citocina secundarias IL-6 se liberaba solo en presencia de fibroblastos en los modelos de piel de espesor completa (Boxman et al., 1996) (Bernhofer et al., 1999) (Ponec and Kempenaar, 1995), por lo que tiene sentido, que no se detectaran diferencias en los niveles de IL-6 del modelo SkinEthic™ RHE empleado en este estudio.

En cuanto a IL-8, Bernhofer et al. observó en equivalentes epidérmicos, que no había secreción de dicha citoquina en respuesta a la irritación producida tras la aplicación tópica de varias cremas faciales, viendo además que los modelos de piel de espesor total secretaban entre 100- 150 veces más IL-8 que los equivalentes de epidermis sola. No obstante, otros autores describieron la liberación de IL-8 tras el tratamiento de equivalentes epidérmicos (SkinEthic™ y EpiDerm) con IL-1 α humana recombinante (Welss et al., 2004) (Coquette et al., 2003). Nuestros resultados ponen en duda la medida de IL-8 como parámetro discriminatorio de la irritación en modelos de epidermis sola, puesto que los resultados obtenidos por distintos autores no son consistentes.

En contraposición, el modelo de piel completa Phenion® FT demostró una respuesta inflamatoria mucho más compleja, probablemente debido a su componente dérmico y en consecuencia a la intercomunicación entre los queratinocitos y fibroblastos presentes. Además de la producción de la citoquina primaria IL-1 α , se pudo determinar los efectos producidos por las cremas en cuanto a la liberación de las citoquinas secundarias IL-6 y IL-8. En este sentido, solo las cremas 3, 5 y 6 mostraron un ligero aumento de la producción de IL-8 con respecto al control, así como las cremas 3 y 5 de IL-6, pero estos niveles no

se acercaron a los del control positivo, demostrando una vez más la inocuidad de las cremas testadas en referencia a la inflamación.

Los resultados de la correlación entre los datos obtenidos de los diferentes biomarcadores *in vitro* y los datos de cosmetovigilancia muestran que la variable *il1_42min_phenion* (cantidad de interleucinas de tipo I liberadas a los 42 minutos medidas en el tipo de piel artificial Phenion), resulta significativa en el modelo de regresión con una confianza del 90%, presentando una correlación positiva con los datos de cosmetovigilancia. Es decir, que a mayor cantidad de interleucinas de tipo I liberadas en las pieles artificiales, se observa un mayor número de incidencias.

Hasta donde se conoce, este es el primer estudio que evalúa el potencial irritativo de productos cosméticos ya en el mercado en España mediante el uso de métodos alternativos *in vitro* y en el que se hace comparativa con datos de cosmetovigilancia. Estos métodos de piel reconstruida representan un gran avance en la investigación cosmética, ya que permite la obtención de datos precisos sobre la toxicidad de compuestos o formulaciones previo a la determinación de la irritación en seres humanos. Por lo tanto, estas alternativas podrían ser utilizadas de manera rutinaria durante la elaboración de productos cosméticos utilizando como guía los datos previos de cosmetovigilancia para establecer la idoneidad de los biomarcadores a utilizar.

Agradecimientos

Ministerios de Ciencia e Innovación, en el ámbito CDTI. "Nueva metodología experimental para ensayos en piel artificial" ref. ARTSKIN IDI-20190271.

Bibliografía

- Ackermann, K., Borgia, S.L., Korting, H.C., Mewes, K.R., Schäfer-Korting, M., 2010. The Phenion full- thickness skin model for percutaneous absorption testing. *Skin Pharmacol. Physiol.* 23, 105– 112. <https://doi.org/10.1159/000265681>
- Alejandro, A., García-Bilbao, A., Aristimuño, C., 2014. Avances en la evaluación de la sensibilización dérmica mediante métodos alternativos | Revista de Toxicología de AETOX. URL <http://rev.aetox.es/wp/index.php/3122-4/> (accessed 4.22.20).
- Bernhofer, L.P., Seiberg, M., Martin, K.M., 1999. The Influence of the Response of Skin Equivalent Systems to Topically Applied Consumer Products by Epithelial–Mesenchymal Interactions. *Toxicol. In Vitro* 13, 219–229. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(98\)00087-3](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(98)00087-3)

Biga, L.M., Dawson, S., Harwell, A., Hopkins, R., Kaufmann, J., LeMaster, M., Matern, P., Morrison-Graham, K., Quick, D., Runyeon, J., 2019. 5.1 Layers of the Skin, in: Anatomy & Physiology. OpenStax/Oregon State University.

Boxman, I.L., Ruwhof, C., Boerman, O.C., Löwik, C.W., Ponec, M., 1996. Role of fibroblasts in the regulation of proinflammatory interleukin IL-1, IL-6 and IL-8 levels induced by keratinocyte-derived IL-1. Arch. Dermatol. Res. 288, 391–398. <https://doi.org/10.1007/BF02507108>

Coquette, A., Berna, N., Vandenbosch, A., Rosdy, M., De Wever, B., Poumay, Y., 2003. Analysis of interleukin-1 α (IL-1 α) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in in vitro reconstructed human epidermis for the prediction of in vivo skin irritation and/or sensitization. Toxicol. In Vitro 17, 311–321. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(03\)00019-5](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00019-5)

Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O., 1944. Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. J. Pharmacol. Exp. Ther. 82, 377–390.

Gibbs, S., 2009. In vitro Irritation Models and Immune Reactions. Skin Pharmacol. Physiol. 22, 103–113. <https://doi.org/10.1159/000178869>

Grossman, R.M., Krueger, J., Yourish, D., Granelli-Piperno, A., Murphy, D.P., May, L.T., Kupper, T.S., Sehgal, P.B., Gottlieb, A.B., 1989. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86, 6367–6371. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6367>

Hwang, J., Park, H., Choi, D.W., Nam, K.T., Lim, K.-M., 2018. Investigation of dermal toxicity of ionic liquids in monolayer-cultured skin cells and 3D reconstructed human skin models. Toxicol. In Vitro 46, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.09.025>

Lu, B., Miao, Y., Vigneron, P., Chagnault, V., Grand, E., Wadouachi, A., Postel, D., Pezron, I., Egles, C., Vayssade, M., 2017. Measurement of cytotoxicity and irritancy potential of sugar-based surfactants on skin-related 3D models. Toxicol. In Vitro 40, 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.02.002>

Mewes, K.R., Raus, M., Bernd, A., Zöller, N.N., Sättler, A., Graf, R., 2007. Elastin expression in a newly developed full-thickness skin equivalent. Skin Pharmacol. Physiol. 20, 85–95. <https://doi.org/10.1159/000097655>

OECD, 2019. Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method [WWW Document]. URL https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-439-in-vitro-skin-irritation-reconstructed-human-epidermis-test-method_9789264242845-en (accessed 4.22.20).

OECD, 2002. Test No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion [WWW Document]. URL <https://doi.org/10.1787/9789264070622-en> (accessed 4.22.20).

Pellevoisin, C., Bouez, C., Cotovio, J., 2018. 1 - Cosmetic industry requirements regarding skin models for cosmetic testing, in: Marques, A.P., Pirraco, R.P., Cerqueira, M.T., Reis, R.L. (Eds.), Skin Tissue Models. Academic Press, Boston, pp. 3–37. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810545-0.00001-2>

Ponec, M., Kempenaar, J., 1995. Use of human skin recombinants as an in vitro model for testing the irritation potential of cutaneous irritants. Skin Pharmacol. Off. J. Skin Pharmacol. Soc. 8, 49–59. <https://doi.org/10.1159/000211330>

Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J.H., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I., Zuang, V., 2007. The ECVAM International Validation Study on in Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. Altern. Lab. Anim. 35, 559–601. <https://doi.org/10.1177/026119290703500614>

Steinhoff, M., Brzoska, T., Luger, T.A., 2001. Keratinocytes in epidermal immune responses. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 1, 469–476. <https://doi.org/10.1097/01.all.0000011062.60720.e3>

Wahlberg, J.E., 1996. Clinical overview of irritant dermatitis. PGM Van Valk HI Maibach Eds 1–6.

Walters, R.M., Gandolfi, L., Mack, M.C., Fevola, M., Martin, K., Hamilton, M.T., Hilberer, A., Barnes, N., Wilt, N., Nash, J.R., Raabe, H.A., Costin, G.-E., 2016. In Vitro Assessment of Skin Irritation Potential of Surfactant-based Formulations by Using a 3-D Skin Reconstructed Tissue Model and Cytokine Response. Altern. Lab. Anim. 44, 523–532. <https://doi.org/10.1177/026119291604400611>

Ward, R.K., Hubbard, A.W., Sulley, H., Garle, M.J., Clothier, R.H., 1998. Human keratinocyte cultures in an in vitro approach for the assessment of surfactant-induced irritation. Toxicol. In Vitro 12, 163–173. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(97\)00098-2](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(97)00098-2)

Wei, Z., Liu, X., Ooka, M., Zhang, L., Song, M.J., Huang, R., Kleinstreuer, N.C., Simeonov, A., Xia, M., Ferrer, M., 2020. Two-Dimensional Cellular and Three-Dimensional Bio-Printed Skin Models to Screen Topical-Use Compounds for Irritation Potential. Front. Bioeng. Biotechnol. 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00109>

Welss, T., Basketter, D.A., Schröder, K.R., 2004. In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. Toxicol. In Vitro 18, 231–243. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2003.09.009>

Zanoni, T.B., Tiago, M., Faião-Flores, F., de Moraes Barros, S.B., Bast, A., Hageman, G., de Oliveira, D.P., Maria-Engler, S.S., 2014. Basic Red 51, a permitted semi-permanent hair dye, is cytotoxic to human skin cells: Studies in monolayer and 3D skin model using human keratinocytes (HaCaT). Toxicol. Lett. 227, 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.03.007> ●

Expresiones sin preocupaciones: rutas pre- y postsináptica

Miriam Mateu, Andrea Esplugas, Ariadna Grau-Campistany, Silvia Pastor y Patricia Carulla

LipoTrue, S.L.

La dificultad para poder transmitir nuestras emociones mediante comunicación no verbal, conlleva a exagerar las expresiones faciales. A partir del diseño *in silico* se ha obtenido un péptido novedoso (INCI: Acetyl Hexapeptide-1) que actúa tanto en la vía presináptica como en la postsináptica para mitigar las líneas de expresión generadas.

Introducción

Dada la “nueva normalidad” en la que nos encontramos, la dificultad para poder transmitir nuestras emociones mediante comunicación no verbal, conlleva a exagerar las expresiones faciales y a una mejora de la articulación de las palabras para intentar superar esta. Un repetido exceso de contracciones musculares puede resultar en la aparición precoz de las arrugas de expresión, también conocidas popularmente como líneas de expresión

La contracción muscular está controlada por impulsos del sistema nervioso central a través de las uniones neuromusculares (NMJ). Las neuronas reciben señales químicas que producen cambios en el potencial de membrana de éstas (despolarización). Cuando la despolarización es lo suficientemente grande, se convierte en un potencial de acción que se propaga a lo largo de los axones de la neurona. Entonces, un influjo de Ca²⁺ desencadena la fusión de las vesículas secretoras, llenas de neurotransmisores, con la membrana plasmática. Esta fusión está mediada por la acción coordinada de proteínas de la familia SNARE (sintaxina, VAMP y SNAP-25) y la proteína Munc18-1¹.

Munc18-1 se une a la sintaxina ayudando a iniciar el ensamblaje del complejo SNARE obligando a la vesícula a acercarse a la membrana neuronal para su fusión^{1,2}. Se conoce que Munc18-1 inicia y actúa sobre los intermedios de configuración del complejo SNARE para acompañar y estabilizar su ensamblaje³. Así mismo también se

ha teorizado que media en el acoplamiento y la fusión de vesículas e incluso está involucrado en la cinética de los poros de fusión².

Después de la fusión, el neurotransmisor acetilcolina (ACh) es liberado en la sinapsis y viaja a la membrana muscular para unirse con su receptor agrupado (AChR) y desencadenar la vía postsináptica. La agrupación de AChR es inducida por el proteoglicano agrina que se une al receptor transmembrana LRP4 activando el receptor de quinasa específico del músculo (MuSK) que, junto con la proteína rapsina asociada a AChR, causa la agrupación de AChR⁴. La rapsina también une los AChR con el complejo asociado a la utrofina, que parece ser necesario para la estabilización de los AChR⁵.

La interacción ACh y AChR abre un canal catiónico en el AChR que provoca una despolarización localizada y desencadena posteriormente un potencial de acción. Esta despolarización desencadena la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico al sarcoplasma donde se une a la proteína troponina desbloqueando así los sitios de unión de miosina en la actina⁶. Si hay suficiente ATP, la miosina se une a la actina para comenzar el entrecruzamiento y su deslizamiento (el sarcómero se acorta y el músculo se contrae). En ausencia de calcio, esta unión no se produce, por lo que la presencia de calcio libre es un regulador clave de la contracción muscular⁷.

Los tratamientos con toxina botulínica han convivido con ingredientes cosméticos que actúan en las vías