

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA



Departament de Fisiologia

Programa de Doctorado en Fisiología

***Efecto protector del pterostilbeno frente a la
carcinogénesis cutánea inducida por
radiación ultravioleta:
mecanismos moleculares implicados***

Tesis Doctoral presentada por:

Joan Antoni Sirerol Talens

Dirigida por:

José María Estrela Arigüel

Ángel Luis Ortega Valero

Febrero 2024

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA



Departament de Fisiologia

Programa de Doctorado en Fisiología

***Efecto protector del pterostilbeno frente a la
carcinogénesis cutánea inducida por
radiación ultravioleta:
mecanismos moleculares implicados***

Tesis Doctoral presentada por:

Joan Antoni Sirerol Talens

Dirigida por:

José María Estrela Arigüel

Ángel Luis Ortega Valero

Febrero 2024

Don **José María Estrela Arigüel**, Catedrático del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València.

Don **Ángel Luis Ortega Valero**, Profesor Titular del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València.

CERTIFICA/N:

Que la presente memoria, titulada “ **Efecto protector del pterostilbeno frente a la carcinogénesis cutánea inducida por radiación ultravioleta: mecanismos moleculares implicados**”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Don **Joan Antoni Sirerol Talens**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firma/n el presente certificado en Valencia, a febrero de 2024.

Firmado por JOSE
MARIA ESTRELA
ARIGUEL -
NIF:***8040** el día
08/03/2024 con un
certificado emitido
por ACCVCA-120

Fdo. José María Estrela Arigüel

ANGEL
LUIS|
ORTEGA|
VALERO

Firmado
digitalmente por
ANGEL LUIS|
ORTEGA|VALERO
Fecha: 2024.03.08
11:40:40 +01'00'

Fdo. Ángel Luis Ortega Valero

A la meua família. Sense vosaltres, res seria possible!

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis, José María Estrela Arigüel y Ángel Luis Ortega Valero, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y participar en este proyecto, por orientarme, motivarme y por estar disponibles en todo momento.

A continuación, quisiera dedicar unas palabras a varios compañeros y compañeras (espero acordarme de todos y no dejarme a nadie, aunque va a ser difícil, pues este camino del doctorado empezó ya hace mucho tiempo), algunos de los cuales han llegado a convertirse en amigos.

Julián Carretero, Miguel Asensi y, más tarde, Salva Mena, los otros jefes del grupo. Ha sido un placer haber trabajado y aprendido con vosotros, siempre atentos y dispuestos a resolver cualquier duda o aclaración; y también a esos “tardeos” de conversaciones insuperables. ¡Sois muy grandes!

María e Inés, la pareja inseparable del “lab”. Parece ayer cuando bajé por primera vez a cultivos celulares con María... Inés, a ti es más difícil verte, por la distancia; pero, María, sabes que nos hemos encontrado por sorpresa en algún festival, seguro que no es el último. Gracias, chicas, por vuestra ayuda.

JuanLu y Chabeli, coincidimos en el Máster, y también en el laboratorio. Ha sido un placer.

Dan, ¡eres un tío grande! Siempre con nuestros “piques” sanos, pero sabes que eres un buen amigo.

Salva Aparisi, Iván, y también Salva Pérez y Sergio (antes llamados “los de Sastre”), con vosotros las risas están aseguradas. ¡Gracias por hacer más ameno el tiempo en el “lab”! Mención especial del Arenal Sound al que fuimos juntos Sergio, Iván y yo (lo de volver ya es otra historia... jajaja).

Lourdes, saps que eres molt especial, i una gran amiga; amb tú sobren les paraules!

Eva i Cristina, sou genials, xiques!

A todos los demás con los que he coincidido en esta etapa, también me acuerdo de vosotros, eh.

Gracias a todos por haberme hecho formar parte de esta gran familia de fisiólogos/as, por esas tardes de jueves y por esas comidas/meriendas/cenas de Navidad o verano, que acababan cuando ya no quedaba nada por cerrar. Sois muy grandes.

I, finalment, a la meua família. Només tinc paraules d'agraïment per a vosaltres, ja ho sabeu! Papi, Mami, Anna, Roger, el vostre recolzament, paciència, comprensió i suport sempre ha sigut, és i serà un pilar fonamental i valuós en la meua vida! Verónica, mil gràcies pel suport en aquesta última etapa. Vos estime com no es podeu imaginar!

Índice

Índice

Agradecimientos.....	5
Índice	8
Figuras.....	13
Tablas.....	16
Abreviaturas y siglas	18
Resumen	21
Abstract	23
1. Introducción	25
1.1.Cáncer	25
1.2.La Piel.....	31
1.2.1.Estructura y características	31
1.2.2.Función de la piel.....	42
1.3.El Cáncer de Piel	44
1.3.1.El cáncer de piel como problema clínico	44
1.3.2.Etiología del cáncer de piel: Radiación Ultravioleta y estrés oxidativo	45
1.3.2.1.Radiación Ultravioleta.....	45
1.3.2.2.Estrés oxidativo	53
1.3.3.Tipos de cáncer de piel.....	61
1.3.3.1.Melanoma.....	62
1.3.3.2.No melanoma	68
1.3.3.2.1.Carcinoma de células basales	69

1.3.3.2.2.Carcinoma de células escamosas.....	73
1.4.Polifenoles naturales.....	78
1.4.1.Origen, clasificación y función natural.....	78
1.4.2.Polifenoles y salud.....	80
1.4.2.1.Efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores.....	81
1.4.2.2.Efectos anticancerígenos.....	82
1.4.2.3.Efectos fotoprotectores.....	85
2. Hipótesis y Objetivos.....	88
3. Materiales y Métodos.....	90
3.1.Modelos animales: ratones SKH-1.....	90
3.2.Ensayos in vitro: células HaCaT.....	91
3.2.2.Ensayos in vitro: citotoxicidad del pterostilbeno.....	92
3.2.3.Ensayos in vitro: inmunotinción de fluorescencia de Nrf2.....	92
3.3.Preparación de liposomas vacíos, con pterostilbeno y resveratrol para administración tópica.	93
3.4.Absorción UV, determinación del FPS y de TEWL.....	95
3.5.Tratamiento con polifenoles e irradiación con UVB.	98
3.6.Medición del edema cutáneo tras la exposición a radiación UVB. ...	99
3.7.Recolección de muestras de piel.....	100
3.8.Análisis histopatológico cutáneo.....	100
3.9.Homogeneización de muestras de piel.....	101
3.10.Medida capacidad antioxidante.....	102
3.11.Medida de actividades enzimáticas.....	104
3.12.Extracción de polifenoles de la piel y plasma y cuantificación mediante espectrometría de masas.....	108

3.13. Medida de peroxidación lipídica mediante determinación de niveles de isoprostanos	109
3.14. Medición de carbonilación de proteínas	111
3.15. Determinación de GSH	111
3.16. Evaluación del daño oxidativo al ADN	112
3.17. Extracción y cuantificación de proteínas	114
3.18. Expresión génica antioxidante	116
3.19. Western Blot.....	119
3.20. Análisis estadístico	120
4. Resultados.....	122
4.1. Efectos del Pter y el Resv frente a la exposición aguda a radiación UVB	122
4.2. Análisis de la capacidad de los polifenoles de actuar como filtro físico	129
4.3. El Pter, pero no el Resv, previene la carcinogénesis cutánea inducida por la exposición crónica a radiación UVB	131
4.4. Análisis de la capacidad antioxidante endógena polifenólica	135
4.5. Determinación del daño oxidativo.....	136
4.5.1. Efecto sobre proteínas.....	136
4.5.2. Efectos sobre lípidos	137
4.5.3. Efectos sobre el ADN	138
4.6. Análisis de las defensas antioxidantes endógenas a nivel cutáneo ..	139
4.6.1. Glutación	139
4.6.2. Análisis de expresión y actividad enzimática antioxidante	140

4.7. Análisis farmacocinético cutáneo y plasmático del Pter tras su administración tópica	143
4.8. Citotoxicidad del Pter in vitro en células HaCaT	145
4.9. Mecanismo molecular implicado en la acción antioxidante del pterostilbeno.....	146
5. Discusión	151
6. Conclusiones.....	158
7. Bibliografía	160

Figuras

Figuras

Figuras Introducción:

- Figura 1. Tipos de mutaciones del ADN.
- Figura 2. Fases del ciclo celular.
- Figura 3. Mecanismo de acción de mutágenos químicos.
- Figura 4. Estratos de la epidermis (1).
- Figura 5. Estratos de la epidermis (2).
- Figura 6. Estructuras anatómicas presentes en la piel.
- Figura 7. Espectro de radiación electromagnética de la luz.
- Figura 8. Espectro de radiación electromagnética y su origen.
- Figura 9. Efectos biológicos en la piel de la radiación ultravioleta.
- Figura 10. Grupos de fototipos pigmentarios según la escala de Fitzpatrick.
- Figura 11. Actividades catalítica y peroxidativa de la Catalasa.
- Figura 12. Reacción enzimática de la Superóxido dismutasa.
- Figura 13. Estructura química del glutatión.
- Figura 14. Esquema de los mecanismos de defensa antioxidante celular.

Figuras Materiales y Métodos:

- Figura 15. Ecuación teórica del cálculo de FPS *in vitro*.
- Figura 16. Reacción de formación de ABTS.
- Figura 17. Fundamento kit de detección actividad Superóxido dismutasa.
- Figura 18. Fundamento kit de detección actividad GPx.
- Figura 19. Reacción de Biuret.

Figuras Resultados:

- Figura 20: Grosor del pliegue cutáneo de ratones sometidos a radiación UVB aguda.
- Figura 21: Espesor de la Epidermis de ratones sometidos a radiación UVB aguda.

Figura 22. Eritema en ratones tras exposición aguda a UVB.

Figura 23. Histología tras exposición aguda a UVB.

Figura 24. Valores de *TEWL*.

Figura 25. Absorbancia del Pter y el Resv.

Figura 26. Valores de FPS del Pter y del Resv.

Figura 27. Kaplan-Meier.

Figura 28. Fotos de los ratones tras exposición crónica a UVB.

Figura 29. Número promedio de tumores/ratón tras exposición crónica a UVB.

Figura 30. Histología tras exposición crónica a UVB.

Figura 31. Ensayo antioxidante Trolox.

Figura 32. Análisis de oxidación proteica.

Figura 33. Evaluación de peroxidación lipídica.

Figura 34. Determinación oxidación del DNA.

Figura 35. Cuantificación del GSH en piel.

Figura 36. Expresión génica de enzimas antioxidantes.

Figura 37. Actividad enzimática de enzimas antioxidantes.

Figura 38. Análisis farmacocinético el Pter en piel.

Figura 39. Biodisponibilidad del Pter en piel.

Figura 40. Ensayo de citotoxicidad del Pter.

Figura 41. Ensayo de activación de Nrf2 mediada por Pter en células HaCaT.

Figura 42. Ensayo de inmunofluorescencia de translocación nuclear de Nrf2 en células HaCaT.

Figura 43. Expresión de moléculas dependientes de Nrf2.

Figura 43. Expresión de moléculas dependientes de Nrf2.

Tablas

Tablas

Tablas: Materiales y Métodos:

Tabla 1. Tratamientos aplicados a los diferentes grupos experimentales de ratones.

Tabla 2: Preparación del contenido de las muestras método Trolox.

Abreviaturas y siglas

Abreviaturas y siglas

ABTS = 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]-sal de diamonio.

ADN = Ácido desoxirribonucleico.

ADNc = Ácido desoxirribonucleico complementario.

ARN = Ácido ribonucleico.

ARNm = Ácido ribonucleico mensajero.

BSA = Albúmina de suero bovino.

CAT = Catalasa.

CCB = Carcinoma de células basales.

CCE = Carcinoma de células escamosas.

COX = Ciclooxygenasa.

CSCs = Cancer Stem Cells.

DMBA = 7,12-dimetilbenz[a]antraceno.

DMSO = Dimetil sulfóxido.

EDTA = Ácido etilenodiaminetraacético.

ELA = Esclerosis lateral amiotrófica.

ERNs = Especies reactivas de nitrógeno.

FPS = Factor de Protección Solar.

GPx = Glutation peroxidasa.

GR = Glutación reductasa.

GSH = Glutación.

GSH = Glutación reducido.

GSSG = Glutación oxidado.

H₂O₂ = Agua oxigenada / Peróxido de hidrógeno.

HaCaT = línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados (del inglés, *Human Adult Low Calcium High Temperature Keratinocytes*).

LOX = Lipooxygenasa

NO = Óxido nítrico.

NOX = NADPH oxidasa

Nrf2 = nuclear factor erythroid 2-related factor 2

O₂^{•-} = Ión superóxido.

PLA2 = Fosfolipasa A2

Pter = Pterostilbeno.

Purpald = 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole (cromógeno actividad Catalasa).

Resv = Resveratrol.

ROS = Especies reactivas de oxígeno.

SLP = Supervivencia libre de progresión.

SOD1 = Superóxido dismutasa citosólica.

SOD2 = Superóxido dismutasa mitocondrial.

SOD3 = Superóxido dismutasa extracelular.

SOD = Superóxido dismutasa.

TEWL = Pérdida de agua transepidérmica (del inglés, *Transepidermal Water Loss*).

TLR = Receptor tipo Toll (del inglés, *Toll-Like Receptor*).

TPA = 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

UVB = Ultravioleta B

γGCL = γ-glutamato-cisteína ligasa

Resumen

Resumen

El objetivo de este estudio es investigar el efecto beneficioso del pterostilbeno (Pter), un polifenol natural de la familia de las fitoalexinas análogo estructural dimetilado del resveratrol (Resv), contra el daño cutáneo debido a la acción procarcinogénica de la radiación ultravioleta B (UVB). El Pter previene el aumento agudo del espesor de los pliegues, el grosor y el enrojecimiento de la piel inducido por rayos UVB (360 mJ/cm²), así como también las arrugas y la hiperplasia asociadas al fotoenvejecimiento. La aplicación tópica de Pter previno de manera muy efectiva la carcinogénesis cutánea inducida por la exposición crónica a radiación UVB (180 mJ/cm², tres dosis/semana durante 30 semanas), ya que el 90 % de los ratones sometidos al tratamiento con Pter e irradiados no desarrollaron cáncer de piel, mientras que los ratones control que fueron sometidos a radiación sin ser tratados con Pter desarrollaron un gran número de carcinomas por toda la superficie de piel. Por el contrario, estos resultados no fueron obtenidos con la aplicación tópica de Resv. Este efecto anticarcinogénico fue asociado al mantenimiento de los mecanismos de defensa antioxidantes (como por ejemplo los niveles de glutatión (GSH), enzimas antioxidantes como catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) y a una inhibición del daño oxidativo inducido por radiación UVB (usando biomarcadores como 8-hydroxy-20-deoxyguanosine, niveles de carbonilación de proteínas y niveles de isoprostanos). El mecanismo molecular subyacente responsable de estos efectos fotoprotectores mostrados por el tratamiento tópico con Pter fue evaluado mediante ensayos *in vitro* con la línea celular HaCaT (queratinocitos humanos inmortalizados (del inglés, *Human Adult Low Calcium High Temperature Keratinocytes*)) y se descubrió que el tratamiento empleado era capaz de provocar una modulación potencial de la respuesta antioxidante dependiente del factor de transcripción Nrf2.

Abstract

Abstract

The aim of our study was to investigate in the SKH-1 hairless mouse model the effect of pterostilbene (Pter), a natural dimethoxy analog of resveratrol (Resv), against procarcinogenic ultraviolet B radiation (UVB)-induced skin damage. Pter prevented acute UVB (360 mJ/cm²)-induced increase in skin fold, thickness, and redness, as well as photoaging-associated skin wrinkling and hyperplasia. Pter, but not Resv, effectively prevented chronic UVB (180 mJ/cm², three doses/week for 30 weeks)-induced skin carcinogenesis (90 % of Pter-treated mice did not develop skin carcinomas, whereas a large number of tumors were observed in all controls). This anticarcinogenic effect was associated with maintenance of skin antioxidant defenses (for example., glutathione (GSH) levels, catalase, superoxide, and GSH peroxidase activities) close to control values (untreated mice) and an inhibition of UVB-induced oxidative damage (using as biomarkers 8-hydroxy-20-deoxyguanosine, protein carbonyls, and isoprostanes). The molecular mechanism underlying the photoprotective effect elicited by Pter was further evaluated using HaCaT immortalized human keratinocytes (Human Adult Low Calcium High Temperature Keratinocytes) and was shown to involve potential modulation of the Nrf2- dependent antioxidant response.

Introducción

1. Introducción

1.1. Cáncer

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades en el cual las células proliferan descontroladamente. El cáncer se puede originar en cualquier tipo celular de los tejidos que forman el cuerpo humano y se considera un conjunto de enfermedades porque cada uno tiene unas características, particularidades, comportamiento y evolución diferentes. Las células sanas normales, tienen una serie de mecanismos celulares que regulan y controlan el crecimiento celular, permitiendo que éstas se multipliquen si todos los mecanismos celulares funcionan correctamente o, por el contrario, paralizando la división celular e induciendo la muerte celular programada, también llamada apoptosis, en aquellas células que presenten errores genéticos o una serie de características aberrantes que promuevan su entrada en apoptosis. De esta manera, el origen de un cáncer puede iniciarse por la acumulación de mutaciones (alteraciones de la secuencia normal de nucleótidos en el ADN) en una célula, mutaciones que pueden afectar a genes procarcinogénicos, aumentando su función, o a genes supresores tumorales, inhibiendo su acción. Las mutaciones pueden ser de varios tipos y se pueden clasificar según varios criterios (según sean mutaciones génicas o cromosómicas, según su naturaleza molecular, según el efecto fenotípico que ocasionan, etc.). Así pues, podemos decir que existen diversos tipos de mutaciones (rotura de simple cadena, rotura de doble cadena, cambio de un nucleótido, deleciones, duplicaciones, amplificaciones, inversiones, translocaciones, ...) y son una fuente de la variación genética además potenciales motores de la evolución, aunque es cierto que la mayor parte de las mutaciones son deletéreas ([Hanahan & Weinberg, 2011](#)).

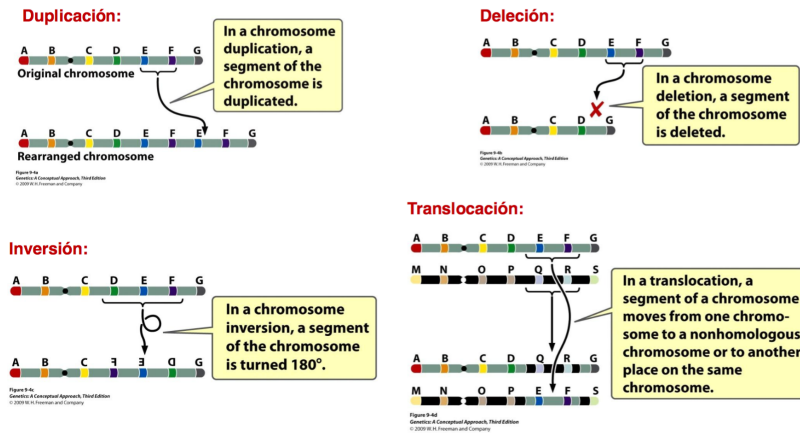


Figura 1. Tipos de mutaciones del ADN. Ejemplo esquemático de las mutaciones estructurales que puede sufrir el DNA.

Fuente: [Genetics: A Conceptual Approach. Third Edition. 2009. W. H. Freeman & Company.](#)

Definición de carcinogénesis

Un proceso neoplásico o carcinogénico se define como el proceso de formación de una masa anormal de tejido cuyo crecimiento supera al de los tejidos normales sin estar coordinado con él, persistiendo de la misma forma excesiva después de la interrupción del estímulo que desencadenó el cambio. Un proceso neoplásico puede dar lugar a tumores benignos o malignos y se desencadena debido a la aparición mutaciones en genes supresores de tumores u oncogenes clave, además de otras posibles alteraciones en el DNA (cambios epigenéticos). Si las células cancerosas permanecen agrupadas sin exceder los límites del tejido del que forman parte, constituirán un tumor benigno, que en la mayoría de los casos puede extirparse quirúrgicamente. Por otra parte, si estas células anormales tienen la capacidad de invadir tejido circundante y propagarse por tejidos que no le son propios (metástasis), formarán un tumor maligno (se podrán denominar, por tanto, células cancerosas o cancerígenas) ([Alberts, 2002](#)). Debido a que las células tumorales se pro-

pagan y se multiplican muy rápidamente, presentando una alta actividad metabólica, tienen unos requerimientos nutricionales elevados. Por este motivo, el proceso de carcinogénesis siempre está asociado a angiogénesis (Schor & Schor, 1983). La angiogénesis tumoral es un proceso complejo en el que participan una gran cantidad de proteínas distintas como, por ejemplo, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas α (PDGF α), el receptor de la insulina (IGFP), la proteína CD-31 o el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Martínez et al., 2005; Newman et al., 1990).

Cancer Stem Cells y carcinogénesis

El proceso de carcinogénesis se inicia cuando ocurre la transformación de las células normales en células madre cancerosas (Cancer Stem Cells (CSCs)), responsables de la iniciación y propagación del tumor. Las CSCs tienen ciertas características particulares que comparten con las células madre normales, pero que las diferencian de las células normales (Werbowski-Ogilvie & Bhatia, 2008). Las principales diferencias son cambios en la secuencia del DNA provocadas por la acumulación de mutaciones que impiden un correcto funcionamiento de la maquinaria que controla la división celular. El ciclo celular eucariótico se refiere a una serie de eventos que consisten en acciones secuenciales altamente reguladas que tienen lugar durante la proliferación celular. Estos pasos sucesivos son la fase S (síntesis de DNA), fase G1 (crecimiento celular), fase M (división celular) y fase G2 (en la que se comprueba la integridad del material genómico) (Hindley & Philpott, 2013). Las células malignas, suelen presentar mutaciones que reprimen genes supresores de tumores o activan oncogenes, lo que provoca cambios en la expresión de diversos genes y una desregulación del ciclo celular, que se traduce en una proliferación incontrolada y excesiva. Uno de estos genes supresores de tumores, en cuya secuencia se han encontrado una gran cantidad de mutaciones en más del 50% de tipos de cáncer, es p53 (Joerger & Fersht, 2007) (en la regulación de la función de la proteína p53 están implicadas las proteínas mdm2 y p19 INK4d (Almquist et al., 2011)). Además de la desregulación del ciclo celular otras características típicas de las CSCs son: capacidad de crecer en un microambiente prácticamente hipóxico con alteraciones en el pH (Barar, 2012; Osinsky et al., 2011; Shen et al., 2013),

independencia de otros tipos celulares para su crecimiento, resistencia a la apoptosis inducida por daños en el DNA, insensibilidad a señales anti-proliferativas, inducción de angiogénesis, capacidad ilimitada para dividirse y capacidad metastática (Azam et al., 2019; Kim et al., 2011).

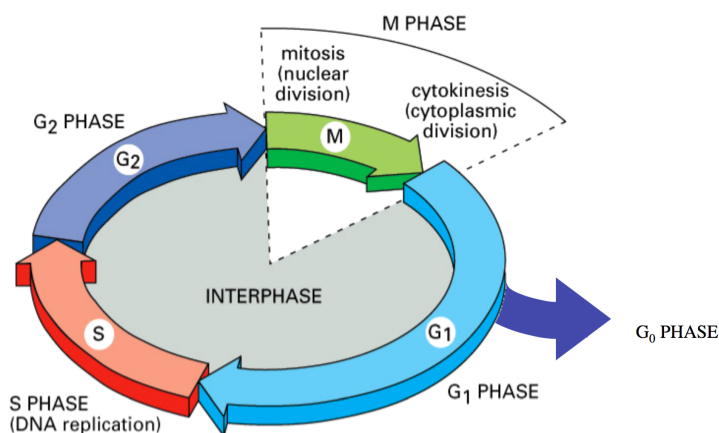


Figura 2. Fases del ciclo celular. Esquema básico de las fases del ciclo celular. Las fases del ciclo celular son la fase M, fase G₁, fase S y fase G₂, aunque la célula puede entrar en latencia y entrar en fase G₀.

Fuente: Alberts, B. et al. (2002). *Molecular biology of the cell* (G. Science., Ed. 5th ed.).

Agentes mutágenos

Un agente mutágeno se considera cualquier agente de naturaleza química, física o biológica cuya exposición puede causar mutaciones en el ADN de las células. Así pues, las mutaciones pueden ser ocasionadas por agentes internos de la célula o por agentes externos. Entre los agentes internos podemos destacar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Sobre las ROS hablaremos en apartados posteriores, pero las más importantes son el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilo (Cortés-Rojó & Rodríguez-Orozco, 2011). Por otra parte, tienen una gran importancia los agentes mutágenos externos, que se pueden diferenciar en mutágenos químicos y físicos.

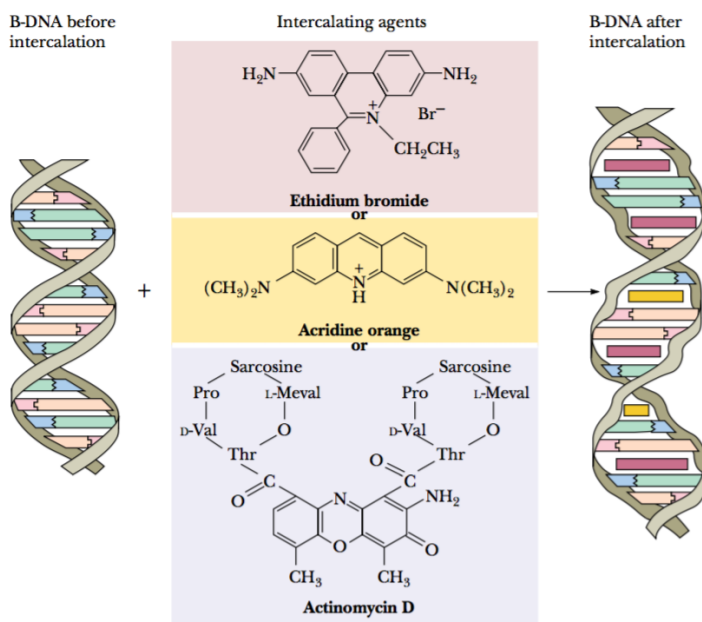


Figura 3. Mecanismo de acción de mutágenos químicos. Ejemplo esquemático del mecanismo de actuación de los mutágenos químicos denominados agentes intercalantes, que se introducen en la molécula del DNA entre las bases nitrogenadas, propiciando la aparición de mutaciones.

Fuente: [Garrett R, Grisham CM, Sabat M. Biochemistry. Cengage Learning: Andover, Hants., 2014.](#)

- Los agentes mutágenos químicos son aquellos que tienen la capacidad de modificar la estructura del ADN de manera considerable. Entre ellos podemos citar análogos de bases, agentes alquilantes, agentes deaminantes, hidroxilamina, agentes oxidantes y agentes intercalantes.
- Los agentes mutágenos físicos son radiaciones capaces de provocar cambios en la secuencia o composición del ADN. Estas radiaciones pueden ser:

- Radiaciones ionizantes: son radiaciones de alta energía capaces de desplazar electrones de los átomos y causar roturas en las uniones fosfodiéster, que pueden dar lugar a mutaciones cromosómicas. Ejemplos: rayos X, rayos gamma y rayos cósmicos.
- Radiaciones no ionizantes: Se trata principalmente de la radiación UV, que posee menor energía que las radiaciones ionizantes y no causa ionizaciones. Su energía es absorbida por las bases y causan impedimentos para la transcripción por alteraciones en la estructura. (Pierce, 2012).
- Otros factores: además de los agentes mutagénicos directos, hay otros factores que pueden influir o favorecer la aparición de mutaciones como alteraciones en la temperatura fisiológica; algunas sustancias producidas en el metabolismo celular normal; o el envejecimiento, el cual conlleva acortamiento de los telómeros, disminución de la efectividad de mecanismos de defensa celular, etc.

Hay que tener presente que existen diferentes mecanismos moleculares de reparación del DNA para evitar la aparición de mutaciones deletéreas heredables. Asimismo, las células también cuentan con un mecanismo antioxidante para evitar la aparición y los efectos perjudiciales de las ROS (Pierce, 2012).

Así pues, el hecho de conocer las mutaciones responsables del desarrollo de un tipo de cáncer nos puede permitir desarrollar dianas terapéuticas y potenciales tratamientos contra dicho proceso tumoral.

1.2. La Piel

1.2.1. Estructura y características

La piel es el órgano de mayor tamaño del cuerpo humano en cuanto a peso y superficie se refiere, ya que constituye el 16% del peso corporal aproximadamente. Es el principal elemento constituyente del sistema tegumentario, formado también por las glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas, el pelo y las uñas. La piel y el resto de elementos que conforman el sistema tegumentario recubren completamente el cuerpo humano y, a su vez, la piel se une con las mucosas del sistema digestivo, el sistema respiratorio y urogenital, además de con la conjuntiva (en los párpados). También recubre el conducto auditivo externo y recubre la parte externa de la membrana timpánica (Gartner & Hiatt).

Existen diversas clasificaciones para la piel, pero una de las más comunes es la que considera que está dividida en tres capas, la epidermis, la dermis y la hipodermis (Jensen & Proksch, 2009; Kanitakis, 2002):

1. **EPIDERMIS:**

La epidermis es la capa más externa de la piel (Farage et al., 2007; Wong et al., 2016), y aunque tiene un grosor variable, suele tener entre un espesor de 75-150 μm , siendo éste mayor en las palmas de las manos y plantas de los pies (hasta 600 μm de espesor). Está formada mayormente por epitelio estratificado queratinizado, por tanto el tipo celular mayoritario que la componen son los queratinocitos, cuyo principal fin es contribuir a la función de barrera que realiza la piel. A parte de queratinocitos, en esta capa de la piel también podemos encontrar, en menor medida, células de Langerhans, células de Merkel y melanocitos (responsables de la pigmentación de la piel) (Farage et al., 2007). Es conveniente destacar que esta población mayoritaria de queratinocitos tiene una alta tasa de renovación, ya que se renueva completamente cada 30 días aproximadamente, aunque hay diferencias entre

zonas corporales (Latkowski et al., 1999). La epidermis crece constantemente, pero mantiene siempre el mismo espesor debido a un proceso de descamación. A su vez, podemos decir que la epidermis se divide en varias capas: estrato córneo, lúcido, granuloso, espinoso y basal, de las cuales hablaremos posteriormente.

La epidermis es un sistema metabólicamente dinámico muy regulado, ya que realiza importantes funciones que explicaremos después, y por tanto tiene una gran importancia fisiológica para la salud y el correcto funcionamiento del cuerpo.

Microscópicamente, la epidermis se puede dividir en las siguientes capas o estratos, siendo la primera la más externa y la última la más interna :

a. Estrato basal (*stratum basale*): es el estrato más profundo y a veces es llamado estrato germinativo, ya que desde este estrato se van renovando continuamente las células de las distintas capas de la epidermis. Las células que hay presentes son cilíndricas, tienen núcleos con forma ovalada y se disponen en una monocapa de células cilíndricas, adheridas entre ellas mediante complejos de unión estrecha (como por ejemplo: Claudinas, Ocludinas, Zo-1, etc.) (Wong et al., 2016), siendo las únicas de la epidermis que pueden entrar en mitosis y dividirse. A medida que se forman nuevas células, las primeras se desplazan hacia las capas superiores de la epidermis progresivamente, hasta que se desprenden en la superficie cutánea; este proceso dura alrededor de 4 semanas. Tanto los melanocitos, células que sintetizan la melanina (pigmento de la piel que provoca el bronceado y que funciona como filtro solar), como las células de Merkel, células asociadas a fibras nerviosas (mecanorreceptores), que tienen un papel en la transmisión y captación de los estímulos del sentido del tacto, se encuentran en este estrato epidérmico.

b. Estrato espinoso (*stratum spinosum*): tiene entre 8 y 10 capas de células con forma poligonal, ricas en ADN (necesario para sintetizar queratina), con núcleos redondeados y citoplasma basófilo, forma irregular y, además, tienen desmosomas. En este estrato es donde se encuentran las células de Langerhans, que tienen funciones inmunológicas. Además es esta la capa de la epidermis que puede retener agua en caso de enfermedades de la piel y formar ampollas. Tiene un mayor contenido de tonofibrillas que las del estrato germinativo. Las prolon-

gaciones del citosol se asemejan a espinas, por lo que también reciben el nombre de células espinosas, justamente porque las tonofibrillas son más numerosas en dichas prolongaciones dando la forma de espinas.

c. Estrato granuloso (*stratum granulosum*): contiene células aplanadas, cuyo citoplasma contiene granulos basófilos rellenos de queratohialina, sustancia necesaria para la producción de queratina, ya que es aquí dónde se empieza el proceso de queratinización. Las células están dispuestas entre dos y cuatro capas, han empezado a degenerar y tienen concentraciones elevadas de enzimas lisosomales. Cuando los queratinocitos llegan a la última capa de este estrato las células epidérmicas mueren y al morir vierten su contenido al espacio intercelular.

d. Estrato lúcido (*stratum lucidum*): Es muy fina, formada por queratinocitos agrupados que no presentan núcleo y cuyo citoplasma está lleno de eleidina, lipoproteína precursora de la queratina, que, a su vez, impide la entrada o salida de agua. Solo se encuentra en las partes de la piel cuya grosor es relativamente considerable (ejemplo: en las palmas de las manos y las plantas de los pies).

e. Estrato córneo (*stratum corneum*): está formado por células planas queratinizadas anucleadas, también llamadas células córneas o corneocitos. Esta capa se distingue como la más gruesa y eosinófila. El estrato córneo es una capa dinámica, con una actividad metabólica alta. Su composición es de aproximadamente un 60% de proteínas estructurales, un 20% de agua y un 20% de lípidos. De su composición lipídica depende su integridad, siendo los lípidos más abundantes el colesterol, seguidos de la ceramida y los ácidos grasos libres. Tiene una función protectora, ya que participa en la inhibición de la entrada de patógenos en el cuerpo. La deshidratación de la piel, que se produce cuando tiene un menor contenido en agua del 10%, produce la pérdida de flexibilidad de este estrato, tendencia a la rotura y pérdida de su función protectora. Es conveniente destacar que todos los días se eliminan capas de corneocitos (Farage et al., 2007).

f. Estrato disyunto: es la continua descamación de las células córneas.

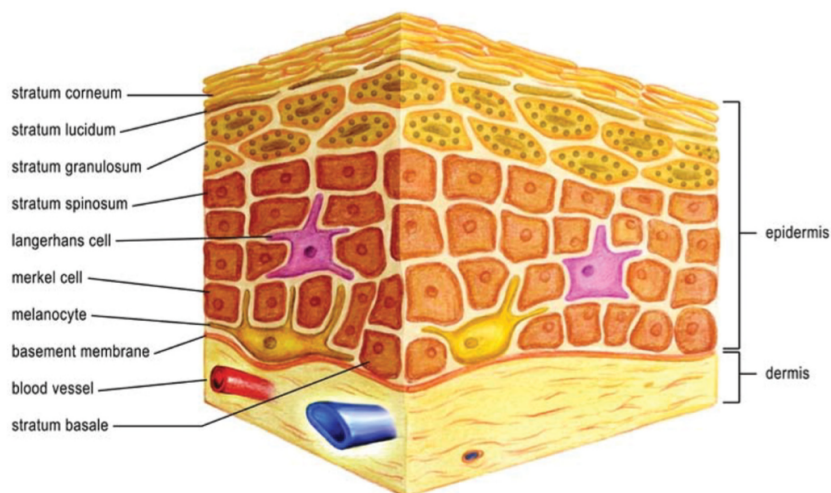


Figura 4. Estratos de la epidermis (1). Esquema ilustrativo de los cuatro estratos que forman la epidermis.

Fuente: [Farage et al., 2007. Structural characteristics of the aging skin: a review, 2007.](#)

Como se ha comentado anteriormente al citar las diferentes capas de la epidermis, ésta sufre un proceso de queratinización. Este proceso consta de una serie de cambios morfológicos y eventos metabólicos altamente regulados, el objetivo final del cual es el desarrollo de un queratinocito muerto terminalmente diferenciado (queratinocito o corneocito) que contiene filamentos de queratina, proteínas de la matriz y una membrana plasmática reforzada por proteínas con lípidos asociados a su superficie. Éste es un proceso adaptativo para lograr la función de capa protectora de la piel ([Cabral et al., 2001](#)), que sufren una gran cantidad de especies excepto los peces ([Spearman, 1973](#)). La epidermis se va renovando continuamente, desde el estrato basal que constituye la fuente celular de la epidermis. La célula que dará lugar al queratinocito, formada en el estrato basal, va progresando en las sucesivas capas hacia el exterior, madurando y degradando hasta formar un queratinocito maduro. En el primer paso, la proliferación en el estrato basal, la célula adquiere una posición suprabasal y adquiere características morfológicas del estrato espinoso. En este punto la célula ya no presenta una forma tan cúbica como en el estrato basal y adquiere cierto aspecto globuloso, tiene desmosomas glucoprotéicos que les permite la unión a queratinocitos contiguos ([Alonso & Fuchs, 2003](#)). En el

avance del proceso de queratinización y correcta maduración de los queratinocitos, éstos pierden temporalmente la función de los desmosomas para continuar el proceso hacia capas superiores, presentando el núcleo y todos los orgánulos, así como una relativamente alta tasa de actividad metabólica en los estratos basal, espinoso y granuloso. Finalmente, tras una fase intermedia con diversos cambios en el estrato lúcido, el queratinocito (también llamado corneocito o célula córnea) se ubica en la última capa epidérmica, el estrato córneo, teniendo una cierta apariencia de lámina hexagonal, en la que la membrana plasmática ha sido sustituida por una envoltura proteica densa, unida covalentemente (en su parte externa) a una empalizada de moléculas lipídicas. El citoplasma pasa a ser una masa hidrófoba, compuesto principalmente de una trama de fibras de queratinas y una alta proporción de una proteína no queratínica denominada filagrina, cuya principal función es unir los filamentos intermedios de la queratina y promover la formación de puentes disulfuro entre los filamentos intermedios durante la diferenciación terminal de la epidermis. Ya en el estrato córneo superior, la filagrina es degradada hacia aminoácidos libres los cuales mantienen la hidratación epidérmica (Alonso & Fuchs, 2003).

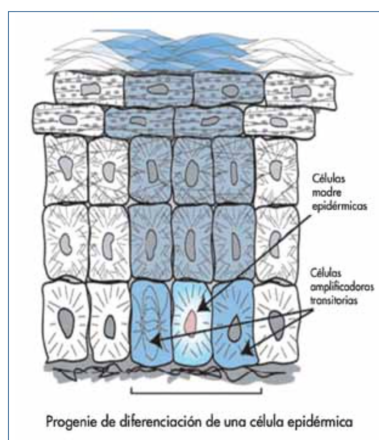


Figura 1. Unidad proliferativa epidérmica. Tomado de: Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. PNAS 2003; 100 (1): 11830-35.

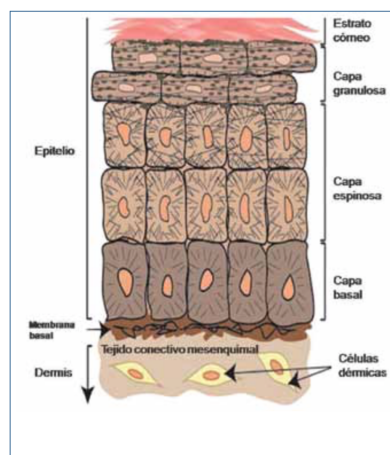


Figura 2. Unidad proliferativa epidérmica. Modificado por: Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. PNAS 2003; 100 (1): 11830-35.

Figura 5. Estratos de la epidermis (2). Representación esquemática de los cuatro estratos que forman la epidermis.

Fuente: Alonso L, Fuchs E, Stem cells of the skin epithelium. PNAS 2003; 200 (1): 11830-35.

2. **DERMIS:**

La dermis es la capa de la piel contigua a la epidermis y presenta numerosas variaciones respecto a ésta. La primera diferencia es el espesor, ya que la dermis suele medir unos 2 - 3 mm (aunque en algunas zonas de piel más fina puede tener solo 0.6 mm, como en los párpados por ejemplo; y en otras zonas hasta 4 mm, como en la espalda de un adulto), por tanto es la capa más abundante de la piel en cuanto a espesor se refiere. Tiene la peculiaridad de presentar gran abundancia de fibras de colágeno y elásticas que se disponen de forma paralela y que le dan a la piel la consistencia y elasticidad característica. Su composición se basa en tejido conectivo y vasos sanguíneos y estructuralmente da soporte a la epidermis y se une en su parte interna a la hipodermis (Wong et al., 2016). El tejido conectivo dérmico contiene elastina y colágeno. Mientras que las fibras de colágeno comprenden el mayor volumen de la piel y la mayor parte de su resistencia a la tracción, las fibras de elastina contribuyen a la elasticidad y la resiliencia. La dermis también contiene fibras nerviosas, receptores sensoriales, ácido hialurónico (responsable de la turgencia normal de la dermis debido a su extraordinaria capacidad de retención de agua) y glicosaminoglicanos de apoyo (Farage et al., 2007).

Histológicamente la dermis se divide básicamente en dos capas:

- Dermis papilar (más superficial y laxa). Es más superficial y su espesor representa el 20 % de la dermis. Está compuesto por tejido conectivo laxo y fibras de colágeno tipo III. Podemos destacar que la dermis papilar interactúa estrechamente con las proyecciones de la cresta de la red de la epidermis, así como con los folículos pilosos individuales circundantes (Wong et al., 2016).
- Dermis reticular (más profunda y densa). Es más profunda y su espesor representa el 80 % de la dermis. Está compuesta por tejido conectivo con fibras de colágeno tipo I y redes de fibras elásticas que unen la piel a la hipodermis subyacente. Contiene mastocitos, reticulocitos y macrófagos (Wong et al., 2016).

La dermis es más gruesa que la epidermis. En ella se encuentran los anexos cutáneos, que son de dos tipos: córneos (pelos y uñas) y glandulares (glándulas

sebáceas y sudoríparas). Cuenta también con vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas.

Las estructuras de la dermis son las siguientes:

- Folículo piloso. Estructura cutánea a partir de la cual nace el pelo.
- Músculo piloerector. Se extienden desde la dermis superficial hasta el folículo piloso. En situaciones de frío intenso, estrés o miedo, estos pequeños músculos se contraen de forma involuntaria, fenómeno que se conoce habitualmente como piloerección.
- Terminaciones nerviosas que hacen posible la sensación de tacto y la sensibilidad al calor, frío, presión y dolor.
- Glándulas sebáceas. Son glándulas que producen una sustancia oleosa que recibe el nombre de sebo. El sebo reviste y protege la superficie de la piel y el pelo, evitando la deshidratación. Está formado por colesterol, triglicéridos, sales minerales y proteínas. Estas glándulas se encuentran situadas en la dermis y secretan generalmente a un folículo piloso, están ausentes de las palmas de las manos y pies.
- Glándulas sudoríparas. Secretan un líquido compuesto de agua y sales minerales que recibe el nombre de sudor. Se abren al exterior a través de pequeños poros situados en la superficie de la piel. Existen dos tipos de glándulas sudoríparas: ecrinas y apocrinas. Las glándulas sudoríparas ecrinas se distribuyen en la piel de todo el cuerpo, mientras que las apocrinas son menos numerosas, producen una secreción más espesa y se localizan preferentemente en ciertas zonas: axilas, periné y zona púbica.
- Vasos sanguíneos y linfáticos. La epidermis carece de vasos sanguíneos, por lo que su nutrición depende de los vasos de la dermis que se organizan en un plexo arterial profundo situado entre la dermis y la hipodermis y otro superficial del que parten pequeños capilares.

3. **Hipodermis:**

Finalmente, por debajo de la dermis, se encuentra la hipodermis, que conformaría la última capa en la que se divide la piel (también llamada fascia superficial). Esta capa de tejido conectivo laxo une la piel a los órganos internos y

está formada principalmente por tejido adiposo y areolar. También presenta numerosos vasos sanguíneos que aportan sangre a las capas más superficiales de la piel. Sus principales funciones son regular la temperatura, proporcionar amortiguación y estabilidad, pues conecta la piel a los órganos internos (Farage et al., 2007; Martini, 2004). En la hipodermis se suelen formar capas deslizantes y grandes bolsas de tejido adiposo, con el objetivo de aislar y proteger la piel. El tejido hipodérmico es presenta una relativa abundancia en proteoglicanos y glicosaminoglicanos, que atraen líquido hacia el tejido dándole propiedades similares a las mucosas. Los principales tipos celulares presentes en esta capa de la piel son fibroblastos, células adiposas y macrófagos, teniendo estos últimos tipos celulares cierta participación en el mecanismo de homeostasis de los adipocitos pudiendo, incluso, estimular la termogénesis grasa ante la exposición al frío y la práctica de ejercicio físico. Los adipocitos de la hipodermis se estructuran formando lóbulos, con tabiques de tejido fibroso, con abundante riego sanguíneo y linfático. La parte más profunda de la hipodermis está en gran ciertamente desprovista de grasa y es donde se aprecia mejor el patrón caótico de las fibras.

El tejido "microvacuolar" que forma la hipodermis actúa como un reservorio activo de líquido intersticial que puede modificar de forma dinámica la rigidez estructural del tejido. Por lo tanto, la integridad del tejido microvacuolar es muy importante para la homeostasis de la distribución de fluidos en el cuerpo. Conceptualmente, se ha argumentado que las unidades microvacuolares constituyen los componentes básicos de la forma biológica (Wong et al., 2016). La composición de hialuronano, glicosaminoglicano y proteoglicano de la matriz actúa como una esponja para el líquido intersticial cuando se exceden las presiones osmóticas capilares, como por ejemplo durante la inflamación. La inflamación del tejido está limitada por los componentes fibrosos de este tejido, que se ha demostrado que tienen un papel activo en el aumento o la disminución de la presión del compartimento intersticial a través de la tensión citoesquelética que las células ejercen sobre las fibrillas de colágeno. Por lo tanto, la integridad del tejido microvacuolar es muy importante para la homeostasis de la distribución de líquidos en el cuerpo.

En resumen, algunas de las estructuras que se encuentran en la hipodermis son las siguientes (figura 6):

- Vasos linfáticos y sanguíneos. Los vasos linfáticos y sanguíneos se extienden por el tejido subcutáneo y mandan pequeños plexos por la dermis para irrigarla.
- Nervios cutáneos. Se localizan en el tejido subcutáneo y mandan ramos por la dermis y terminaciones nerviosas aferentes a la epidermis.
- Ligamentos cutáneos. Relacionan la dermis con la fascia profunda, tienen la función de proporcionar a la piel el movimiento a través de la superficie de los órganos, nacen en la fascia profunda y se unen a la dermis, están particularmente desarrollados en las mamas (Wong et al., 2016).

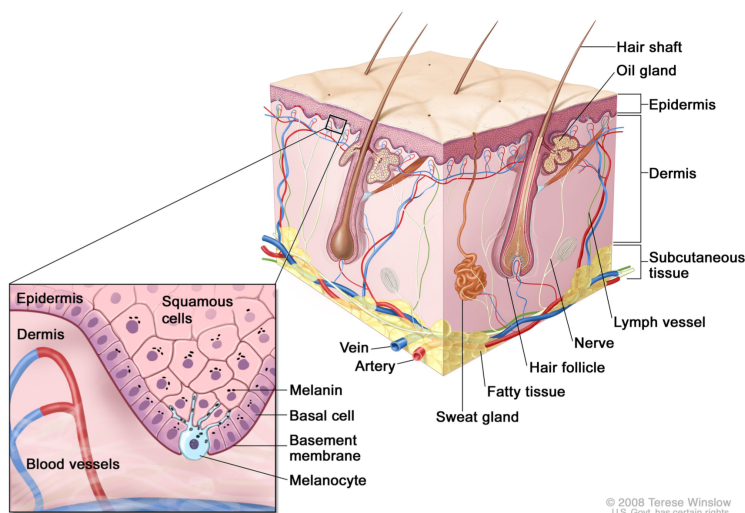


Fig. 1.5: Illustration of the anatomy of healthy skin. Reproduced from [29] with permission by courtesy of Terese Winslow (Illustrator).

Figura 6. Estructuras anatómicas presentes en la piel. Ilustración de las diferentes estructuras anatómicas que podemos encontrar en la piel.

Es conveniente destacar que la piel actúa como una barrera de permeabilidad epidérmica (expresión conocida en inglés como *epidermal permeability barrier*) de la piel, impidiendo la pérdida de agua a través de la capa más externa de la piel (estrato córneo de la epidermis) hacia la atmósfera, mediante mecanismos de difusión o evaporación (Cartlidge, 2000). Una barrera de permeabilidad epidérmica de

la piel defectuosa es responsable de una alta tasa de mortalidad en bebés prematuros (representando más de una 40 %) y es un factor de riesgo y una característica importante en enfermedades inflamatorias de la piel como el eccema o la psoriasis, entre otros, enfermedades cutáneas que pueden afectar hasta al 10 % de la población. El diagnóstico preciso y la detección temprana de posibles defectos de la barrera de permeabilidad epidérmica en pacientes humanos son fundamentales para el tratamiento eficaz de ciertas clases de enfermedades inflamatorias de la piel (Cartlidge, 2000). Los defectos en las funciones protectoras de la barrera cutánea y las lesiones menores de la piel provocan un aumento de la pérdida de agua transepidérmica (*TEWL*, por sus siglas en inglés: *Trans Epidermical Water Loss*), una alteración del pH y la hidratación de la piel. La *TEWL*, debe ocurrir en cantidades justas y equilibradas para mantener un correcto balance hídrico, evitar una pérdida excesiva de agua y mantener una óptima función de la piel y de todo el organismo, sin embargo se ve afectada por diversos factores como:

- Zona corporal: algunas partes del cuerpo con menor contenido en lípidos tienen una mayor *TEWL*, como las axilas, frente o palmas de las manos.
- Edad: el envejecimiento propicia la pérdida de agua y, por tanto, la deshidratación y sequedad cutánea.
- Humedad ambiental: el ambiente con menor cantidad de agua ambiental provoca una mayor tasa de *TEWL*.
- Exposición solar: provoca daño cutáneo y aumento de la *TEWL*.
- Algunas patologías: enfermedades de la piel como la psoriasis o dermatitis atópica aumentan la tasa de *TEWL*.
- La sobreexfoliación y el uso de productos con pH alto.
- Agua muy caliente.

Así pues, la medida experimental de la *TEWL* es un buen indicador de la salud hídrica y el estado de la piel.

Aunque la piel es muy resistente, se ve afectada, como todos los demás sistemas de órganos, por el envejecimiento.

El envejecimiento es un fenómeno complejo y multifactorial que involucra procesos paralelos tanto intrínsecos como extrínsecos que contribuyen progresiva-

mente a una pérdida de integridad estructural y función fisiológica de la piel. El envejecimiento avanza a ritmos diferentes, impulsado por la regulación genética, la toxicidad de ciertos subproductos del metabolismo y la falta de suficientes recursos fisiológicos dedicados al mantenimiento y reparación somáticos (Guinot et al., 2002). Los factores que contribuyen al envejecimiento se pueden dividir en cuatro categorías principales: biológicos (determinados genéticamente e inalterables), ambientales (daño asociado con la exposición a la luz solar, la contaminación o la nicotina), envejecimiento mecánico (movimientos musculares repetitivos como entrecerrar los ojos o fruncir el ceño) y diversos factores que incluyen la dieta, los patrones de sueño, la morbilidad y la salud mental (Guinot et al., 2002).

Los efectos sinérgicos de los factores de envejecimiento intrínsecos y extrínsecos a lo largo de la vida humana se combinan para provocar el deterioro de la barrera cutánea y la integridad estructural de la piel (Friedman, 2005). Los cambios hormonales que también juegan un papel en el envejecimiento de la piel, especialmente en las mujeres, provocan signos de envejecimiento más tempranos en las mujeres (McCallion & Li Wan Po, 1993).

En general, la mayoría de las terapias contra el envejecimiento de la piel tienen como objetivo revertir los signos estéticamente desagradables. Sin embargo, el envejecimiento de la piel también puede producir una morbilidad significativa, sequedad y picazón generalizadas y un mayor riesgo de numerosas enfermedades de la piel, incluida la malignidad cutánea (Harvell & Maibach, 1994). De hecho, la mayoría de las personas mayores de 65 años tienen al menos un trastorno de la piel y muchas tienen dos o más (Kligman & Koblenzer, 1997).

Definir los aspectos tratables del envejecimiento cutáneo (principalmente las influencias hormonales y del estilo de vida) de los intratables (principalmente el envejecimiento intrínseco) es esencial para comprender el envejecimiento de la piel. A medida que la población envejece, el interés biomédico dermatológico crece, ya que puede ser fuente de posibles problemas de salud (Farage et al., 2007; Martini, 2004).

1.2.2.Función de la piel

El sistema tegumentario, cuyo principal componente es la piel, recubre la totalidad de nuestro cuerpo. La piel tiene una gran importancia en nuestro cuerpo, ya que realiza numerosas funciones entre las cuales podemos incluir las siguientes:

1.Función protectora (protección): la piel ejerce una función de barera protectora contra elementos foráneos y cuerpos extraños (Farage et al., 2007; Wysoc-ki, 1999).

2.Función reguladora de la temperatura corporal (termorregulación): La piel tiene gran importancia en el control y mantenimiento de la temperatura corporal. Ésto es posible gracias a la contracción o dilatación de los pequeños vasos sanguíneos que la atraviesan, minimizando o aumentando la pérdida de calor según las necesidades.

3.Función sensitiva (recepción): Se debe a la existencia de numerosas terminaciones nerviosas que contienen receptores para el tacto, calor, frío, presión vibración y dolor. Pueden distinguirse los siguientes:

- Corpúsculos de Meissner. Son responsables del tacto fino.
- Corpúsculos de Krause. Proporcionan la sensación de frío.
- Corpúsculos de Pacini. Dan la sensación de presión.
- Corpúsculos de Ruffini. Son sensibles al calor.
- Corpúsculos de Merkel. Son responsables del tacto.

4.Función excretora (excreción): ya que la piel es un órgano fundamental en la excreción del sudor, que contiene mayoritariamente agua, y también electrolitos.

5.Función absorbente (absorción): a través de la piel se pueden absorber sustancias (como por ejemplo ciertos medicamentos, cremas de diversos tipos, algunos venenos, etc.).

6.Función de síntesis de vitamina D: la vitamina D tiene diversas funciones en el organismo, entre ellas, una de las más estudiadas e importantes está relacionada con la salud ósea, ya que los depósitos de vitamina D mantienen el correcto funcionamiento del metabolismo calcio - fósforo en los huesos. Esta vitamina las

podemos obtener de fuentes exógenas, a través de la ingesta de alimentos, y de manera endógena, ya que el 90 % se sintetiza en la piel. El proceso de síntesis requiere la exposición a la radiación ultravioleta (UV) procedentes de la radiación solar. Este proceso se lleva a cabo en la epidermis, donde a partir del 7-Dehidrocolesterol, tras la exposición a radiación UV, se forma la vitamina D3 (colecalfiferol). Después, termina el proceso de síntesis de la vitamina D mediante procesos de hidroxilación en hígado y riñones.

7.Función de pigmentación: el color de la piel varía según el número de melanosomas o gránulos de melanina sintetizados dentro de los melanocitos. La piel presenta pigmentación gracias a la presencia de melanina, generada por los melanocitos, que absorbe parte de la radiación UV del sol, potencialmente peligrosa. Además, los melanocitos también contienen genes codificantes de enzimas reparadoras del ADN que ayudan a revertir el daño generado por los rayos UV, por lo que las personas que no presentan los productos generados por estos genes poseen una mayor probabilidad de sufrir de cáncer de piel. La pigmentación de la piel humana varía entre poblaciones y esto ha llevado a la clasificación de las personas basándose en el color de la piel. Es conveniente destacar que diversos medicamentos y compuestos químicos también pueden causar cambios en la pigmentación cutánea (Wysocki, 1999).

1.3.El Cáncer de Piel

1.3.1.El cáncer de piel como problema clínico

El cáncer se ha convertido en un verdadero problema de salud pública, ya que es el cáncer que se diagnostica con más frecuencia en los países desarrollados ([Gordon, 2013](#)). A principios de la década del 2000 era la segunda causa de muerte por enfermedad, precedida por las enfermedades cardiovasculares y seguida por las enfermedades ocasionadas por complicaciones derivadas de la diabetes y por las enfermedades respiratorias crónicas. Esta tendencia ha cambiado con el paso del tiempo y actualmente, la tasa de mortalidad por cáncer ha superado a la tasa de mortalidad por enfermedades cardiovasculares en muchos países, debido posiblemente a las mejoras sanitarias introducidas ([Pereira, Carreira, et al., 2012](#); [Pereira, Peleteiro, et al., 2012](#)).

En Europa, los tipos de cáncer con mayor prevalencia entre los hombres son el cáncer de próstata, el de pulmón y el de colon y recto, mientras que en las mujeres los cánceres más comunes son cáncer de mama, cáncer de colon y recto y cáncer de pulmón, en este orden ([Ferlay et al., 2013](#)). Aunque, según los datos recopilados en el trabajo de [Ferlay et al.](#) este orden no se corresponde con el orden de los tipos de cáncer con una mayor tasa de mortalidad en hombres. Así pues, en hombres, el cáncer de pulmón es el que tiene una mayor tasa de mortalidad, seguido por el cáncer de colon y recto y por el cáncer de próstata. En el caso de las mujeres, el orden de los cánceres que mayor tasa de mortalidad es el mismo que el de incidencia: cáncer de mama, cáncer de colon y recto y cáncer de pulmón (datos epidemiológicos de la Unión Europea, 2012) ([Ferlay et al., 2013](#)).

Es conveniente tener presente que, prácticamente, la totalidad de las muertes provocadas por enfermedades oncológicas se deben al desarrollo de metástasis, es decir, al proceso altamente regulado que conduce a la invasión de tejidos sanos por parte de la masa tumoral ([Weigelt et al., 2005](#)).

1.3.2. Etiología del cáncer de piel: Radiación Ultravioleta y estrés oxidativo

1.3.2.1. Radiación Ultravioleta

En la vida estamos rodeados de radiaciones electromagnéticas, definidas éstas como ondas producidas por la oscilación o la aceleración de una carga eléctrica, que inciden en nosotros de menor o mayor manera según el grado de exposición. Algunos ejemplos serían desde la radiación solar que recibimos del sol, compuesta a su vez diversos tipos de radiación de distinta longitud de onda, hasta las ondas de radio, microondas que emiten algunos dispositivos y electrodomésticos de uso diario y rayos X usados en radiografías médicas. Las ondas electromagnéticas no necesitan un medio material para propagarse, por lo que estas ondas pueden atravesar el vacío del espacio y llegar a la Tierra desde el Sol y el resto de las estrellas, también.

El espectro electromagnético está formado por diferentes radiaciones de distintas longitudes de onda. En la figura 7 podemos ver las distintas radiaciones en las que se divide el espectro electromagnético y sus correspondientes longitudes de onda. A modo de resumen podemos decir que aquellas radiaciones electromagnéticas con una menor longitud de onda serán las más energéticas y, por tanto, más penetrantes y dañinas para el cuerpo humano. Así pues, lo mismo podemos decir a la inversa, aquellas con una mayor longitud de onda serán las menos energéticas (figura 7).

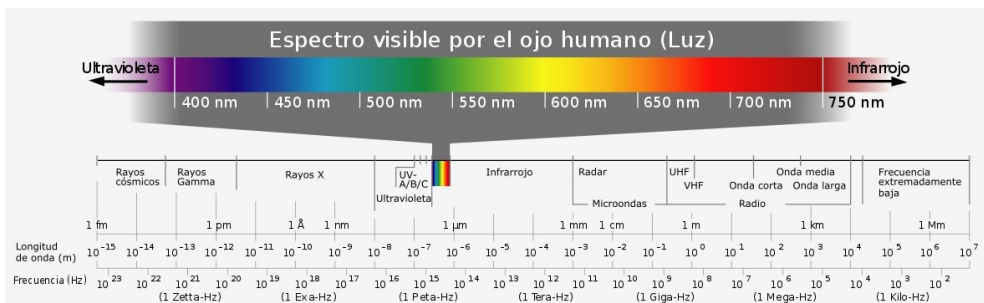


Figura 7. Espectro de radiación electromagnética de la luz.

Fuente: [Espectro visible \(2023\). es.wikipedia.org/wiki/Espectro_visible](https://es.wikipedia.org/wiki/Espectro_visible).

En la imagen siguiente (figura 8) podemos ver a modo de esquema las diferentes longitudes de onda del espectro electromagnético que recibimos continuamente y su origen:

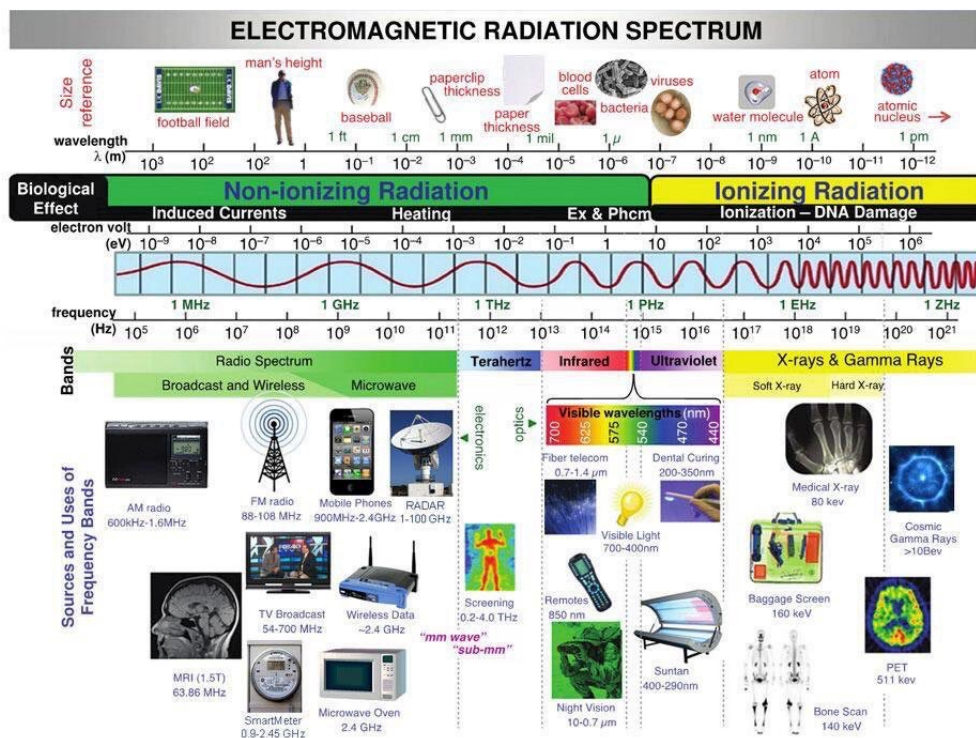


Figura 8. Espectro de radiación electromagnética y su origen. Espectro de radiación electromagnética y elementos/objetos que emiten cada longitud de onda.

La estrella de nuestro sistema solar, el Sol, emite diversos tipos de radiaciones, tanto ionizantes como no ionizantes: rayos gamma, rayos X, radiación ultravioleta A, B y C, luz visible y radiación infrarroja. Se trata básicamente de radiación electromagnética de onda corta, principalmente radiación ultravioleta, luz visible y radiación infrarroja (en el rango del infrarrojo cercano), aproximadamente entre 100 y 4000 nm:

- **Radiación ultravioleta**: longitudes de onda entre 100 y 400 nm. Es absorbida por los electrones de átomos y moléculas y pueden cambiar su estructura y producir profundos cambios químicos, como la ionización del nitrógeno en la atmósfera, la disociación del ozono, o dímeros de pirimidina en el ADN. La radiación UV solar se puede subdividir en componentes UVA, UVB y UVC, cuya penetración en la piel es diferente y dependiente de su longitud de onda:

- **UVA**: corresponde al 90 % - 95 % de la radiación UV que llega a la troposfera, pues a penas es retenida por la atmósfera. Radiaciones de longitud de onda larga comprendida entre los 320 y 400 nm. Penetran profundamente en la dermis. Los rayos UVA presentan una gran eficiencia en la generación de especies reactivas de oxígeno que pueden dañar el ADN a través de reacciones indirectas de fotosensibilización (ver figura 9).

- **UVB**: corresponde al 5 % - 10 % de la radiación UV que llega a la troposfera, ya que es mayormente absorbida por la atmósfera. Radiaciones de longitud de onda media comprendida entre los 280 y los 320 nm. son absorbidos casi por completo por la epidermis, y relativamente pocos llegan a la dermis. Los rayos UVB son absorbidos directamente por el ADN, lo que provoca reordenamientos moleculares que forman los fotoproductos específicos, como los dímeros de ciclobutano y los fotoproductos 6 – 4. Las mutaciones y el cáncer pueden resultar de muchas de estas modificaciones en el ADN (ver figura 9).

- **UVC**: no llega a la troposfera, ya que es absorbida íntegramente por la capa de ozono de la atmósfera. Radiaciones de longitud de onda corta comprendida entre los 100 y los 280 nm. Radiación muy energética y dañina (ver figura 9) .

- **Luz visible**: longitud de onda entre 400 y 700 nm. A parte de proporcionar iluminación al planeta Tierra tiene un papel destacado en la adaptación de los seres vivos a su medio (fotosíntesis en plantas, desarrollo de células fotorreceptoras, etc.).

- **Radiación infrarroja**: entre 700 y 4000 nm. No tienen ya energía suficiente para provocar reacciones químicas, pero sí para inducir movimientos de vibración en las moléculas, es decir, aumentar la energía térmica, lo que se tradu-

ce en un aumento de la temperatura. Aún así, también contribuye al envejecimiento de la piel (D'Orazio et al., 2013).

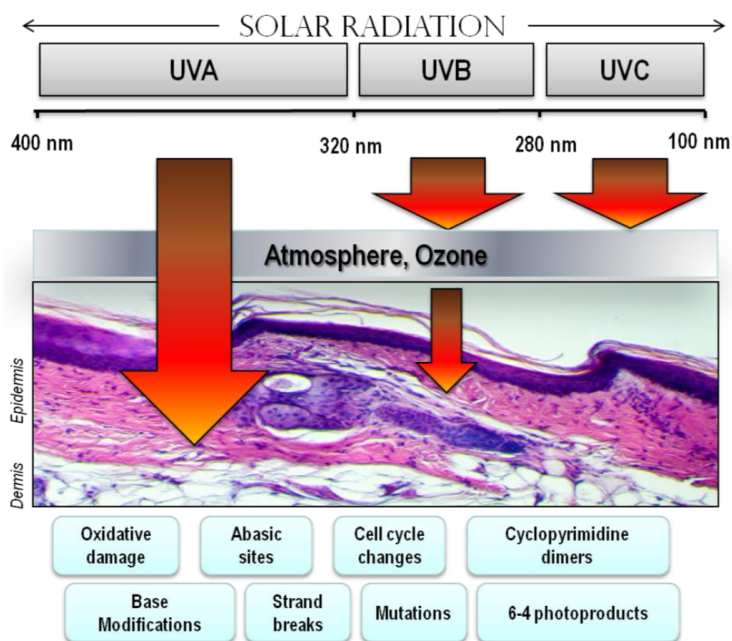


Figura 9. Efectos biológicos en la piel de la radiación ultravioleta. Espectro electromagnético de radiación UV y efectos biológicos en la piel. La radiación UV solar se puede subdividir en componentes UVA, UVB y UVC. Como se puede observar en la representación ilustrativa de esta imagen, la radiación UVA es más penetrante y llega hasta la dermis, mientras que la radiación UVB, a pesar de tener una longitud de onda más corta y ser más energética, es absorbida por la epidermis, siendo, por tanto, menos penetrante en la piel. Por el contrario, la UVC es absorbida completamente por la capa de ozono de la atmósfera y no llega a la superficie terrestre.

Fuente: D'Orazio J. et al. UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci.* 2013.

Como hemos comentado anteriormente la radiación ultravioleta es un agente mutagénico clasificado, por su naturaleza, dentro de los agentes mutágenos físicos. Este tipo es el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de piel y, por

tanto, es conveniente utilizar las pertinentes medidas de protección contra la exposición solar, principal fuente de emisión de radiación UVA y UVB.

Podemos decir que los principales factores de riesgo de desarrollo del cáncer de piel son los que se indican a continuación.

Factores de riesgo comunes para desarrollar cáncer de piel en general:

- Exponerse a la luz solar natural o artificial (bronceado artificial) prolongadamente.
- Tener la piel muy clara y con dificultad para broncearse.
- Presentar muchos lunares y/o efélides en la piel y tener tendencia a la aparición de quemaduras tras la exposición solar.
- Tener ojos azules o coloración de pelo pelirroja o muy rubia ([Narayanan et al., 2010](#)).

Factores de riesgo particulares del cáncer de piel no melanoma:

- Presentar queratosis actínica.
- Haber recibido tratamiento con radiación.
- Tener debilitado el sistema inmunitario.
- Estar expuesto al arsénico.

Factores de riesgo particulares del cáncer de piel melanoma:

- Tener antecedentes de muchas ampollas por quemaduras de sol durante edades tempranas.
- Presentar antecedentes familiares de lunares anormales (síndrome de nevo atípico).
- Tener antecedentes familiares de melanoma.

Es conveniente destacar que, aunque tener la tez clara es un factor de riesgo del cáncer de piel melanoma y no melanoma, el cáncer de piel se presenta en personas de todos los tipos de piel, indistintamente (figura 10). Por tanto, la presencia o ausencia de melanina en la piel es un factor clave en el riesgo a desarrollar cáncer de piel, siendo las personas de piel clara que presentan niveles reducidos o muy reducidos de melanina en la epidermis las que muestran un fenotipo sensible a los rayos UV, tendiendo a quemarse en lugar de broncearse, después de la exposición a

los rayos UV. En relación al tipo de pigmentación de la piel, se estableció la denominada “escala de Fitzpatrick”, en la cual se clasifica en cinco grupos una subdivisión de cinco fototipos pigmentarios en función del nivel de pigmentación de la piel y, por tanto, contenido de melanina de ésta. Esta clasificación divide los cinco grupos de fototipos pigmentarios en grupo I, II, III, IV y V, siendo el I el menos pigmentado, con menor contenido en melanina y más sensible a la radiación UV y el V el de mayor pigmentación, mayores niveles de melanina en sus melanocitos y menor sensibilidad a la exposición a radiación UV. Esta clasificación se puede apreciar más detalladamente en la figura 10 (D'Orazio et al., 2013).

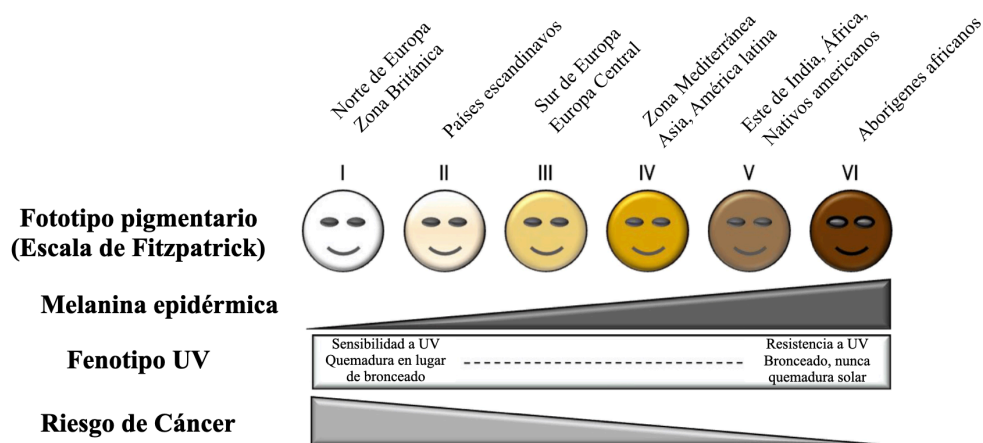


Figura 10. Grupos de fototipos pigmentarios según la escala de Fitzpatrick.

Aquí se observan las características de pigmentación, contenido en melanina, fenotipo UV y riesgo de cáncer que presenta cada tipo, así como el origen de la mayor parte de población de cada grupo.

Figura adaptada de D'Orazio J. et al. UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci.* 2013.

Datos recientes sugieren que las mutaciones que contribuyen a la tez clara y al deterioro del bronceado, también pueden estar asociadas con una reparación del ADN menos eficiente en los melanocitos. El gen *MC1R*, codifica el receptor de melanocortina 1 (MC1R), que se localiza en la membrana de los melanocitos, y que es un regulador clave del proceso de pigmentación celular, ya que participa directamente en la activación de enzimas melanogénicas (de producción de mela-

nina) a través de la ruta de señalización del cAMP. En este sentido, se ha descubierto que las personas con mutaciones deletéreas en el receptor de melanocortina 1 (MC1R), no sólo sufren dosis más altas de radiación UV debido a que sus células epidérmicas son menos capaces de bloquear los fotones UV, sino que también pueden acumular más mutaciones debido a la exposición a los rayos UV debido a una reparación defectuosa del ADN (Narayanan et al., 2010).

Entre las medidas fotoprotectoras que podemos realizar para minimizar el riesgo de cáncer de piel podemos destacar:

- Evitar la exposición solar en las horas centrales del día, cuando la incidencia de los rayos del Sol es mayor.
- Aplicar cremas de protección solar cuando te expones a la radiación solar.
- Evitar o reducir los métodos de bronceado artificial.
- Hacerse autoexploraciones periódicas de la piel y observar si algún lunar ha sufrido cambios de tamaño, color o grosor últimamente (D'Orazio et al., 2013).

El cáncer de piel es uno de los tipos de cáncer que se diagnostica con más frecuencia en los países desarrollados (Gordon, 2013). En general, como se ha desarrollado en páginas anteriores, los factores de riesgo más conocidos son la exposición a la radiación ultravioleta, la edad y el tono claro de la piel (Narayanan et al., 2010). La cara es la zona del cuerpo donde estos cánceres más comúnmente aparecen debido a que es la zona del cuerpo más expuesta al sol, pero alrededor del 20% de estos cánceres de piel aparecen en áreas de la piel menos comúnmente expuestas al sol, como son pecho, espalda y extremidades (American Academy of Dermatology; D'Orazio et al., 2013).

Las regiones del planeta con mayor incidencia de radiación solar a lo largo del año y predominio de piel clara en la población son las que tienen la mayor incidencia de carcinoma basocelular por habitante. Por ejemplo: Australia tiene una de las incidencias per cápita más altas del mundo de estos cánceres (Australasian Society for Dermatology Research (ASDR)).

Los cánceres de piel han causado aproximadamente 80 000 muertes desde el año 2010, más de la mitad de las cuales se deben a melanoma (Schadendorf et al., 2018). Como ejemplo, podemos decir que más de 3.5 millones de casos de cáncer de piel se diagnostican anualmente en los USA, lo que lo convierte en la forma de cáncer más común. Uno de cada cinco estadounidenses desarrollará cáncer de piel en algún momento de su vida. La forma más frecuente de cáncer de piel es el carcinoma de células basales, seguido por el carcinoma de células escamosas (Cameron et al., 2019).

1.3.2.2. Estrés oxidativo

Estrés oxidativo y Especies reactivas de oxígeno (ROS).

Durante el proceso de respiración celular, necesario para la vida, se generan especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés: *Reactive Oxygen Species*). Las principales fuentes de ROS debidas al metabolismo aeróbico fisiológico son la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, los peroxisomas, la NADPH oxidasa, la óxido nítrico sintetasa desacoplada y el sistema del citocromo P450. Las ROS son moléculas que contienen electrones desapareados con gran capacidad para interaccionar con moléculas cercanas a las que pueden causar daños estructurales y pérdida funcional. Estas moléculas pueden ser generadas también por agentes externos como infecciones microbianas y virales (Emerit, 2011), toxinas provenientes de la dieta, condiciones de hipoxia, xenobióticos o exposición a rayos UV (Burke, 2010) así como por situaciones internas, como hemos dicho, a partir del metabolismo celular normal. Una característica importante que distingue las reacciones de los radicales libres del resto de reacciones metabólicas es que, las primeras resultan en la formación de nuevos radicales, dando lugar a una reacción en cadena que amplifica su alcance y daño (Dreher & Junod, 1996).

Entre las diversas acciones fisiológicas celulares en las que están implicadas las ROS podemos citar: actividad fagocítica, ataque a virus, bacterias y células foráneas (Donkó et al., 2005; Suthanthiran et al., 1984), función vasodilatadora en la circulación cerebral (Terashvili et al., 2006), regulación de algunas actividades enzimáticas, implicación en sistemas de transducción de señales o actividad como segundos mensajeros en varias vías de señalización celular (de Lamirande & O'Flaherty, 2008; Dröge, 2002; Galaris & Pantopoulos, 2008; Turpaev, 2002). Además, intervienen tanto en la diferenciación celular como en los procesos de apoptosis (Ozben, 2007; Suzuki et al., 1997).

Las ROS, a pesar de cumplir ciertas funciones para el correcto funcionamiento de la célula, son moléculas con efectos perjudiciales para ésta, y pueden causar daños en las biomacromoléculas:

- Daño en el ADN: roturas simples o de doble hebra, modificación de bases nitrogenadas y entrecruzamientos. El radical hidroxilo es el principal responsable de las roturas de las cadenas de ADN, así como también está implicado en la formación de las bases anómalas aberrantes.

- Peroxidación de lípidos: principalmente de ácidos grasos poliinsaturados de membrana, alterando sus propiedades fisicoquímicas, conduciendo a daños celulares irreversibles (Nicolson, 2007; Zimniak, 2008).

- Oxidación de cadenas laterales de aminoácidos, provocando la inactivación de enzimas por oxidación de sus cofactores o alteración la estructura tridimensional de las proteínas, por ejemplo (Saeidnia & Abdollahi, 2013; Winterbourn & Hampton, 2008).

- El efecto de cada ROS en la célula es diferente, siendo algunas moléculas más dañinas que otras. Las principales ROS son:

- El anión superóxido, $O_2^{\cdot -}$, no es particularmente dañino, su principal efecto lo ejerce a partir de la formación de H_2O_2 .

- El $HO_2^{\cdot}$ se genera por la protonación del $O_2^{\cdot -}$ a valores de pH bajos. Es una especie muy reactiva pero a pH fisiológico menos de un 1 % está protonado.

- El H_2O_2 (peróxido de hidrógeno) aparte de ser una especie reactiva de oxígeno, es fuente de OH en presencia de iones metálicos de transición.

- El $OH^{\cdot}$ (radical hidroxilo) es el radical oxidante más potente. Tiene capacidad para reaccionar con la mayoría de moléculas biológicas, lo cual conlleva que su vida biológica sea extremadamente corta y su difusión limitada, causando gran daño en un pequeño radio de su sitio de producción (Cheeseman & Slater, 1993; Chen et al., 2012).

Por tanto, para paliar los daños ocasionados por la producción y presencia de ROS en las células, existen diversos mecanismos de detoxificación antioxidantes.

Mecanismos de defensa antioxidante.

Aunque las reacciones de oxidación son indispensables para la vida, en ocasiones pueden ser perjudiciales para el organismo, al generar ROS (Vieira et al., 2011). Por este motivo, las células disponen de varios mecanismos de defensa antioxidante.

Mecanismos de defensa antioxidante enzimáticos.

Debido al gran número de agresiones externas y al estrés al que están sometidas, las células poseen un conjunto de defensas antioxidantes celulares o endógenas. El principal sistema celular de defensa antioxidante enzimático lo constituyen las enzimas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx), aunque intervienen otras proteínas (Galecka et al., 2008; Yu, 1994). Estas tres enzimas actúan cediendo electrones a los reactivos intermedios generados, haciéndolos así menos oxidantes o reactivos. A su vez existen sistemas antioxidantes no enzimáticos con funciones críticas en el mantenimiento del estado redox celular.

Catalasa (CAT).

La CAT (H_2O_2 oxidorreductasa), es una enzima antioxidante de expresión ubicua presente en la mayoría de células aeróbicas. Está implicada en el proceso celular de detoxificación del H_2O_2 , ROS formado tanto en el metabolismo aeróbico normal como en diferentes mecanismos patogénicos. Esta enzima presenta dos tipos de actividades enzimáticas (Figura 11):

- Actividad catalítica: cataliza la conversión de dos moléculas H_2O_2 a O_2 y dos moléculas de H_2O .
- Actividad peroxidativa: alcoholes de bajo peso molecular pueden actuar como dadores de electrones, convirtiendo H_2O_2 en H_2O .

En humanos, la CAT se encuentra en altos niveles en hígado, riñón y eritrocitos, que son los principales sitios donde tiene lugar la mayor parte de descomposición del H_2O_2 . Las dos reacciones presentadas anteriormente son las que se indican en la figura 11:

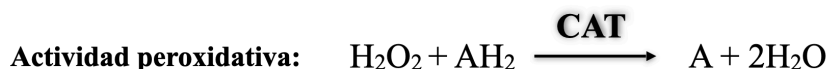


Figura 11. Actividades catalítica y peroxidativa de la Catalasa. Representación esquemática de las reacciones catalizadas por la enzima catalasa: actividad catalítica y actividad peroxidativa.

Superóxido dismutasa (SOD).

Las SOD son metaloenzimas que catalizan la dismutación del anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) en O_2 y H_2O_2 y, por lo tanto, forman una parte fundamental del mecanismo de defensa antioxidante de la célula (Malstrom et al., 1975) (Figura 12). La reacción que catalizan es la siguiente que se presenta en la figura 12:



Figura 12. Reacción enzimática de la Superóxido dismutasa. Representación esquemática de la reacción catalizada por la enzima SOD.

Se han caracterizado tres tipos de SOD según el cofactor que necesitan para realizar su correcta función: cobre/zinc (Cu/Zn), manganeso (Mn) y hierro (Fe). La SOD está ampliamente distribuida tanto en plantas como en animales y se encuentra en concentraciones relativamente altas en el cerebro, el hígado, el corazón, los eritrocitos y los riñones. En los seres humanos existen la SOD1 de ubicación citosólica y SOD3 extracelular (ambas son Cu/Mn SOD) y la SOD2, una MnSOD de ubicación mitocondrial (Sandström et al., 1994). La SOD extracelular se encuentra

en los espacios intersticiales de los tejidos y también en los líquidos extracelulares, lo que representa la mayor parte de la actividad de SOD plasma, linfa y líquido sinovial (Marklund, 1980; Sun et al., 1995).

La cantidad de SOD presente en los entornos celular y extracelular es esencial para la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Por ejemplo, las mutaciones en SOD representan aproximadamente el 20 % de los casos de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) familiar. Además, la SOD también parece ser importante en la prevención de otros trastornos neurodegenerativos como el Alzheimer, el Parkinson y las enfermedades de Huntington (Maier & Chan, 2002). La reacción catalizada por la SOD es extremadamente rápida, tiene un recambio de $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y la presencia de cantidades suficientes de la enzima en células y tejidos normalmente mantiene la concentración de superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) muy baja (Malstrom et al., 1975). Sin embargo, en una reacción competitiva, el óxido nítrico (NO) reacciona con $\text{O}_2^{\cdot-}$ con una velocidad constante de $6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para formar el poderoso agente oxidante y "nitrante", peroxinitrito (Beckman & Koppenol, 1996). En condiciones en las que la actividad de SOD es baja o nula (cuando se da una mutación inactivante de SOD) o que favorecen la síntesis de concentraciones μM de NO (es decir, isquemia/reperfusión, sobreexpresión de iER, etc.), el NO y el anión superóxido generan peroxinitrito, un radical altamente dañino para las células. La presencia de nitrotirosina como una "huella" de peroxinitrito y, por lo tanto, la coexistencia previa de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y NO, se ha observado en una variedad de afecciones médicas, incluidas la aterosclerosis, la sepsis y la ELA (Beckman & Koppenol, 1996).

Glutación peroxidasa (GPx).

La enzima GPx cataliza la reducción de los hidroperóxidos, incluido el H_2O_2 , mediante la reducción del GSH con el objetivo de proteger la célula del daño oxidativo. A excepción de la GPx-fosfolípido-hidroperóxido, que tiene una estructura monomérica, todas las enzimas GPx son tetrámeros de cuatro subunidades idénticas. Cada subunidad contiene una selenocisteína en el sitio activo que partici-

pa directamente en la reducción de dos electrones del sustrato peróxido. La enzima utiliza el glutatión como el último donador de electrones para regenerar la forma reducida de la selenocisteína (Forstrom et al., 1978; Ursini et al., 1985).

Mecanismos de defensa antioxidante no enzimáticos.

Además de las enzimas antioxidantes que participan en la detoxificación de ROS, existen otros elementos de naturaleza no proteica/enzimática, algunos de ellos obtenidos a través de la dieta, que presentan potentes efectos antioxidantes (Galecka et al., 2008). Los más importantes son los siguientes:

- **Glutatión:** se trata de un tripéptido formado por los aminoácidos γ -L-glutamina, L- cisteína y glicina. Es el mayor componente sulfhidrilo no proteico en las células de mamíferos y se suele encontrar presente a concentraciones de 0.5 a 10 mM (Biolo et al., 2007). Este tiol libre tiene importantes funciones biológicas: protección celular contra la oxidación, como reservorio para la síntesis de cisteína, en la proliferación celular, en el transporte de aminoácidos, en la síntesis de proteínas y de ADN, etc. Esta protección que ofrece frente al daño causado por sustancias oxidantes como las ROS, se debe al grupo sulfhidrilo (SH) de la L-cisteína presente en su estructura (Meister & Anderson, 1983) (ver estructura del glutatión en la figura 13). El glutatión se puede encontrarse en dos formas según su estado redox: el glutatión reducido (GSH) y el glutatión oxidado (GSSG), estando este último formado por dos GSH unidos por un puente disulfuro. Se considera un tampón redox, que protege los grupos sulfhídricos de las cadenas laterales de los aminoácidos que los poseen, manteniendo el hierro del grupo hemo en forma de hierro (II) y eliminando los peróxidos tóxicos. La reacción de oxidación de GSH a GSSG está catalizada por la enzima glutatión peroxidasa (GPx), mientras que la reacción contraria (reducción) la cataliza la Glutatión Reductasa (GR).

En situaciones de estrés oxidativo, el GSH elimina el exceso de ROS intracelulares y por oxidación del grupo sulfhidrilo de su residuo cisteína, se oxida a GSSG mediante la GPx, que posteriormente se reduce a GSH por la GR (Meister y Anderson, 1983; Shan et al., 1990) Debido a que la acumulación de GSSG puede

tener efectos tóxicos en la célula y ocasionar consecuencias indeseadas, como por ejemplo la inactivación de algunas enzimas, las células deben mantener el cociente GSSG/GSH dentro de unos límites bajos (menores a 0.01). Por tanto, el contenido de GSSG intracelular es un buen índice de estrés oxidativo.

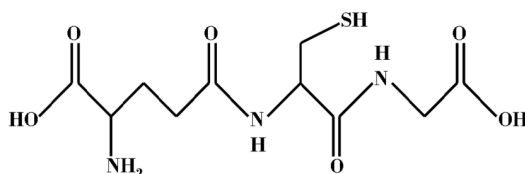


Figura 13. Estructura química del glutatión. Estructura química de la molécula de glutatión en estado reducido (GSH).

- **Vitamina C:** también denominada ácido ascórbico. Su principal efecto antioxidante se debe a que su forma ionizada es capaz de interaccionar con las ROS y de regenerar la vitamina E.
- **Ácido úrico:** se considera un antioxidante hidrosoluble capaz de eliminar radicales libres y trazas de hierro (II). Aún así, algunos estudios sugieren que podría tener efectos por-oxidantes y por-inflamatorios en exceso de ROS ([Meister & Anderson, 1983](#)).
- **Vitamina E:** también llamada tocoferol. Es una molécula liposoluble cuya actividad antioxidante se atribuye a su capacidad para eliminar ROS e inhibir peroxidación lipídica ([Atkinson et al., 2008](#)).
- Otras moléculas como los carotenoides, melatonina y coenzima Q también presentan efectos antioxidantes, actuando principalmente contra la peroxidación lipídica, ya que son liposolubles.

Otras moléculas naturales como, por ejemplo, el resveratrol (Resv) y el pterostilbeno (Pter), polifenoles naturales que pertenecen al grupo de las fitoalexinas, han demostrado tener gran poder antioxidante y con ello efectos beneficiosos para la salud ([Estrela et al., 2013](#)).

Así pues, a modo de resumen de los mecanismos enzimáticos antioxidantes de detoxificación existentes en las células, junto con el sistema GSH/ GSSG, for-

marian el conjunto de defensas antioxidantes endógenas de las células, cuyo esquema de funcionamiento básico podemos observar en la figura 14:

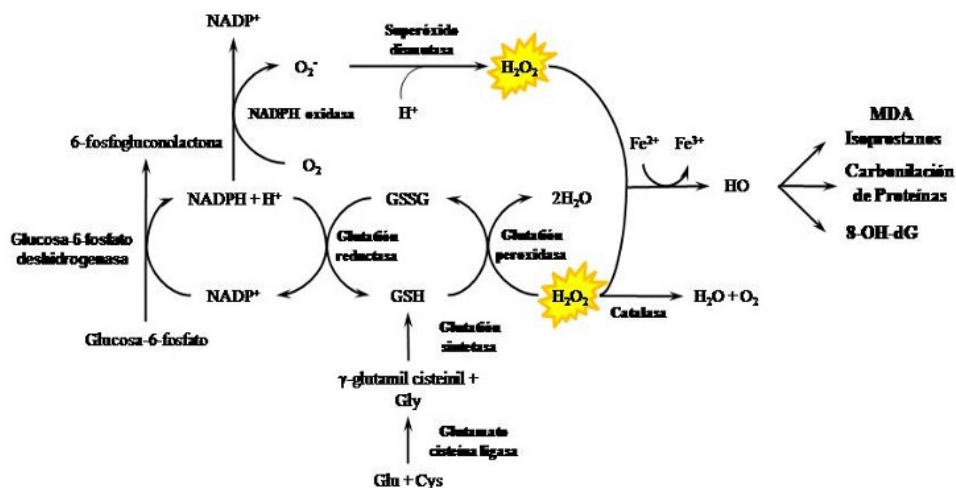


Figura 14. Esquema de los mecanismos de defensa antioxidante celular.

Esquema de funcionamiento básico del sistema de defensa antioxidante endógeno de las células.

Cuando en las células existe un desbalance entre la producción de ROS y la función de los sistemas de defensa antioxidante, ya sea por una alta generación de ROS o por una baja acción de los mecanismos antioxidantes, se produce estrés oxidativo (Slemmer et al, 2008).

1.3.3. Tipos de cáncer de piel

El cáncer de piel se clasifica según el tipo celular del que compone la masa tumoral. Los tipos más frecuentes son el melanoma y el cáncer de piel de tipo no melanoma (*nonmelanoma skin cancer (NMSC)*), sin embargo también existen otros tipos mucho menos frecuentes que no entran dentro de esta clasificación ([Boukamp, 2011](#)). El melanoma es el cáncer de piel menos frecuente (5 %), pero es el más mortal, ya que tiene la capacidad de metastatizar y no existe un tratamiento efectivo para combatirlo ([Sommer, 2005](#)). El *NMSC* es la neoplasia cutánea más abundante, representando el 95% de los casos diagnosticados y su incidencia sigue aumentando en todo el mundo ([Euvrard et al., 2003](#)). Los *NMSC* pueden ser carcinomas de células basales (*Basal cell carcinoma*) o carcinomas de células escamosas (*Squamous cell carcinoma*) ([Boukamp, 2011](#)). Todos estos tipos de cáncer son originados por la acumulación de mutaciones debidas a la sobreexposición a radiación UVB solar. Estas mutaciones suelen afectar a genes implicados en la correcta regulación del ciclo celular, como es, por ejemplo, el gen codificante de la proteína p53. Así pues, la detección de mutaciones en el gen p53 se considera un marcador de riesgo de sufrir carcinomas de células escamosas ([Chen et al., 2013](#); [Jonason et al., 1996](#); [Ling et al., 2001](#)).

1.3.3.1.Melanoma

Generalidades

El melanoma, el tipo más grave de cáncer de piel, deriva de los melanocitos, que son las células que producen melanina, pigmento que le da color a la piel. Se trata de un tumor generalmente cutáneo, pero también del intestino y el ojo (melanoma uveal) y altamente invasivo por su capacidad de generar metástasis. La causa exacta de todos los melanomas no está clara, pero la exposición a la radiación UV aumenta el riesgo de tener melanoma.

Epidemiología

Cerca de 150 000 - 180 000 casos nuevos de melanoma se diagnostican cada año mundialmente, y resulta más frecuente en hombres y personas de tez blanca que habitan regiones con climas soleados. Según un informe de la OMS, hay cada año unas 48 000 - 50 000 muertes relacionadas con el melanoma. En la práctica, el melanoma maligno produce un 75 % de las muertes asociadas al cáncer de piel ([Saginala et al., 2021](#)).

Clínica

Los signos del melanoma incluyen cambios en el aspecto de un lunar o la pigmentación (color) de un área de la piel ([Heppt & Heinzerling, 2022](#)).

El melanoma (y también algunas otras afecciones cutáneas), suelen presentar estos signos y síntomas generalmente:

Un lunar que tiene alguna de las siguientes características:

- Cambia de tamaño, forma o color, en el tiempo.
- Tiene bordes irregulares.
- Tiene varias tonalidades de color.
- Presenta asimetría.
- Produce picazón.
- Segrega pus, sangra o tiene una úlcera (se forma un hueco en la piel cuando la capa superficial de células se descompone y se ve el tejido que está debajo).

- Cambio de pigmentación de la piel.
- Lunares satélites (lunares nuevos que crecen cerca del lunar original).

Fisiopatología

La radiación ultravioleta causa daño en el ADN. Principalmente el tipo de alteraciones que causa son las dimerizaciones de timina que, si no se repararan por los mecanismos de reparación genética presentes en las células, generan mutaciones. La secuenciación masiva del genoma de muestras de melanomas metastásicos de pacientes ha permitido detectar distintas mutaciones, no solo mutaciones puntuales (transiciones C->T principalmente), sino también reordenamientos cromosómicos (deleciones, amplificaciones, translocaciones), que provocan una alta inestabilidad genómica. Cuando la célula se divide, estas mutaciones se propagan a nuevas generaciones de células. Si la mutación ocurre justo sobre un protooncogén dará lugar a un oncogén. Si se produce en genes supresores tumorales, la velocidad de la mitosis o división celular en las células puede descontrolarse.

La mayoría de los estudios sobre quemaduras solares sugieren una relación positiva o directa entre las quemaduras a edades tempranas y el consiguiente riesgo de padecer melanoma. Los pacientes que presentan un historial de alta exposición a la luz ultravioleta, suelen tener un porcentaje de mutaciones en oncogenes, como NRAS o BRAF, superior al que poseen los pacientes con una exposición normal o baja ([Ostrowski & Fisher, 2021](#); [Tímár & Ladányi, 2022](#); [Wagstaff et al., 2022](#)).

Clasificación

Los melanomas se clasifican con fines pronósticos según sus características. Para ello hay varios tipos de clasificación:

- El sistema de Breslow clasifica los melanomas según su espesor ([Wan et al., 2022](#)).
- Los niveles de Clark, puntúan los melanomas según la invasión de tejidos: desde el tipo I intradérmico, hasta el tipo V, que invade el tejido subcutáneo ([Boland & Gershenwald, 2016](#)).

- La clasificación TNM ([Papageorgiou et al., 2021](#)) divide las categorías de la siguiente manera:

a) Tamaño del tumor:

- TX: El tumor primario no puede ser evaluado.
- T0: No hay evidencia de tumor primario.
- Tis: Carcinoma in situ (cáncer inicial que no se ha diseminado a tejidos vecinos) se considera como tal al cáncer que no ha franqueado la membrana basal)
- T1, T2, T3, T4: Tamaño y/o extensión del tumor primario.

b) Ganglios linfáticos regionales:

- NX: No es posible evaluar los ganglios linfáticos regionales
- N0: No existe complicación de ganglios linfáticos regionales (no se encontró cáncer en los ganglios linfáticos).
- N1, N2, N3: Complicación de ganglios linfáticos regionales (número y/o extensión de diseminación).

c) Metástasis:

- MX: No es posible evaluar una metástasis distante.
- M0: No existe metástasis distante (el cáncer no se ha diseminado a otras partes del cuerpo).
- M1: Metástasis distante (el cáncer se ha diseminado a partes distantes del cuerpo).

Pronóstico

El melanoma en estadio IV (Clark), en el que hay metástasis, es la neoplasia maligna de la piel más letal: la supervivencia a cinco años es del 22.5 %. Cuando hay metástasis a distancia, el cáncer generalmente se considera incurable. La tasa de supervivencia a cinco años es inferior al 10 % y la supervivencia media es de 6 a 12 meses aproximadamente ([Ribero et al., 2018](#)).

Tratamiento

a) Cirugía:

Una detección precoz permite la extirpación quirúrgica de la práctica totalidad de los melanomas. Actualmente se utilizan técnicas de diagnóstico no cruentas

tales como la dermatoscopia o epiluminiscencia ([Seiverling et al., 2022](#)) que permiten detectar cualquier alteración precoz de los nevus y su posible malignidad. Si el melanoma se diseminó a los ganglios linfáticos cercanos, el cirujano puede extirpar aquellos que se vieron afectados. Para esto, se hace un mapeo de ganglios linfáticos y una biopsia de ganglio linfático centinela para verificar si hay cáncer allí (el primer ganglio de un grupo de ganglios linfáticos que recibe el drenaje linfático del tumor primario). Es el primer ganglio linfático donde es más probable que el cáncer del tumor primario se disemine ([Lynch et al., 2023](#)). Después de la exéresis de todo el melanoma visible, algunos pacientes reciben quimioterapia o radioterapia para destruir cualquier célula cancerosa que haya quedado. Tras la cirugía solo los pacientes de alto riesgo necesitan inmunoterapia adicional. Si en un período de 3 a 5 años no se ha reproducido el melanoma, las posibilidades de recaída son mínimas ([Brodland, 2023](#)).

b) Radioterapia:

La radioterapia se usa habitualmente después de la resección quirúrgica para pacientes con melanoma avanzado local o regional o para pacientes con metástasis a distancia irresecables. Puede reducir la tasa de recidiva local, pero no prolonga la supervivencia. Además, actualmente se está investigando la radioinmunoterapia del melanoma metastásico. Es conveniente destacar que la radioterapia también se utiliza como método paliativo en el melanoma metastásico ([Krayem et al., 2022](#)).

c) Quimioterapia:

La dacarbazina han sido la columna vertebral del tratamiento del melanoma metastásico desde la aprobación de la FDA en 1975; sin embargo, nunca se probó su eficacia en términos de supervivencia en un ECA ([Klee et al. 2022](#)). En personas con cánceres cutáneos localmente avanzados, se ha descubierto que la infusión de extremidades aisladas (ILI, isolated limb infusion) es un procedimiento mínimamente invasivo y bien tolerado para administrar quimioterapia regional ([Read & Thompson, 2021](#)).

d) Terapia dirigida:

Los principales tratamientos son los inhibidores de BRAF, c-Kit y NRAS. Los inhibidores de BRAF, como vemurafenib y dabrafenib, y un inhibidor de MEK, trametinib, son los tratamientos aprobados más efectivos para el melanoma

BRAF positivo (Corrie et al., 2022). Los tumores de melanoma pueden desarrollar resistencia durante la terapia, pero la combinación del uso de inhibidores de BRAF y MEK puede crear una respuesta rápida y más duradera (Lazaroff & Bolotin, 2023; Welti et al., 2022).

La bioquimioterapia (quimioterapia más citocinas IL-2 e IFN- α) combinada con inhibidores de BRAF mejoró la supervivencia de las personas con melanoma BRAF positivo (Wyluda et al., 2015). Sin embargo, la bioquimioterapia sola no mejoró la supervivencia general y tuvo una toxicidad más alta que la quimioterapia. Las terapias dirigidas dan como resultado tiempos de supervivencia libre de progresión (SLP) relativamente cortos. La combinación de terapia de dabrafenib y trametinib tiene una SLP a 3 años del 23 % y una SLP a 5 años del 13 % (Lazaroff & Bolotin, 2023).

e) Inmunoterapia:

El enfoque actual para tratar el melanoma con inmunoterapia incluye tres categorías amplias de tratamientos, que incluyen citocinas, inhibidores de puntos de control inmunitarios y transferencia celular adoptiva. Estas opciones de tratamiento se usan con mayor frecuencia en personas con melanoma metastásico y mejoran significativamente la supervivencia general. Sin embargo, estos tratamientos suelen ser costosos para el Sistema Nacional de Salud, hospitales y aseguradoras privadas.

Las terapias con citocinas que se emplean para el melanoma incluyen IFN- α e IL-2. IL-2 (*Proleukin*) fue la primera terapia nueva aprobada (1990 UE, 1992 USA) para el tratamiento del melanoma metastásico, ya que puede ofrecer la posibilidad de una remisión completa y duradera de esta enfermedad en un pequeño porcentaje de personas con melanoma. La IL-2 intralesional para metástasis en tránsito tiene una tasa de respuesta completa alta que oscila entre 40 y 100%, porcentaje nada despreciable. De manera similar, el IFN- α ha mostrado solo modestos beneficios de supervivencia y alta toxicidad, lo que limita su uso como terapia independiente (Waldmann, 2018).

Los inhibidores del punto de control inmunitario incluyen anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 (*ipilimumab* y *tremelimumab*), agonistas del TLR (*Toll-Like Receptor*), agonistas de CD40, anti-PD-1 (*pembrolizumab*, *pidilizumab* y *nivo-*

lumab) y anticuerpos PD-L1. La evidencia sugiere que los anticuerpos anti-PD-1 son más efectivos que los anticuerpos anti-CTLA4 con menos toxicidad sistémica. La supervivencia sin progresión a cinco años para la inmunoterapia con *pembrolizumab* es del 21 % ([Mahdavi Gorabi et al., 2022](#)). Un enfoque terapéutico que incluye la combinación de diferentes terapias mejora la supervivencia general y la supervivencia libre de progresión en comparación con el tratamiento solo con inmunoterapia ([Viscardi et al., 2022](#)).

La combinación *nivolumab* (anti-PD-1)/*relatlimab* (anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 en las células inmunitarias) (*Opdualag*) fue aprobada para uso médico en los USA en marzo de 2022 ([Amaria et al., 2022](#)).

La transferencia celular adoptiva se refiere a la aplicación de células T o células dendríticas preestimuladas y modificadas, y actualmente se usa para minimizar las complicaciones de la enfermedad de injerto contra huésped ([Hübbe et al., 2020](#)).

1.3.3.2.No melanoma

Generalidades

El cancer de piel no melanoma es mucho menos grave que el melanoma y aunque existen varios tipos, en general se divide en dos: el carcinoma de células basales (CCB) y el carcinoma de células escamosas (CCE). Con cierta frecuencia el CCB y el CCE son denominados “cánceres de queratinocitos” o “cáncer no melanoma” y se suelen agrupar en uno mismo, son dos tipos diferentes de cáncer de piel debido a sus distintas características epidemiológicas, diferentes rangos de edad en su aparición, diferentes rutas moleculares causantes y diferentes tasas de mortalidad.

Epidemiología general del cáncer de piel no melanoma

Es conocido que el coste del tratamiento de los cáncer de piel no melanoma es alto principalmente en países con poblaciones predominantemente de piel blanca, y se estima que el coste anual en Estados Unidos es de 13 mil millones. (Fernández-Aceñero et al., 2000). Aunque la mortalidad por CCB y CCE es baja, muchos pacientes afectados por estos cánceres pueden experimentar molestias y cicatrices debidas al tratamiento quirúrgico relativamente invasivo, requiriendo un seguimiento exhaustivo para detectar su recurrencia o diseminación. Por tanto, el coste económico de la atención médica a pacientes con cáncer de piel no melanoma tan alto asociado al tratamiento de CCB y CCE justifican la investigación continua para aumentar la comprensión de sus factores causantes, para un mejor tratamiento e identificación de medidas de prevención adecuadas.

Patogénesis

Los cánceres de piel de tipo no melanoma, como se ha comentado anteriormente, son los más frecuentes y su incidencia va en aumento en todo el mundo (Chu et al., 2001). Mientras que los CCB son más frecuentes que los CCE en la población general, siendo la proporción 4 a 1, algunos factores como la inmunosupresión (que suelen presentar los pacientes sometidos a algún trasplante) pueden

suponer una mayor predisposición al CCE alterando está ratio a 3.8 a 1 en favor de los carcinomas de células escamosas (CCE). Además, en pacientes inmunodeprimidos los CCE pueden ser más agresivos, tendiendo a un crecimiento más rápido, una mayor recurrencia y una frecuencia de metástasis entre el 5 % y el 8 %. Ésto hace sugerir que lesiones precursoras “latentes” de CCE estén presentes en una alta frecuencia en la población y que sean “controladas” por el sistema inmune. Por el contrario, parece ser que la prevalencia del CCB es independiente del sistema inmune, lo que indicaría una diferente etiología entre ambos tipos de cáncer de piel no melanoma.

1.3.3.2.1. Carcinoma de células basales

Generalidades del carcinoma de células basales

También llamado carcinoma basocelular, es la forma más frecuente de cáncer de piel, y se puede encontrar principalmente en cara, nariz y frente, aunque también en otras partes del cuerpo. El riesgo de la aparición de un carcinoma basocelular aumenta con antecedentes familiares de la enfermedad, con una exposición acumulativa de radiación UV, o de sustancias químicas carcinogénicas (particularmente con la exposición al arsénico), o una dieta pobre en antioxidantes. Rara vez compromete la vida del paciente pero, de no ser tratado, puede llegar a ser desfigurante, causar sangrado y producir destrucción local en ojo, nariz, oreja y labios. El término procede de que el tumor se origina en las células del estrato germinativo basal, que es la última capa de la epidermis ([Heath & Bar, 2023](#)).

Epidemiología del carcinoma de células basales

La incidencia de los CCB tiene una marcada variación geográfica, ya que ocurre predominantemente en países con población mayoritariamente de piel blanca. Debido la fuerte correlación entre incidencia y latitud se refleja que en el desarrollo de la enfermedad tiene una alta importancia la exposición a radiación solar (exposición a radiación UV). Por ejemplo, en Estados Unidos la incidencia del CCB es 14 veces mayor en la población caucásica que en la población de origen latino, si bien el país con la tasa de CCB más alta es Australia, debido a su po-

blación principalmente blanca y su latitud relativamente baja (cercana al Ecuador). El riesgo de que una persona australiana de piel blanca desarrolle un CCB antes de los 70 años es del 50 % (tasa de 884 por cada 100 000 habitantes) ([Hirsch & Helwig, 1961](#)) y también se ha comprobado na mayor incidencia en regiones tropicales y subtropicales del norte de Australia, respecto a las regiones del sur. Estos patrones son similares a los de Estados Unidos. En Europa, la incidencia también es mayor en la Europa continental que en los países escandinavos. Solo entre el 0.0028 % y el 0.55 % cursan con metástasis y éstas son más habituales en los ganglios linfáticos, los pulmones y la médula ósea ([Castrisos & Lewandowski, 2021](#)).

Factores de riesgo del carcinoma de células basales: edad, sexo y localización anatómica

La incidencia de los CCB es mayor en personas de mayor edad, debido a la mayor exposición solar acumulada a lo largo de los años, lo que podría sugerir un mayor número de mutaciones acumuladas en el ADN. Raramente aparecen en personas menores de 30 años ([de Vries et al., 2004](#)).

En los países desarrollados ha aumentado, en general, la incidencia del CCB durante las últimas décadas, probablemente debido a una tendencia de la población cada vez mayor a verse excesivamente bronceada y, por tanto, exponerse en demasía a la luz solar. Es destacable el aumento particular de la incidencia entre la población femenina más joven. Sin embargo, en edades tardías la incidencia es similar para ambos sexos ([Christenson et al., 2005](#)). Es conveniente destacar que algunos estudios indican que la incidencia de CCB en población joven se ha estabilizado relativamente, debido en parte a los programas de concienciación en favor a las medidas de protección frente al cáncer de piel.

Como es esperable, comúnmente los CCB suelen aparecer en zonas corporales habitualmente expuestas a la radiación solar, siendo las zonas más afectadas la cabeza y el cuello, seguidos del tronco y las extremidades, en este orden.

Asimismo, es conveniente tener presente el alto riesgo de recurrencia que presentan los pacientes que hayan desarrollado un CCB previo a desarrollar otro posterior en los siguientes tres años del diagnóstico, siendo mayor este riesgo de

recurrencia entre aquellos pacientes que hayan presentado el tumor en una edad más temprana que entre los que lo hayan tenido en una edad más anciana.

Factores genéticos implicados en el desarrollo del carcinoma de células basales

Algunos de los factores genéticos implicados en el desarrollo de CCB que podemos citar son:

- Síndrome de Gorling: trastorno autosómico dominante caracterizado por el desarrollo de múltiples CCB a una edad temprana (a veces antes de los dos años, pero con una mayor incidencia sobre los 30 años) y que presenta mutaciones en el gen *patched* una desregulación en la vía de señalización Sonic Hedgehog que propicia la aparición de CCB. Prácticamente todos los pacientes de piel blanca con este trastorno desarrollan CCB, mientras que los de piel negra solo la mitad aproximadamente. Las mutaciones de los genes *patched* da como resultado la regulación positiva de la vía de señalización de Hedgehog y la activación de genes diana posteriores que están asociados con el crecimiento y la diferenciación celular. la importancia de la activación de la vía Shh en la carcinogénesis del CCB proviene de modelos transgénicos de piel humana en los que los queratinocitos humanos que expresan Shh formaron lesiones similares al CCB cuando se injertaron en la piel de ratones inmunodeficientes (Fan et al., 1997).

- Xeroderma Pigmentoso (XP): trastorno autosómico recesivo que forma parte de una familia de enfermedades de defectos en los mecanismos de reparación del ADN por escisión de nucleótidos. Se manifiesta como una fotosensibilidad extrema a la radiación UV debido a la deficiencia en la enzima encargada de la reparación por escisión del ADN dañado por los rayos UV. El cáncer de piel es una característica de XP pero no de otras enfermedades de reparación por escisión de nucleótidos como el síndrome de Cockayne, a pesar de la sensibili-

dad al sol en ambos trastornos. Por lo tanto, se ha sugerido que el aumento de las tasas de mutación en pacientes con síndrome de XP y Cockayne puede ser necesario pero no suficiente para la carcinogénesis. Por lo tanto, la inestabilidad cromosómica observada en XP puede ser un requisito adicional para el desarrollo del cáncer en estos pacientes (Cleaver, 2005).

- Otros genes que se han encontrado mutados con frecuencia en los CCB son, por ejemplo, el conconen Ras y el gen supresor de tumores P53 (Daya-Grosjean & Sarasin, 2005).

Tipos y tratamiento del carcinoma de células basales

Hay varios tipos de CCB:

- Nodular: es el más frecuente de todos. Es una pápula de color piel con telangiectasias. Si forma úlceras, se torna en una lesión destructiva llamada *ulcus rodens*.

- Quístico: tipo raro y de difícil distinción del nodular excepto por tener una pequeña cavidad llena de líquido.

- Pigmentado: es una variante de la nodular, a menudo confundida con un melanoma.

- Esclerosante / cicatrizante: se trata de una lesión similar a una cicatriz. Cuando se presenta en los párpados se le conoce como basalioma esclerosante del párpado.

- Superficial: de aspecto rojizo descamante (Walocko et al., 2022).

- El tratamiento del CCB puede incluir:

- Extirpación de la tumoración.

- Crioterapia, radioterapia.

- Plesioterapia: irradiación a poca distancia.

- Terapia quirúrgica con láser (Naik & Desai, 2022).

1.3.3.2.2. Carcinoma de células escamosas

Generalidades del carcinoma de células escamosas

El CCE también conocido como epiteloma espinocelular y se trata fundamentalmente de un tumor maligno en el que se observa una proliferación descontrolada de las células del estrato espinoso de la piel ([Guzman et al., 2023](#)). La mayoría de CCE tienen su nacimiento a partir de procesos precancerosos, que pueden consistir en una lesión cicatricial no definitiva, quemaduras o heridas antiguas o en un tejido granulomatoso antiguo. En alrededor el 2 % de los casos, las cicatrices por quemaduras se complican dando lugar a una forma tumoral inclusive en años posteriores ([Guzman et al., 2023](#)).

La transformación neoplásica de la lesión cutánea del CCE se presenta en forma de infiltración dura sobre la cual pueden aparecer también formaciones de tipo verrugas y ulceraciones. En muchas ocasiones, en la parte superior de esta formación tumoral, que puede tener cierta similitud anatómica con el cono de un volcán, se puede observar una costra de color oscuro, que en el caso de ser extirpada puede ocasionar una pequeña hemorragia. El CCE suele desarrollarse principalmente en cara (labios muy habitualmente), el pabellón auricular y en el dorso de las manos, entre otros sitios habitualmente expuestos a la luz solar ([Deutsch et al., 2023](#)).

Con frecuencia los CCE se han agrupado en un mismo grupo junto con los CCB, debido a ser carcinomas de tipo no melanoma ambos y presentar numerosas similitudes, presentan ciertas diferencias en su epidemiología y factores de riesgo / patogénesis.

Epidemiología del carcinoma de células escamosas

Al igual que en el caso de los CCB, los CCE suelen desarrollarse en personas de piel blanca, sin embargo, las ratios de incidencia varían fuertemente entre países. A nivel poblacional, los CCE ocurren con menor frecuencia que los carcinomas de células basales, siendo este riesgo mayor a cuando más blanca es la piel.

Una gran cantidad de estudios epidemiológicos relacionados con el desarrollo de CCE se han realizado en países como Australia o Estados Unidos, debido a su gran incidencia y mayor población y, por ello, citaremos algunos a continuación. En Estados Unidos, por ejemplo, la incidencia es 11 veces mayor en población caucásica que en población de origen latinoamericano ([Harris et al., 2001](#)).

El riesgo sufrir un CCE en la vida es particularmente elevado en países de alto riesgo como Australia (por su latitud y alta exposición a la radiación solar), donde el riesgo estimado de desarrollar un CCE a los 70 años es del 28 % y la tasa de incidencia de carcinomas de células escamosas estandarizada por edad es 387 por cada 100 000 habitantes. En comparación, el riesgo estimado de sufrir un CCE en Canadá es del 5 %, por su diferencia de latitud e incidencia de los rayos solares ([Hayes et al., 2007](#)). La formación de un CCE está altamente relacionada con las horas ambientales de exposición a la luz solar y la proximidad al ecuador. Así pues, por ejemplo, en Australia, las tasas de incidencia de carcinoma de células escamosas son más de tres veces más alta la población de latitudes subtropicales y tropicales en comparación con quienes viven en latitudes más altas ($>37^{\circ}\text{S}$) ([Staples et al., 2006](#)). En Estados Unidos también se ha visto que la exposición a radiación UV en el lugar de residencia es un importante predictor de un mayor riesgo a desarrollar un CCE ([Qureshi et al., 2008](#)).

Muchos países de Europa ([Brewster et al., 2007](#)), América del Norte ([Hayes et al., 2007](#)) y Oceanía ([Staples et al., 2006](#)) han detectado aumentos significativos en la incidencia de carcinoma de células escamosas en las últimas décadas, llegando a duplicarse o, incluso, triplicarse dichas tasas en las últimas 2 o 3 décadas ([Dal et al., 2008](#)), pudiendo correlacionarse esta tendencia, en parte, al envejecimiento de la población y al interés creciente en el bronceamiento de la piel y, por tanto, una mayor exposición a radiación UV. Otros ejemplos de estudio epidemiológico que podemos citar sería el que muestra los datos de Suiza, que sugieren que las tasas de incidencia de CCE (pero no la incidencia de CCB o melanoma) pueden haberse estabilizado desde finales de los años 1980 ([Levi et al., 2001](#)) y los datos de Escocia mostraron una estabilización de la incidencia de CCE en hombres mayores de 60 años ([Brewster et al., 2007](#)), aún así dicha tendencia a la baja no se

observa en los datos epidemiológicos de otros países, y se trataría de una excepción.

Se ha comprobado que, hasta la edad de 50 años las mujeres tienen una mayor incidencia de CCE, mientras que a partir de esta edad la incidencia es mucho mayor en hombres. (Stang et al., 2007).

Tal y como hemos dicho anteriormente, la exposición continuada a radiación UV es la principal causa para desarrollar un carcinoma de células escamosas. Por tanto, al igual en hombres que en mujeres, el lugar anatómico más frecuente de aparición de este tipo de carcinomas es la piel de la cabeza, la cara y el cuello, zonas de mayor exposición a la luz solar, seguido por la piel de las extremidades (Dal et al., 2008; Franceschi et al., 1996).

Factores de riesgo del carcinoma de células escamosas: edad, sexo y localización anatómica

Como es de suponer, el riesgo de desarrollar CCE, al igual que en el caso de CCB, se incrementa con la edad. Aún así, y a diferencia de lo que ocurre en cuanto al caso del CCB, hasta la quinta década de vida de las mujeres, éstas presentan una mayor incidencia de CCE, y a partir de esta edad, la incidencia pasa a ser mayor en hombres (Stang et al., 2007). A modo de ejemplo, podemos decir que la diferencia en la incidencia de CCE entre hombres y mujeres es menor en el norte de Australia, más cerca del ecuador, que en las regiones central y meridional.

Por lo que respecta a la aparición más habitual de los CCE, podemos decir que la cabeza y el cuello son los sitios más comunes de aparición en ambos sexos, seguidos por el cuello y las extremidades superiores e inferiores. Cuando se tiene en cuenta la superficie corporal, la mayor incidencia de CCE tanto en hombres como en mujeres se encuentra en la cara, especialmente en la región de los labios, las orejas, la nariz, las mejillas y los párpados, siendo el cuello, el dorso de las manos y los antebrazos los siguientes más afectados (Dal et al., 2008).

Otra característica en común con los CCB que presentan los CCE es su riesgo de recurrencia, pues según algunos estudios publicados, se ha estimado que el

riesgo general de desarrollar un CCE adicional posterior después de un primer diagnóstico es de alrededor del 18 % después de 3 años ([Marcil & Stern, 2000](#)).

Factores genéticos implicados en el desarrollo del carcinoma de células escamosas

Existen diversos factores genéticos cuya presencia pueden predisponer al desarrollo de CCE. Algunos de ellos son los siguientes:

- Xeroderma Pigmentoso (XP): trastorno autosómico recesivo, que presenta defectos en los mecanismos de reparación del ADN por escisión de nucleótidos y cursa con fotosensibilidad extrema a la radiación ([Cleaver, 2005](#)).
- Síndrome de Ferguson-Smith.
- Mutaciones en el gen supresor de tumores *P53*: que pueden provocar una proliferación celular descontrolada y una pérdida de apoptosis.
- Presencia de ciertas variantes del gen *MC1R*.
- Queratosis actínica: se considera una lesión precancerosa, debida al exceso de exposición a radiación UV.
- Infección por ciertos virus: la infección por el virus del papiloma humano (VPH) está asociado con un mayor riesgo de aparición de CCE, pues algunos estudios han demostrado que actúa disminuyendo ciertos mecanismos de activación de la apoptosis ([Struijk et al., 2006](#)).
- Inmunosupresión.
- Consumo de tabaco.
- Exposición a arsénico.

Tratamiento del carcinoma de células escamosas

Entre los diversos tipos de tratamiento del CCE Podemos destacar los siguientes ([Guzman et al., 2023](#)):

- Crema de 5-fluorouracilo al 2.5 % de forma tópica.
- Crema de imiquimod para aplicación local.
- Nitrógeno líquido en aplicación local durante 10 segundos.
- Ácido tricloroacético al 30 %.
- Extirpación quirúrgica ([Guzman et al., 2023](#)).

1.4. Polifenoles naturales

1.4.1. Origen, clasificación y función natural

Los polifenoles son un grupo muy heterogéneo de metabolitos secundarios naturales sintetizados por las plantas. La principal característica común que presentan este tipo de compuestos orgánicos es la presencia de dos o más anillos fenólicos junto con al menos un grupo hidroxilo en su estructura (Asensi et al., 2011; Quideau et al., 2011). Según la definición proporcionada por Stéphane Quideau (Universidad de Burdeos, Francia), el término polifenol debe usarse para definir metabolitos secundarios de plantas que son sintetizados a partir de dos rutas metabólicas, la vía del ácido shikímico y la vía del ácido acético y que no poseen cualquier grupo funcional basado en nitrógeno (Quideau et al., 2011). Esta propuesta representa una concepción más amplia del término polifenol, particularmente en lo referente a pesos moleculares más bajos, lo que en consecuencia identifica como polifenoles varios miles de compuestos naturales.

La clasificación de los polifenoles se realiza en función de su estructura química. Así pues, según Dey y Harborne *et al.* (Dey & Harborne, 1989) se pueden clasificar en 10 categorías según la forma de su esqueleto carbonado: fenoles simples (C6), ácidos fenólicos (C6-C1), ácidos fenilacéticos (C6-C2), fenilpropanoides (C6-C3) (divididos en ligninas (C6-C3)₂ y lignanos (C6-C3)_n), naftoquinonas (C6-C4), xantonas (C6-C1-C6), estilbenos y antraquinonas (C6-C2-C6) y flavonoides (C6-C3-C6). Estos últimos, en forma de glicósidos, son los más comunes y de mayor distribución en el reino vegetal y presentan una estructura C6 (anillo A)-C3-C6 (anillo B), basada en su patrón de hidroxilación y variaciones en el anillo heterocíclico (anillo C). Además, los flavonoides están a su vez divididos en varias subclases dependiendo del estado de oxidación del anillo central: chalconas, auronas, flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonoides, antocianidinas y flavonoles, aunque esta clasificación varía en cierto modo según algunos autores que integran las auronas dentro del grupo de las chalconas (Quideau, Deffieux, Douat-Casassus, & Pouysegu, 2011; Dai & Mumper, 2010; Manach et al., 2004). Asimismo, se sabe

que los polifenoles se asocian con diferentes carbohidratos, ácidos orgánicos y proteínas (Dai & Mumper, 2010; Manach et al., 2004; Quideau, Deffieux, Douat-Cassassus, & Pouységu, 2011).

Dentro de cada grupo, los polifenoles se diferencian por la presencia y disposición de grupos hidroxilo y grupos metilo en su estructura, que les confieren diferentes propiedades químicas (Quideau et al., 2011).

Podemos encontrar polifenoles en prácticamente todos los alimentos procedentes de las plantas, en verduras, legumbres, frutas, frutos secos y bebidas como el té, vino, cerveza, cacao, café, etc. Los niveles de éstos compuestos pueden variar considerablemente dentro de la misma especie, e incluso entre sus variedades, debido a factores genéticos y ambientales que condicionan la germinación, el crecimiento y calidad de los cultivos (Bravo, 1998; Scalbert & Williamson, 2000). Algunos tipos de polifenoles son específicos del tipo de alimento (por ejemplo, las flavanonas se encuentran en cítricos, las catequinas en el té, las isoflavonas en la soja, la floridzina en las manzanas, etc.). Sin embargo, a menudo se encuentran diferentes polifenoles en el mismo alimento (como ejemplo podríamos citar que las manzanas contienen flavanoles, ácido clorogénico, glucósidos de quercetina, glucósidos de floretina y antocianinas) (Li et al., 2014; Tsao, 2010). La composición del polifenol también puede depender de diferentes factores como el medio ambiente, el grado de maduración, el procesamiento industrial o doméstico, el almacenamiento, o la especie vegetal (Amarowicz et al., 2009; McSweeney & Seetharaman, 2015; Visioli et al., 2011).

Este tipo de compuestos son esenciales para la supervivencia de la planta ya que están implicados en diversos mecanismos de respuesta a estrés biótico y abiótico, como pueden ser radiación ultravioleta, sequía, invasión de patógenos, altas/bajas temperaturas, baja fertilidad del suelo, etc.

1.4.2. Polifenoles y salud

Inicialmente los polifenoles se fueron considerados antinutrientes, ya que bajo ciertas condiciones son capaces de precipitar macromoléculas como proteínas, carbohidratos y enzimas digestivos, dificultando así la digestión de algunos alimentos (Bravo, 1998). A partir de la década de 1990 aumentó el interés en su estudio, debido a que se comprobó que muchos de ellos presentaban un importante efecto antioxidante (Dai & Mumper, 2010) y diversos beneficios para la salud.

El interés por trasladar la protección que pueden ofrecer los compuestos obtenidos de las plantas a los humanos ha sido objeto de muchas investigaciones durante las últimas décadas. Así pues, una teoría predominante propone que los polifenoles naturales son, al menos en parte, responsables de los beneficios para la salud derivados del consumo de frutas y verduras. Sin embargo, hasta la fecha, no existe evidencia sólida para concluir que los polifenoles adquiridos a través de la ingesta dietética realmente proporcionen beneficios para la salud (Hollman, 2014; Scalbert & Williamson, 2000; Visioli et al., 2011). Comprender sus efectos y los mecanismos subyacentes dentro del organismo humano, y su expresión en la clínica, sigue siendo un tema de controversia en la ciencia de la nutrición y la prevención de enfermedades. Aun así, varios estudios sugieren que existe base experimental para postular que los polifenoles pueden presentar potenciales efectos beneficiosos en la prevención y el tratamiento del cáncer (Asensi et al., 2011; Baliga & Katiyar, 2006; Colomer et al., 2017; McCormack & McFadden, 2012), la neuroprotección y las patologías relacionadas con la neurodegeneración (Costa et al., 2016), daño por isquemia-reperfusión (Brošková et al., 2013; Simonyi et al., 2005), disfunción y el daño cardiovascular (Hügel et al., 2016; Kishimoto et al., 2013; Lecour & Lamont, 2011), el síndrome metabólico (Amiot et al., 2016; Lecour & Lamont, 2011), la diabetes y metabolismo de la glucosa (Storniolo et al., 2014; Williamson, 2013), el envejecimiento (Lacroix et al. 2015) y sus posibles desórdenes cognitivos asociados (Cherniack, 2012) y las enfermedades relacionadas con la inflamación (Bonaccio et al., 2017; Hoensch & Oertel, 2012; Sarkar et al., 2016).

A continuación desarrollaremos aquellos aspectos que más directamente tienen que ver con esta tesis doctoral.

1.4.2.1. Efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores

Se conoce que los polifenoles afectan a la inmunidad al interferir con ciertos mecanismos de señalización de las células inmunitarias, la síntesis de citoquinas proinflamatorias y la expresión génica de algunos genes implicados en dichos mecanismos (Yahfoufi et al., 2018). Además, inactivan NF- κ B (Singh et al., 2020) y modulan MAPK (Behl et al., 2021) y la síntesis de ácido araquidónico (Kampschulte et al., 2020), siendo también inhibidores potenciales de las rutas de señalización proinflamatorias PI3K/Akt, IKK/JNK, mTORC1 y JAK/STAT (Hou et al., 2018). Pueden suprimir el receptor TLR y la expresión de genes proinflamatorios (Azam et al., 2019). Como ejemplo, podemos decir que la señalización vía TLR4 juega un papel importante en el inicio de la respuesta inmune innata y su activación por la endotoxina bacteriana es responsable de trastornos inflamatorios crónicos y agudos (Kuzmich et al., 2017). Su actividad antioxidante y la capacidad para inhibir las enzimas involucradas en la producción de eicosanoides contribuyen también a sus propiedades antiinflamatorias. Otra propiedad que presentan es que disminuyen la producción de especies reactivas de oxígeno (denominadas comúnmente ROS, por sus siglas en inglés de *Reactive Oxygen Species*) a través de las vías xantina oxidasa (XO) y NADPH oxidasa (NOX) (Laurent et al., 2012; Ouyang et al., 2018), mientras que también modulan la actividad de diferentes enzimas antioxidantes endógenas como la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx) (Sies 2010). Asimismo, inhiben la fosfolipasa A2 (PLA2), la ciclooxigenasa (COX) y la lipoxigenasa (LOX), con la consecuente reducción en la producción de prostaglandinas y leucotrienos (Chuang et al., 2016; Roy et al., 2010). Los estudios de extractos y compuestos de plantas muestran que los polifenoles pueden desempeñar un papel beneficioso en la prevención y el progreso de enfermedades crónicas relacionadas con la inflamación como la diabetes, la obesidad, neurodegeneración, cánceres y enfermedades cardiovasculares, entre otras condiciones (Sies, 2010; Yahfoufi et al., 2018). Así pues, los efectos de estos com-

puestos biológicamente activos sobre el sistema inmunitario se asocian con beneficios en la salud y en diferentes enfermedades inflamatorias crónicas.

Sin embargo, el papel de los polifenoles en la alteración de las múltiples vías celulares inflamatorias deben investigarse más a fondo. Quedan muchas preguntas sin respuesta sobre el uso de polifenoles en el ámbito clínico, ya que, por ejemplo, el papel de la microbiota en la degradación de estos los polifenoles es un campo abierto y con poca investigación al respecto (Cardona et al., 2013). La noción de biodisponibilidad (Estrela et al., 2017) y su impacto en la biofuncionalidad también requiere atención adicional, pues es de gran importancia. En general, se sospecha que la actividad inmunoprotectora y antiinflamatoria de los polifenoles tiene su inicio en el intestino y en la interacción entre su metabolismo y la microbiota (Fraga et al., 2019). Dado que diferentes polifenoles pueden tener múltiples dianas intracelulares, es necesaria más investigación para determinar las consecuencias de la interacción o la sinergia entre diferentes polifenoles y medicamentos de uso común.

1.4.2.2. Efectos anticancerígenos

Existe mucha información sobre los mecanismos celulares por los cuales los polifenoles pueden afectar la carcinogénesis (Kang et al., 2011), la proliferación y la muerte de células tumorales (Asensi et al., 2011), la inflamación (Sarkar et al., 2016), la angiogénesis (Albini et al., 2012), la diseminación (Asensi et al., 2011) y la resistencia a los medicamentos y la radiación (Garg et al., 2005).

La investigación básica en células cancerosas ha propuesto diferentes mecanismos para explicar la actividad antitumoral de los polifenoles naturales, ya que estas moléculas muestran una amplia gama de efectos antimutagénicos. Sin embargo, si un polifenol específico es antimutagénico o no depende de su estructura química, el gen estudiado, el factor mutagénico (radiación ultravioleta, alcohol, tabaco, etc.) y si el polifenol en cuestión está presente antes, durante o después de la exposición al agente mutágeno. Los polifenoles muestran efectos antimutagénicos que mantienen la estabilidad genómica y aumentan los mecanismos de desintoxicación celular al inducir la expresión de genes antioxidantes como la glutatión S-

transferasa, la CAT o la quinona reductasa (Chang et al., 2012). Además, con frecuencia, los mecanismos moleculares implicados en la acción antitumoral de los polifenoles abarcan la inducción de enzimas antioxidantes, lo que reduce la carcinogénesis inducida por ROS a través de la inducción de la expresión del factor de transcripción Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), un regulador maestro de la transcripción de muchas enzimas desintoxicantes (Hanahan & Weinberg, 2011; Nair et al., 2007). Sin embargo, en condiciones *in vivo*, la administración intravenosa de pterostilbeno regula a la baja la señalización/transcripción dependiente de Nrf2 y la protección antioxidante de las células de melanoma y cáncer de páncreas, sensibilizando al tumor frente a la a la quimioterapia (Benlloch et al., 2016). Esta paradoja biológica es causada, aparentemente, por las diferencias de concentración y tiempo entre las condiciones *in vitro* e *in vivo*.

También se ha demostrado que los polifenoles tienen un efecto regulador sobre la vía MAPK. El resveratrol regula esta vía de forma dual, al inhibir la activación de la vía MAPK implicada en la regulación de la proliferación celular y al inducir la muerte celular relacionada con la vía MAPK. Por ejemplo, el resveratrol puede bloquear la vía MAPK al inhibir directamente la actividad de la tirosina quinasa al competir por el acceso a su sitio activo, lo que reduce la carcinogénesis inducida por los ésteres de forbol (compuestos orgánicos de origen vegetal con actividad protumoral) o exposición a radiación UV (Yu et al., 2001). Además, los polifenoles pueden exhibir una potencial acción quimiopreventiva contra la carcinogénesis de colon al afectar la vía AKT/mTOR y miR-143 (Banerjee et al., 2016). En este sentido, el uso de polifenoles contra miARN específicos se ha propuesto como una estrategia novedosa y prometedora en la quimioterapia contra el cáncer (Pandima Devi et al., 2017).

Además, la epigallocatequina-3-galato, cuya abreviatura es EGCG (Dou 2009), la curcumina (Zhou et al., 2011), el resveratrol (Buhrmann et al., 2015), el pterostilbeno (Sirerol et al., 2015) y otros polifenoles inhiben la activación de NF- κ B. NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) es un factor de transcripción formado por un complejo proteico presente en la mayoría de tipos celulares animales que normalmente se localiza en el citosol como un heterodímero a través de la asociación física con su proteína inhi-

bidora I κ B, y que está implicado en la respuesta a estímulos estresantes como la radiación UV, citoquinas, agentes oxidantes, o antígenos de naturaleza viral o bacteriana. Los polifenoles pueden inhibir la actividad de la quinasa I κ B, evitando así la translocación al núcleo, donde NF- κ B induce la expresión de genes relacionados con el crecimiento celular, la invasión y la metástasis. Al inhibir la activación de NF- κ B, los polifenoles suprimen la expresión de diferentes genes proliferativos y de supervivencia celular, incluidos Bcl-2, Bcl-xL, ciclina D1, IL-6, COX-2 o metalopeptidasa 9, lo que favorece la inhibición del ciclo celular (proliferación) y la apoptosis.

Varios estudios también sugieren que ciertos polifenoles inducen la muerte celular al unirse a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 o Bcl-xL o al alterar el citoesqueleto de los microtúbulos celulares (Sonawane & Chinnathambi, 2021; Verma et al., 2017). El resveratrol induce la apoptosis mediante la inhibición de la activación constitutiva de STAT3 y la regulación negativa de las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y survivina (dos mediadores de la vía STAT3) (Quoc Trung et al., 2013).

Los polifenoles también muestran cierta selectividad en la inhibición de varias enzimas importantes involucradas en los mecanismos de replicación y proliferación, como las polimerasas y la ADN topoisomerasa II (Kuriyama et al., 2013), que favorecerán la inhibición de la proliferación descontrolada característica del cáncer. La genisteína, entre otros polifenoles, regula al alza p21, un inhibidor de CDK, pero también suprime la ciclina D1 o E, lo que induce la detención de G0/G1 o G2/M según la línea celular (Meeran & Katiyar, 2008).

Como demostraron Estrela *et al.* (Estrela et al., 2017), en condiciones *in vitro* que tienden a imitar las condiciones biodisponibles *in vivo*, pterostilbeno y curcumina (entre algunos otros polifenoles testados) tienen algún efecto significativo en algunas líneas de células cancerosas (y en estos casos la reducción en el número de células viables siempre fue menor al 20 %). También se han encontrado evidencias experimentales que permiten concluir que, en condiciones *in vivo*, los principales mecanismos subyacentes responsables de los efectos anticancerígenos inducidos por los polifenoles no siempre implican necesariamente una interacción directa entre la molécula de polifenol y la célula cancerosa.

1.4.2.3. Efectos fotoprotectores

Como se ha comentado en apartados anteriores, la radiación solar induce reacciones agudas y crónicas en la piel de los seres humanos (Shin, 2020). La exposición crónica es la causa principal del cáncer de piel no melanoma, y también es un factor primordial en la etiología del melanoma cutáneo (Narayanan et al., 2010). El cáncer de piel es el tipo de cáncer más común en poblaciones de piel clara en muchas partes del mundo. En consecuencia, la incidencia de cáncer de piel no melanoma (células escamosas y basocelulares) es un importante problema de salud pública en todo el mundo. Experimentos en animales han demostrado que, entre los tipos de radiación solar, la radiación UVB (290 – 320 nm) es altamente mutagénica y cancerígena en comparación con los rayos UVA (320 – 400 nm) (Pfeifer and Bersartinia 2012). Los estudios epidemiológicos indican que la radiación UV solar es responsable del desarrollo de tumores en la piel y del fotoenvejecimiento (Cao et al., 2019). La exposición de la piel a la radiación UV solar causa inflamación, estrés oxidativo, daño en el ADN, desregulación de las vías de señalización celular e inmunosupresión (Afaq & Katiyar, 2011).

Debido a lo comentado anteriormente, se ha planteado el estudio del uso de los polifenoles vegetales como agentes quimiopreventivos como potenciales compuestos biológicamente activos que permitan inhibir los efectos dañinos en la piel ocasionados por la exposición a los rayos UV (Dunaway et al., 2018; Gado et al., 2021). Estos estudios incluirían investigaciones relacionadas con la aplicación de los polifenoles y sus potenciales efectos beneficiosos frente a enfermedades de la piel que cursan con inflamación, estrés oxidativo y/o daño al ADN. A modo de ejemplo de polifenoles que podrían presentar beneficios frente a enfermedades de la piel, podríamos citar los polifenoles del té verde (Sharma et al., 2018), antocianidinas de la uva (Afaq et al., 2007), Resv (Afaq et al., 2003), silimarina (Katiyar et al., 1997), luteolina (Wölflle et al., 2013) o la genisteína (Kang et al., 2003). Otro ejemplo a tener en cuenta, y a pesar de tener un factor de protección solar (FPS) mínimo, sería el extracto de té (que contiene EGCG) tiene propiedades protectoras contra el daño del ADN y la inmunosupresión inducida por radiación UV, en parte debido a su capacidad para reducir el estrés oxidativo, inhibir NF- κ B y propiciar la reparación del ADN (Katiyar, 2011; Morley et al., 2005). Sin embargo, también se

ha planteado que los polifenoles podrían ser un arma de doble filo. Aparte del contacto involuntario con plantas dañinas para la piel, hay numerosos cosméticos para el cuidado de la piel y complementos alimenticios que contienen extractos de plantas que podrían provocar efectos indeseables en personas con pieles o tejidos sensibles (personas con hipersensibilidad o susceptibles a reacciones fototóxicas, por ejemplo) ([Korkina et al., 2009](#)).

Con referencia específica a los estilbenos, se ha demostrado, mediante estudios con animales murinos de experimentación, que el Pter es tan potente como el Resv inhibiendo la activación de NF- κ B, AP-1, COX-2 e iNOS inducida en epidermis de ratón por el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) ([Cichocki et al., 2008](#)). Otras investigaciones han descubierto que el Pter inhibe la carcinogénesis en piel de ratón inducida por el 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA) ([Surien et al., 2022](#)) y que, además, el Pter atenúa el estrés oxidativo y la inflamación en queratinocitos ([Teng et al., 2021](#)). Por lo tanto, el Pter es un candidato potencial a ejercer efectos anticarcinogénicos frente a la radiación UV.

Hipótesis y Objetivos

2. Hipótesis y Objetivos

La radiación UV es un conocido agente carcinogénico que tiene capacidad para atravesar la epidermis, causar mutaciones en el ADN y originar la aparición de cáncer de piel. Así pues, la exposición a radiación UV solar, y particularmente la radiación UVB, es un factor de riesgo en el desarrollo de procesos tumorales cutáneos. Se ha descrito que los polifenoles, compuestos naturales con gran capacidad antioxidante, presentan diversos efectos beneficiosos para la salud, entre los que destaca una elevada capacidad anticarcinogénica. Este efecto protector no se debe a una absorción de la radiación ni a una barrera física, sino que implica distintos procesos moleculares que todavía son poco conocidos. Debido a lo explicado anteriormente, se plantea la hipótesis de que la acción antioxidante inducida por el polifenol Pter pueda reducir la acción carcinogénica de la radiación UVB de una forma más efectiva que el polifenol más estudiado históricamente, el Resv.

El objetivo principal de esta tesis doctoral es evaluar el efecto fotoprotector y anticarcinogénico del polifenol Pter contra el *NMSC in vivo*. Para ello, según lo expuesto, se fijaron los siguientes objetivos particulares:

1. Evaluar el efecto inhibidor del Pter contra la carcinogénesis cutánea inducida por radiación UVB.
2. Comprobar la efectividad del polifenol en aplicación pre y postexposición a radiación UVB, así como evaluar dichos efectos en condiciones de exposición aguda y crónica.
3. Realizar un estudio comparativo entre los posibles efectos fotoprotectores y anticarcinogénicos del Pter y uno de los estilbenos más estudiados, el Resv.
4. Profundizar en los mecanismos moleculares antioxidantes implicados en el posible efecto fotoprotector.

Materiales y Métodos

3. Materiales y Métodos

3.1. Modelos animales: ratones SKH-1

En los experimentos *in vivo* de esta tesis doctoral se utilizaron ratones de la cepa SKH-1 (Charles River Laboratories International, Inc., Wilmington, MA, EE. UU.) de 10-12 semanas de edad, siendo alimentados con una dieta estándar (Letica, Barcelona, Spain). Este tipo de ratones no tienen pelo y son inmunocompetentes, características que los hacen idóneos para el estudio de diferentes tipos de patologías cutáneas como pueden ser las inducidas por la exposición a la radiación UV. El hecho de que no presenten un sistema inmunitario inmunodeprimido es otra de sus ventajas, ya que facilita en gran medida su manejo y estabulación. Es conveniente tener en cuenta que estos ratones no tienen melanocitos, por lo que tras la exposición a agentes químicos o radiación UV no desarrollan melanomas ([Benavides et al., 2009](#)).

Todos los ratones fueron estabulados a una temperatura constante de 21-23 °C con una humedad relativa del 40-60 %, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h, siguiendo la normativa vigente tanto nacional (Real Decreto 53/2013, 1 de febrero de 2013) como europea (European Community Council Directive (86/609, OJ L 358.1, December 12, 1987) e internacional (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication No. 85-23, 1985). Los animales se aclimataron a su nuevo ambiente durante 15 días antes de comenzar los experimentos; posteriormente se dividieron en jaulas de 5 animales y se marcaron individualmente mediante perforación en las orejas para poder distinguir cada animal individualmente.

3.2. Ensayos in vitro: células HaCaT

Para los experimentos *in vitro* de esta tesis doctoral se cultivaron queratinocitos inmortalizados humanos (línea celular *HaCaT* (*Human Adult Low Calcium High Temperature Keratinocytes*), ATCC, Manassas, VA, EE. UU.) en medio de cultivo DMEM (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), pH 7.4, suplementado con 4.5 g/L de glucosa, L-glutamina 2 mM, suero bovino fetal (SBF) inactivado por calor al 10 % (Thermo Fisher Scientific, Fisher Scientific, S. L., Madrid, España), 100 unidades/mL de penicilina (Thermo Fisher Scientific, Fisher Scientific, S. L., Madrid, España) y 100 µg/mL de estreptomicina (Thermo Fisher Scientific, Fisher Scientific, S. L., Madrid, España). Las células se sembraron en placa a una densidad de 20 000 células/cm² y se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Las células se recogieron mediante incubación durante 5 min con tripsina al 0.05 % (p/v) (Sigma Aldrich-Co, St. Louis, MO, EE. UU.) en tampón fosfato salino (PBS), pH 7.4, que contenía ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Thermo Fisher Scientific, Fisher Scientific, S. L., Madrid, España) 0.3 mM, seguido de la adición de SBF al 10 % para inactivar la tripsina. El número de células se determinó utilizando un contador automatizado de células (Coulter Electronic, Miami, FL, EE. UU.), mezclando a partes iguales la suspensión celular y el colorante azul de tripano (Thermo Fisher Scientific, Fisher Scientific, S. L., Madrid, España) para conocer la viabilidad celular. Se permitió que las células se adhirieran durante 24 h antes de cualquier tratamiento *in vitro*.

3.2.1.

3.2.2. Ensayos in vitro: citotoxicidad del pterostilbeno

Con el objetivo de evaluar el efecto y posible citotoxicidad del Pter [3,5-dimetoxi-4'-hidroxi-trans-estilbeno] (Green Molecular, Paterna, Spain) sobre los cultivos de células HaCaT. Las concentraciones testadas fueron 0, 10 μ M, 20 μ M y 50 μ M de Pter diluido en medio de cultivo DMEM durante 1 h. Tras el tiempo de incubación con el tratamiento de Pter, se eliminó éste y se cambió por medio DMEM fresco. Tras 24 h de incubación a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂, se contaron las células de cada condición experimental mediante un contador automatizado de células (Coulter Electronic, Miami, FL, EE. UU.).

3.2.3. Ensayos in vitro: inmunotinción de fluorescencia de Nrf2

Para comprobar si el Pter presenta una potencial capacidad de inducir la translocación del factor de transcripción Nrf2 al núcleo, donde éste ejerce su función, se realizaron experimentos de inmunotinción tratando cultivos celulares de HaCaT con Pter y realizando la posterior tinción inmunocitoquímica. Se usó el anticuerpo monoclonal antihumanos contra Nrf2 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EE. UU.).

3.3.Preparación de liposomas vacíos, con pterostilbeno y resveratrol para administración tópica.

Para los experimentos *in vivo* se utilizaron cremas de liposomas con polifenoles. Se prepararon liposomas con Pter [3,5-dimetoxi-4'-hidroxi-trans-estilbeno] (Green Molecular, Paterna, Spain), liposomas con Resv [trans-3, 5, 4'-trihidroxis-tilbeno] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y liposomas vehículo (sin ningún polifenol). Pter y Resv existen como dos isómeros conformacionales, *cis* y *trans*, pero de manera natural existen fundamentalmente en la estructura *trans*. Por tanto, ambos estilbenos están comercialmente disponibles en su forma *trans* (>99 %). Tanto los liposomas de Pter como los de Resv se prepararon a una concentración de 10 μ moles/100 μ L.

En primer lugar se mezclaron 0.512 g de Pter o 0.458 g de Resv y 2.376 g de lecitina de soja (GUINAMA, Alboraya, Valencia, España). El Pter se disolvió en 40 mL de diclorometano (Sigma Aldrich-Co, St. Louis, MO, EE. UU.) y el Resv en 140 mL de éter dietílico (Sigma Aldrich-Co, St. Louis, MO, EE. UU.). Los solventes fueron eliminados poniendo la mezcla en un matraz aforado (AFORA, 8/29 E) y con el uso de un rotavapor (BÜCHI Labortechnik AG, Suiza). Las condiciones de evaporación fueron: baño a 40 °C, vacío y refrigeración con agua para recuperación del solvente. Tras 20-30 min los liposomas quedaron en forma de una película fina y homogénea en la base del matraz y se resuspendieron en 20 mL de PBS 1 mM (Gibco® by Life Technologies™, Life Technologies Corporation, Grod Island, NY, EE. UU.). Esta resuspensión se llevó a cabo durante 3-4 min en el rotavapor, con baño a 40 °C, sin vacío ni refrigeración. Transcurrido este tiempo, los liposomas se transvasaron a un vaso de plástico de 100 mL y se sometieron a 100 ciclos de sonicación (cada ciclo consistió en 6 s de ultrasonidos y 3 s de parada) con un sonicador Branson Sonifier SLPe Digital Ultrasonic Homogenizer (BRANSON Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, EE. UU.) a 4 °C. Posteriormente se añadió carboxipol (GUINAMA, Alboraya, Valencia, España) polímero hidrofílico reticulado del

ácido acrílico para gelificar los liposomas y facilitar su aplicación en los animales, en una proporción 1:1 (concentración final 0.5 μ M). Finalizado este proceso, se añadió el conservante antimicrobiano metil p-hidroxibenzoato conocido como fenonip (GUINAMA, Alboraya, Valencia, España) (6 mL por cada litro de liposomas), el cual está constituido por mezcla de ésteres de alquilo de ácido 4-hidroxibenzoico en fenoxietano.

3.4. Absorción UV, determinación del FPS y de TEWL

FPS

Con el objeto de determinar si los polifenoles utilizados en el estudio actúan como un filtro físico a la luz UV se determinó el grado de absorción de radiación y el factor de protección solar (FPS) de éstos. Para la determinación de la absorción UV y del FPS se prepararon soluciones estándar de los estilbenos Pter y Resv a 1 mM en etanol. La absorción UV se midió con un Multiskan Spectrum (ThermoScientific, Waltham, MA, EE. UU.) en un rango de exploración de 200 a 800 nm. El blanco utilizado en esta medición fue etanol, pues es el disolvente en el que están preparadas estas disoluciones.

La determinación del FPS se realizó usando un espectrofotómetro, se basó en el método descrito por Diffey y Robson (Diffey & Robson., 1989) y posteriormente se modificó y mejoró con el fin de evaluar la protección de la piel contra los rayos UV que brindan los productos testados en esta tesis doctoral. El método *in vitro* usado permite obtener un valor de absorbancia mediante espectrofotometría y posteriormente se hace un ajuste matemático mediante las ecuaciones propuestas por Diffey y Robson (Diffey & Robson., 1989). Como sustrato, el material sobre el que se aplicó el producto testado fueron placas de polimetilmetacrilato (PMMA) Helioplate HD6 (HelioScreen, Creil, Francia) (tamaño: 50 mm x 50 mm x 1.5 mm; peso: 4.5 g).

La dispensación se llevó a cabo como pequeños puntos alineados en toda la superficie. Para garantizar la precisión en la medida, el área de aplicación fue de unos 25 cm². Una vez aplicado el producto se extendió inmediatamente de forma manual sobre toda la superficie de la placa PMMA, hasta lograr una película uniforme. Las muestras se dejaron equilibrar durante 15 min en oscuridad a temperatura ambiente para asegurar una autonivelación de los compuestos aplicados.

Se utilizó como referencia una placa de PMMA que contenía un filtro UV para comprobar el buen funcionamiento del equipo y evaluar la corrección de las medidas realizadas.

El SPF *in vitro* se expresa a partir de todo el espectro UVB y UVA residual tras haber atravesado la capa de crema extendida sobre el sustrato. Esto conduce a una función de onda $T(\lambda)$, que se multiplicó por las siguientes funciones y podemos observar en la figura 15:

- Primera función de onda $S(\lambda)$, irradiación espectral del sol estándar;
- Segunda función de onda $E(\lambda)$, espectro de acción eritemal.

$$SPF \text{ in vitro} = \frac{\sum_{290}^{400} E(\lambda) \cdot S(\lambda) \cdot d\lambda}{\sum_{290}^{400} E(\lambda) \cdot S(\lambda) \cdot T(\lambda) \cdot d\lambda}$$

Figura 15. Ecuación teórica del cálculo de FPS *in vitro*.

Los valores SPF de los productos testados se obtuvieron calculando la media aritmética de las diferentes medidas. Para los cálculos, se utilizó el software Helio-soft Ltd. (Buckinghamshire, Reino Unido).

TEWL

Además, por su importancia fisiológica en la función protectora que ejerce la piel contra agentes físicos y químicos externos. A parte de la protección frente a elementos externos, también se encarga de regular la pérdida de agua transepidérmica ([Indra et al., 2011](#)).

El *TEWL* fue medido mediante el uso de un Tewameter® TM210 (Courage+Khazaka Electronic, Colonia, Alemania), cuyo método se basa en el principio de difusión en cámara abierta. El gradiente de presión del vapor de agua se mide indirectamente mediante dos pares de termistor e higosensor combinados, presentes a dos alturas diferentes dentro de un cilindro hueco (altura 2 cm y diámetro 1 cm) ([De Paepe et al., 2005](#)). El cabezal de la sonda se coloca horizontalmente sobre la piel a una presión constante y su pequeño tamaño minimiza la influencia de las turbulencias del aire dentro de la sonda. Durante todo el experimento, las evaluaciones con los Tewameter se llevaron a cabo de acuerdo con protocolos estandarizados según la bibliografía ([Rogiers, 1995](#); [Rogiers, 2001](#)). Esto incluyó la puesta a

cero y el calentamiento previo a la medición del cabezal de la sonda hasta alcanzar la temperatura corporal del voluntario. Después del equilibrio de la sonda, el tiempo de medición generalmente fue de entre 30 y 40 s ([De Paepe et al., 2005](#)).

3.5.Tratamiento con polifenoles e irradiación con UVB.

El tratamiento de los animales de experimentación consistió en la aplicación tópica de los liposomas vehículo y liposomas con polifenoles (a una concentración de $1 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) (Tan et al., 1970; Sharma, 2010). Tras 20 min de la aplicación de los liposomas, tiempo suficiente para la absorción del tratamiento, los animales fueron irradiados con luz UVB. Para la irradiación de los ratones con UVB ($\lambda = 310 \text{ nm}$) se utilizó una cámara *Crosslinker Bio-Link BLX 254* (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Alemania). Se realizaron dos tipos distintos de irradiación:

- Exposición aguda: irradiación única a $360 \text{ mJ}/\text{cm}^2$, pre o post aplicación del tratamiento tópico polifenólico correspondiente.
- Exposición crónica: irradiación de 3 veces por semana a una dosis de $180 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ durante 30 semanas.

Es conveniente destacar que se eligió esta dosis y frecuencia de radiación UVB en el tratamiento crónico para simular una exposición continua y prolongada al sol. Los diferentes grupos experimentales tratados con polifenoles y sometidos a radiación crónica se muestran en la Tabla 1 (10 animales/grupo):

No UVB	UVB
Control	Control + UVB
Vehículo	Vehículo + UVB
Pter $1 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$	Pter $1 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ + UVB
Resv $1 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$	Resv $1 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ + UVB

Tabla 1. Tratamientos aplicados a los diferentes grupos experimentales de ratones.

3.6. Medición del edema cutáneo tras la exposición a radiación UVB.

Con el objeto de realizar una primera aproximación sobre el efecto de la radiación UVB y el posible efecto fotoprotector polifenólico, se midió el grosor del pliegue cutáneo sobre el lomo de los ratones antes y 24 h después de la primera dosis de irradiación a 360 mJ/cm². Esta medida se realizó sujetando los ratones manualmente y midiendo el pliegue cutáneo con un pie de rey electrónico (MEDID, General de Medición, S.L., Barcelona, España). Con los datos de las medidas del grosor de la piel obtenidos se calculó el incremento de grosor de la piel inducido por la exposición a la radiación UVB. Los resultados se presentan como el porcentaje de incremento de grosor de la piel de los diferentes grupos experimentales respecto del grupo de ratones control.

3.7.Recolección de muestras de piel

Para la obtención de las muestras experimentales los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Los ratones sujetos a la irradiación aguda se mantuvieron estabulados durante una semana y fueron sacrificados. Los animales sujetos a irradiación crónica se sacrificaron a las 30 semanas de tratamiento. Una parte de la piel de lomo de los ratones que había estado sujeta a tratamiento se usó para estudios histopatológicos. Otra parte del lomo se utilizó para medir la actividad enzimática y para evaluar la expresión génica. Para su posterior procesamiento, las muestras de piel se congelaron con nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C. Simultáneamente, tras el sacrificio se recogieron muestras de sangre de cada ratón por decapitación en tubos Eppendorf heparinizados (Laboratorios ROVI, Madrid, España).

3.8.Análisis histopatológico cutáneo

Las muestras de piel se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS, pH 7.4, por inmersión durante 24 h. Posteriormente se realizó el deshidratado de las muestras en baños de etanol de graduación creciente (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 % por duplicado) (60 min/baño) y aclaramiento tisular con xileno (por duplicado, 60 min/baño). Posteriormente las muestras se incluyeron en parafina y se realizaron secciones de 5 µm de grosor. Dichos cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina para evaluar el grosor de la epidermis a nivel microscópico, así como, el número de capas de células epidérmicas de cada grupo experimental. El análisis de las imágenes microscópicas se realizó con el software ImageJ ([Schneider et al., 2012](#)).

3.9. Homogeneización de muestras de piel

Los homogenados de las muestras de piel se realizaron utilizando un homogenizador Precellys 24 (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Francia) acoplado a un sistema Cryolys (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Francia), que permite que el proceso se lleve a cabo a muy baja temperatura ya que la refrigeración se realiza con nitrógeno líquido. El método utilizado por este sistema se basa en el uso de unas mini-bolas cerámicas que mediante un proceso de agitación son capaces de disgregar el tejido presente en un tubo de plástico de 2 mL. Es conveniente destacar que se usaron unos tubos especiales, más resistentes y con tapón de rosca para evitar su rotura durante la agitación del proceso de homogeneización. Dependiendo del análisis o estudio posterior que se le practicó a la muestra, el homogenado se realizó con diferente solución tampón (se obtuvo muestra para diferentes medidas enzimáticas y realización de PCR). Añadimos 1 mL del tampón por cada 0.1 g de tejido a homogenizar. En nuestro caso observamos que obteníamos un mejor homogenado cuando el proceso se llevaba a cabo a una temperatura de entre -10 °C y 0 °C y con 6 ciclos de agitación a 6300 rpm, consistiendo cada ciclo de agitación en 23 s de agitación y 15 s de parada. Es conveniente destacar que para obtener una homogeneización óptima de la muestra se debe evitar su descongelación durante todo el proceso.

3.10. Medida capacidad antioxidante

Con el objetivo de medir la capacidad antioxidante de los compuestos utilizados en los animales de experimentación utilizamos el método Trolox (Huang et al., 2005), un compuesto derivado de la vitamina E (Sigma Aldrich-Co, St. Louis, MO, EE. UU.), cuyo método se basa en la reacción entre el H_2O_2 y la metmioglobina para formar ferrilmioglobina. Este radical reacciona con el ABTS (2,2'-azino-bis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]-sal de diamonio) (Sigma Aldrich-Co, St. Louis, MO, EE. UU.) para formar $\text{ABTS}^{\cdot+}$, cromógeno que presenta un pico de absorbancia a 734 nm. De esta manera, en presencia de antioxidantes hay una inhibición de dicha absorbancia, cuyo nivel de disminución se usa para determinar su capacidad antioxidante (Figura 16).

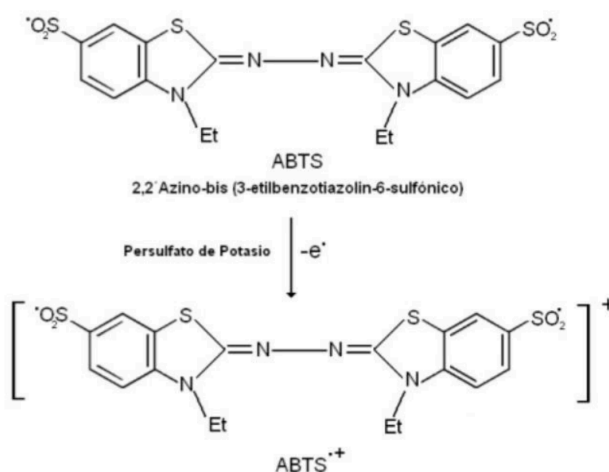


Figura 16. Reacción de formación de ABTS. Formación del radical ABTS mediante el persulfato de potasio. Fuente: Tesis de Santa Cruz Cifuentes, L. A. Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos. 2011).

Para llevar a cabo estos ensayos se utilizó un curva de calibración de varias concentraciones conocidas de Trolox (2.5 μ M, 2 μ M, 1.5 μ M 1 μ M y 0.5 μ M). Las concentraciones de Pter y Resv utilizadas fueron en ambos de 2 μ M, 1.5 μ M, 1 μ M y 0.5 μ M (Tabla 2).

Reactivos	Blanco	Standard / Muestra
Patrón / Muestra	-	7.5 μl
PBS	877 μl	869 μl
Meta Hb (140μM)	18 μl	18 μl

Tabla 2: Preparación del contenido de las muestras método Trolox.

Para este ensayo se preparó una “Master Mix” con 29.563 mL de PBS, 612 μ L de MetaHb y 1 mL de ABTS. A cada cubeta de espectrofotometría se añadieron 917 μ L de esta “Master Mix”. Para los blancos de Pter y Resv se utilizó 7.5 μ L de DMSO, y para el blanco del Trolox 7.5 μ L de PBS (ya que estos fueron los respectivos solventes). Por lo que respecta a las muestras se añadió 7.5 μ L de cada concentración de Pter y Resv indicadas anteriormente.

Una vez preparadas todas las cubetas se agitaron y se incubaron a 30 °C durante 5 minutos, midiéndose la absorbancia de cada cubeta, que constituirán sus respectivos blancos. En t = 0 min, se añadió el peróxido de hidrógeno, que actúa como catalizador e iniciador de la reacción. Pasados 6 minutos se leyó la absorbancia, con cuidado en la exactitud de los tiempos ya que la reacción no es de punto final, sino que continúa hasta que se consume todo el peróxido de hidrógeno.

La representación de la recta patrón se realizó calculando el porcentaje de inhibición para cada uno de los patrones:

$$\% \text{ Inhibición} = (A_{734} - A_{734}) \cdot 100 / A_{734} \text{ blanco.}$$

3.11. Medida de actividades enzimáticas

Debido a que la radiación UVB tiene efectos pro-oxidantes y que parte de los efectos beneficiosos de los polifenoles estudiados se deben a su carácter anti-oxidante, se evaluaron las actividades de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx). Las muestras de piel guardadas a -80 °C se homogeneizaron en los tampones correspondientes para su correcta determinación.

Tampones utilizados según actividad enzimática:

CAT: Fosfato de potasio 50 mM (pH 7.0) + EDTA 1 mM.

SOD: Hepes 20 mM (pH 7.2) + EGTA 1 mM + manitol 210 mM + 70 mM sacarosa.

GPx: Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) + EDTA 5 mM + ditioneitol (DTT) 1 mM.

Los homogeneizados se centrifugaron a 10 000 g durante 15 min, a 4 °C, utilizando una centrífuga Mikro 200 R (Andreas Hettich, Tuttlingen, Alemania). Los sobrenadantes se usaron directamente para la determinación de la actividad enzimática.

Las actividades de CAT, SOD y GPx se determinaron utilizando diferentes kits comerciales (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, EE. UU.), siguiendo los protocolos y empleando los reactivos y rectas patrón suministrados en cada kit.

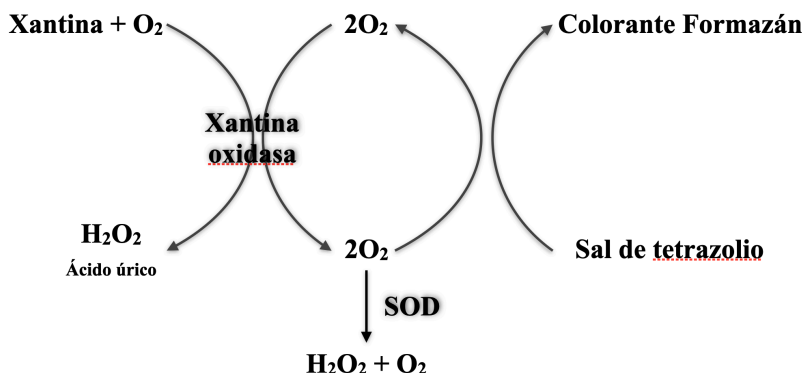


Figura 17. Fundamento kit de detección actividad Superóxido dismutasa. Representación esquemática de las reacciones en las que se basa este ensayo del kit de detección y cuantificación de SOD (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, EE. UU.).

Determinaciones de las actividades enzimáticas antioxidantes:

Catalasa:

La catalasa es una enzima antioxidante implicada en el proceso celular de detoxificación del H₂O₂. Esta enzima presenta dos tipos de actividades enzimáticas (ver figura 11):

- **Actividad catalítica:** cataliza la conversión de dos moléculas H₂O₂ a O₂ y dos moléculas de H₂O.
- **Actividad peroxidativa:** alcoholes de bajo peso molecular pueden actuar como dadores de electrones, convirtiendo H₂O₂ en H₂O.

Este kit de actividad CAT de Cayman Chemical Company utiliza la actividad peroxidativa de la CAT para determinar la actividad enzimática. Este método de determinación está basado en la reacción de la enzima con metanol, en presencia de H₂O₂. El formaldehído formado es medido colorimétricamente tras su reacción con el cromógeno 4-amino-3-hydrazino-5-mercaptop-1,2,4-triazole (purpald). El purpald forma un heterociclo bicíclico con el aldehído, que tras su oxidación cambia de incoloro a púrpura (Johansson & Borg, 1988; Wheeler et al., 1990).

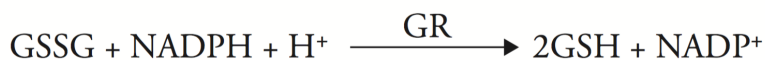
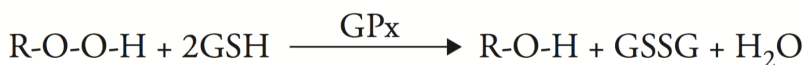


Figura 18. Fundamento kit de detección actividad GPx. Representación esquemática de las reacciones en las que se basa este ensayo del kit de detección y cuantificación de GPx (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, EE. UU.).

Superóxido dismutasa:

Las SOD son metaloenzimas que catalizan la dismutación del anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) en O_2 y H_2O_2 y, por lo tanto, forman una parte fundamental del mecanismo de defensa antioxidante de la célula (Malstrom et al., 1975).

Se han caracterizado tres tipos de SOD según el cofactor que necesitan para realizar su correcta función: cobre/zinc (Cu/Zn), manganeso (Mn) y hierro (Fe).

Este kit de actividad SOD (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, EE. UU.) utiliza una sal de tetrazolio para la detección de radicales superóxido generados por la xantina oxidasa y la hipoxantina mediante espectrofotometría ($\lambda 440\text{-}460\text{ nm}$) (Figura 17). De esta manera, se considera que una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para presentar una dismutación del 50 % del $\text{O}_2^{\bullet-}$. El ensayo SOD mide los tres tipos de SOD (Cu/Zn, Mn y Fe SOD).

Glutatión peroxidasa:

La enzima GPx cataliza la reducción de los hidroperóxidos, incluido el H_2O_2 , mediante la reducción del GSH con el objetivo de proteger la célula del daño oxidativo.

El ensayo de medición de este kit de GPx (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA) mide la actividad de GPx indirectamente mediante una reacción acoplada con GSH reductasa (GR). El GSSG, producido tras la reducción

del hidroperóxido por GPx, se recicla a su estado reducido por GR y NADPH (Figura 18). La oxidación de NADPH a NADP⁺ va acompañada de una disminución de la absorbancia a 340 nm. En condiciones en las que la velocidad de la actividad de GPx es limitante, la velocidad de disminución de la absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la actividad de GPx en la muestra (Paglia & Valentine, 1967). Este kit de ensayo de GPx (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA) se puede utilizar para medir todas las peroxidasas dependientes de GSH en plasma, lisados de eritrocitos, homogeneizados de tejidos y lisados de células (Figura 18).

3.12.Extracción de polifenoles de la piel y plasma y cuantificación mediante espectrometría de masas

Se mezclaron directamente alícuotas de 100 μ L de plasma o sobrenadante de muestras de piel homogeneizadas en PBS con 200 μ L de metanol frío. Posteriormente se centrifugaron a 10 000 g durante 15 min, a 4 °C, utilizando una centrífuga Mikro 200 R (Andreas Hettich, Tuttlingen, Alemania). Los sobrenadantes se usaron directamente para la determinación de Pter. EL protocolo de UPLC-MS/MS se realizó según Ferrer *et al.* ([Ferrer et al., 2005](#)) utilizando un sistema Acquity UPLC con espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Waters Corp., Milford, MA, EE. UU.). Los metabolitos de Pter se identificaron en un modo de exploración completa (“*full scan*”).

3.13. Medida de peroxidación lipídica mediante determinación de niveles de isoprostanos

Tras el sacrificio y recolección de piel de los animales, las muestras se homogenizaron en tampón Kpi 0.1 M + 1 mM EDTA pH 7.4 + BHT (Butil hidroxitolueno) (Sigma Aldrich-Co, St. Louis, MO, EE. UU.). La determinación de isoprostanos en los homogenados de piel se realizó con el kit comercial *8-isoprostane EIA kit* (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, EE. UU.). Para la preparación de las muestras, en primer lugar, se hizo una extracción con solventes orgánicos para eliminar la fracción no lipídica de la muestra. Esta extracción se realizó con *Folch solution*, una mezcla de solventes consistente en cloroformo:metanol (proporción 2:1) y BHT a una concentración final de 0.005% (p/V). El volumen de *Folch solution* fue de 20 mL por cada mL de muestra. Después se realizaron 6 ciclos de sonicación (5 s de ultrasonidos y 3 s de parada) con un sonicador Branson Sonifier SLPe Digital Ultrasonic Homogenizer (BRANSON Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, EE. UU.) y se centrifugaron las muestras a 2500 g durante 3 min con una centrífuga Rotina 420 R (Andreas Hettich GmbH & Co. KG Tuttlingen, Alemania)). Tras este procedimiento se obtuvo una fase superior (acuosa) desechable y una fase inferior (orgánica) que se recogió en un nuevo tubo. A continuación, la fase orgánica se desecó completamente con N₂ gas, proceso que dura aproximadamente 2-3 h. Una vez evaporado, los isoprostanos, localizados en la pared del tubo, se resuspendieron en 150 µL (volumen inicial de muestra) de metanol-BHT (la concentración final de BHT fue de 0.005% (p/V)) y se realizó una hidrólisis alcalina. Para ello, se añadieron 150 µL de KOH 15% y se incubaron a 40 °C en un *termoblock* Labnet Accublock Digital Dry Bath (Labnet International, Inc., Woodbridge, NJ, EE. UU.) durante 30 min. Tras la hidrólisis alcalina, se acidificaron las muestras (pH 3.0) con ácido acético 30 % (Panreac Química, S. A., Castellar del Vallés, Barcelona, España) y se procedió a purificar los isoprostanos con columnas *SPE* (la fase estacionaria contiene un compuesto de 18 carbonos (C-18) que retiene los isoprostanos) (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan,

EE.UU.). Para la purificación, se activaron las columnas con 5 mL de metanol (Panreac Química, S. A., Castellar del Vallés, Barcelona, España) y 5 mL de agua mQ (en este orden), después se añadió la muestra acidificada y seguidamente se añadieron 5 mL de agua mQ y 5 mL de hexano. Para eluir los isoprostanos de las columnas se añadieron 5 mL de acetato de etilo con 1% de metanol, se introdujeron las columnas en tubos de vidrio y se centrifugaron a 600 g durante 3 min. Posteriormente se evaporaron los solventes con N₂ gas y los isoprostanos se disolvieron en 150 µL de tampón EIA (*Enzyme Immuno Assay*). Por último, se preparó la placa ELISA añadiendo 50 µL de muestra, 50 µL de *tracer* (que contiene acetilcolinesterasa) y 50 µL de *antiserum* (anticuerpo contra 8-isoprostano). Se incubó durante 18 h a 4 °C, se realizaron 5 lavados con *Wash buffer*, se añadieron 200 µL de *Ellman's reagent* (contiene acetilcolina que será hidrolizada por la acetilcolinesterasa del *tracer*) y se incubó 2 h a temperatura ambiente en oscuridad. Se tomó nota de las absorbancias a 420 nm de cada pocillo y se realizaron los cálculos oportunos para determinar la cantidad de isoprostanos en cada muestra.

3.14. Medición de carbonilación de proteínas

Para evaluar la carbonilación proteica en las muestras de tejido cutáneo se utilizó el kit *OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit* (©EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EE. UU.). Para llevar a cabo esta determinación, tras la obtención del lisado de proteínas, los grupos carbonilo de las cadenas laterales se derivatizaron a 2,4-dinitrofenilhidrazona mediante la reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina. Las muestras de proteínas derivatizadas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y se realizó un *Western blotting*. Tras la transferencia, la membrana de nitrocelulosa con las proteínas fue incubada con el anticuerpo primario (anticuerpo contra las proteínas-DNP *rabbit IgG*) y posteriormente con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (anticuerpo secundario: *goat anti-rabbit IgG*). Para su detección se usó el sistema de quimioluminiscencia mejorada (sistema ECL, Amersham) (Ver apartado “Western Blot” donde se detalla la información).

3.15. Determinación de GSH

El GSH se determinó mediante cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas en tándem (sistema Acquity UPLC con espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Waters Corporation, Framingham, Massachusetts, EE. UU.)) siguiendo la metodología de Escobar et al. ([Escobar et al., 2013](#)). El tejido se homogeneizó con N-etilmaleimida (NEM) 10 mM disuelta en PBS en una proporción de 400 μ L por cada 100 μ g de tejido (4:1 (v/p)). Las muestras se desproteinizaron con ácido perclórico al 4 % (v/v) y se centrifugaron a 10 000 g durante 15 min a 4 °C. Los sobrenadantes se usaron directamente para la determinación de GSH. Los resultados fueron normalizados para el número de capas de células medidas en la epidermis para cada condición.

3.16. Evaluación del daño oxidativo al ADN

Para la evaluación de daño al ADN, las muestras de piel se homogeneizaron en tampón Tris 10 mM (pH 7.0) + EDTA 1 mM + NaCl 150 mM. Posteriormente, se incubaron primero con RNasa A a 37 °C durante 30 min y luego con proteinasa K a 55 °C durante toda la noche. A ésto le siguió un paso de fenolización, agregando a la muestra un volumen equivalente (1:1) de fenol 100 % puro a pH 8.0 y mezclando suavemente, por inversión 40 veces, hasta obtener una emulsión homogénea. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 250 g durante 3 min, recogiendo la fase superior con una punta cortada estéril y transfiriéndola a un tubo estéril.

Luego, se repitió el proceso pero agregando un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (1:1) en lugar de fenol, recogiendo la fase superior después de la centrifugación (25 000 g durante 3 min). A continuación, el ADN de las muestras se precipitó añadiendo 1 mL de isopropanol y se centrifugó a 25 000 g durante 15 min. Realizando el procedimiento de manera correcta, se debe observar claramente una malla blanca (ADN precipitado). Posteriormente, se eliminó el isopropanol de las muestras con precaución evitando cualquier contacto con el ADN precipitado. Las muestras de ADN se lavaron añadiendo 1 mL de etanol al 70 % y centrifugando a 25 000 g durante 10 min. Se eliminó la mayor cantidad posible de etanol con cuidado dejando que el resto del etanol se evaporara. Después de volver a suspender en tampón de digestión, la concentración de ADN se midió usando nanodrop. Se guardaron 3 µg para su posterior visualización.

A continuación, 120 µg de ADN fueron sometidos a una digestión enzimática siguiendo el método descrito por Crain ([Crain, 1990](#)). Las muestras se incubaron durante 3 min a 100 °C y luego se colocaron en hielo durante 1 min. A continuación, se inició la digestión enzimática agregando 22 µL de Nucleasa P1 e incubando las muestras durante 2.5 h a 45 °C. Luego se agregaron 25 µL de fosfodiesterasa I y las muestras se incubaron durante 2 h a 37 °C. Finalmente, se agregaron 12 µL de fosfatasa alcalina y las muestras se incubaron durante 1 h más a 37 °C, el procedimiento se llevó a cabo en un termobloque mezclador (Bioer Technology, Zhe-

jiang, China). Debido a que los nucleótidos también presentan absorbancia a 260 nm, la concentración de ADN se midió después de la digestión de éste utilizando el espectrofotómetro de microvolúmenes Nanodrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.). El Nanodrop se configuró para medir el ADN de doble hebra, utilizando la digestión tampón como blanco. La relación de pureza media de la ratio de absorbancia 260/280 nm para las muestras de ADN fue de 1.6 ± 0.06 . Para comprobar el aislamiento y la digestión del ADN, se cargaron 3 μg de ADN, antes y después de la digestión, en un gel de agarosa al 1 % y se visualizaron mediante luz ultravioleta después de la tinción con colorante GelRed. La electroforesis se realizó a 80 V durante 40 min, en una cámara de electroforesis de ADN (SCIE-PLAS, Cambridge, Reino Unido) y una fuente de alimentación 200/2.0 (Bio-Rad Laboratories S. A., Alcobendas, Madrid, España). La imagen del gel de ADN se capturó utilizando ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad Laboratories S. A., Alcobendas, Madrid, España). Luego, los nucleósidos liberados se preconcentraron liofilizando los hidrolizados y resuspendiendo los gránulos secos en 60 μL de metanol/0.1 % ácido fórmico (HCOOH) 1:3 (v/v). Para finalizar el procedimiento, las muestras se centrifugaron (25 000 g durante 10 min) para eliminar cualquier desecho y se recogieron los sobrenadantes.

Finalmente, se agregaron 5 μL de solución de patrón interno (10 mmol/L) a alícuotas de 60 μL tanto de sobrenadantes diluidos 1:20 en H_2O (0.1% v/v HCOOH) como no diluidos y luego, las muestras se inyectaron en el sistema cromatográfico (UPLC-MS/MS). El nivel de 2-dG es varios órdenes de magnitud más alto que los niveles de los otros analitos y, por lo tanto, se midió 2-dG en los sobrenadantes diluidos 1:20, mientras que se midió 8-OHdG en los sobrenadantes no diluidos.

3.17.Extracción y cuantificación de proteínas

La determinación de proteínas en homogenados de muestras de piel de ratón se realizó utilizando el kit comercial *Pierce™ BCA Protein assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, Fisher Scientific, S. L., Madrid, España). El fundamento que emplea este kit se basa en la detección por espectrofotometría de las proteínas usando un reactivo que contiene ácido bicinconínico (Smith et al. 1985). El ácido bicinconínico, es una sal sódica capaz de formar un complejo púrpura intenso con inones Cu^{1+} en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret). La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible, y que muestra una gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos (Figura 19) (Smith et al., 1985).

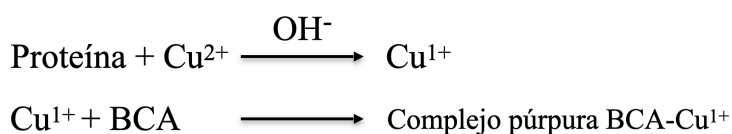


Figura 19. Reacción de Biuret. Reacción de Biuret, en la cual se basa en kit de determinación de proteínas *Pierce™ BCA Protein assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, Fisher Scientific, S. L., Madrid, España).

Tras descongelar las muestras en nevera se pusieron inmediatamente en hielo (para evitar su la degradación de proteínas si permanecen demasiado tiempo a temperatura ambiente) y se realizó todo el procedimiento en frío.

En primer lugar preparamos una recta patrón con concentraciones conocidas de proteína albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés, *Bovine Serum Albumin*), siendo éstas: 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2.5 mg/mL, 1.25 mg/mL, 0.625 mg/mL, 0.3125 mg/mL y Blanco (0 mg/mL).

Para la cuantificación, como hemos dicho anteriormente, se usó el kit *Pierce™ BCA Protein assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, Fisher Scientific, S. L., Madrid, España), que consta de dos reactivos: el Reactivo A y el Reactivo B. Con estos dos reactivos del kit prepararemos la *solución de trabajo* mezclando el Reactivo A y el Reactivo B en una proporción 50:1. Para cada medición usamos una placa de 96 pocillos para medir cada muestra por triplicado. Así pues, en cada pocillo se pipeteó 3 μL de cada muestra y 260 μL de *solución de trabajo* (en los pocillos de recta patrón se pusieron las mismas cantidades, solo que en lugar de 3 μL de muestra se pusieron 3 μL de cada concentración de proteína BSA). Una vez completada la placa con todas las muestras y la recta patrón por triplicado, cubrimos los pocillos con parafilm (para evitar evaporación), cubrimos la placa con papel de aluminio (para asegurar la oscuridad en los pocillos) y la incubamos a 37 °C durante 30 min en oscuridad. Tras la incubación, se midió la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro *Multiskan Spectrum* (Thermo Fisher Scientific, Fisher Scientific, S. L., Madrid, España). Así pues, sabiendo las absorbancias de los pocillos de recta patrón y a partir de la ecuación de la recta patrón resultante, pudimos calcular la concentración de proteína de nuestras muestras.

3.18. Expresión génica antioxidante

EXTRACCIÓN DE ARN

El ARN total de las muestras de piel se aisló utilizando el kit TRIzol de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Fisher Scientific, S. L., Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los homogenados de piel de ratón (50-100 mg de tejido) se hicieron con 500 μ L de TRIZOL en el Precellys 24 (6 ciclos de 23 segundos de marcha y 10 s de parada con refrigeración) utilizando material tratado con dietilpicrocarbonato (0.1 %, 2 h a 37 °C) y posteriormente autoclavado. Tras la homogenización, se transvasó el sobrenadante a nuevos tubos eppendorf libres de RNAasa, para separarlo de las bolas de homogenización. En este punto los homogenados se congelaron a -80 °C hasta el momento de la extracción de ARN.

- Para la extracción de ARN se descongelaron las muestras en hielo, se centrifugaron a 12 000 g, durante 10 min a 4 °C, y al sobrenadante se le añadieron 100 μ L de cloroformo (Sigma Aldrich-Co, St. Louis, MO, EE. UU.). Las muestras se centrifugaron durante $\rightarrow$ 15 min a 12 000 g a 4 °C generándose 3 fases:
 - Fase superior acuosa transparente, donde está el ARN.
 - Fase intermedia rica en ADN.
 - Fase inferior proteica (de color rosa).
- Se recogió la fase acuosa a un nuevo tubo y se añadieron 250 μ L de isopropanol (2-propanol), que deshidrata y precipita el ARN. Después de centrifugar durante 10 min a 12 000 g a 4 °C la muestra se añadieron $\rightarrow$ 500 μ L de etanol 75 % para eliminar los restos de 2-propanol. Por último, se centrifugaron las muestras a 7 500 g durante 5 min y el pellet de ARN se resuspendió en H₂O libre de RNasas.
- $\rightarrow$ La cuantificación de la cantidad de ARN (Absorbancia a 260 nm) y su pureza (A260/A280) se realizó mediante espectrofotometría (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Fisher Scientific, S. L., Madrid, España).

RETROTRANSCRIPCIÓN

La retrotranscripción del ARN a ADN complementario (ADNc) se realizó mediante la acción de la transcriptasa inversa. Para ello se utilizó una pareja de cebadores de hexámeros aleatorios (*random hexamer primers*) y un kit de transcriptasa inversa *SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR* siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Fisher Scientific, S. L., Madrid, España).

El protocolo de retrotranscripción fue el siguiente:

- **Desnaturalización:**

- Añadir a cada tubo libre de nucleasas de cada muestra:
 - Volumen para 1 µg de ARN.
 - 1 µL de hexámetros aleatorios (50 ng/µL).
 - 1 µL de dNTP (10 mM).
 - Hasta 10 µL de agua libre de RNasas.
- Incubar a 65 °C durante 5 min.
- Incubar en hielo durante, al menos, 1 min.

- **Anillamiento (*Annealing*):**

- Añadir a cada tubo 10 µL de la Master Mix del kit, compuesta por (para cada tubo/muestra):
 - 2 µL de *RT Buffer* (10X).
 - 4 µL MgCl₂ (25 mM).
 - 2 µL DTT (0.1 M).
 - 1 µL *RNaseOUT™* (40 U/µL).
 - 1 µL *SuperScript™ III RT* (200 U/µL).
- Incubar a 25 °C durante 10 min.

- **Síntesis de ADNc:**

- Incubar a 50 °C durante 50 min.

- **Fin de la reacción:**

- Incubar a 85 °C durante 5 min.

- **Degradación del ARN:**

- Añadir a cada tubo 1 µL de RNasa H.
- Incubar a 37 °C durante 20 min.

REACCIÓN CUANTITATIVA EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (qRT-PCR)

La RT-PCR se realizó con un termociclador iQTM5 *Multicolor Real-Time PCR Detection System* de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories S. A., Alcobendas, Madrid, España). A La *Master Mix* de la PCR y la ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) se agregaron a las siguientes secuencias de cebadores (5' a 3'):

Secuencias de cebadores utilizados:

◉ **CAT:**

- Sentido: GGAGCAGGTGCTTTTGGATA .
- Antisentido: GAGGGTCAC-GAACTGTGTCA.

◉ **SOD1:**

- Sentido: TTTTTCGCGGTCCTTTC.
- Antisentido: CCATACTGATGGACGTGGAA.

◉ **GPx:**

- Sentido: ATCAGTTCGGACACCAG-GAG.
- Antisentido: TTCCGCAGGAAGGTAAAGAG.

La cuantificación en tiempo real del ARNm en relación con GAPDH (gen control) se realizó con un ensayo SYBR Green I (Thermo Fisher Scientific, Fisher Scientific, S. L., Madrid, España). El ADNc diana se amplificó utilizando las siguientes condiciones: 10 min a 95 °C seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos y hibridación y extensión a 60 °C durante 1 min. Los cambios en la fluorescencia se midieron en tiempo real durante el paso de extensión de la cadena de ADN. Se determinó el ciclo umbral (C_T) y la expresión génica relativa se expresó como:

$Fold\ Change = 2^{-\Delta(\Delta C_T)}$, donde $\Delta C_T = C_{T\ diana} - C_{T\ GAPDH}$ y $\Delta(\Delta C_T) = \Delta C_{T\ tratado} - \Delta C_{T\ control}$.

3.19. Western Blot

Los extractos de células o tejidos se prepararon mediante ciclos de congelación y descongelación (células) u homogeneización (tejidos) en un tampón que contenía NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, leupeptina 1 µg/ml, 1 µg /ml de aprotinina y 1 µg/ml de pepstatina (pH 7.4). Para cada condición experimental se usaron 50 µg de proteína (cuantificado por BCA como se ha indicado en apartados anteriores), que fueron desnaturizadas por tratamiento térmico (95 °C durante 10 min) en tampón *Laemmli* (Bio-Rad Laboratories S. A., Alcobendas, Madrid, España) con ditiotreitól 50 mM (Sigma Aldrich-Co, St. Louis, MO, EE. UU.). Los 50 µg de proteínas por condición experimental se resolvieron en geles SDS-PAGE al 12.5 %.

Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante un procedimiento de transferencia húmeda y éstas fueron incubadas con anticuerpos monoclonales antihumanos contra: Nrf2, γ -glutamylcisteína sintetasa (γ -GCL) o tiorredoxina (Trx) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EE. UU.) para su detección. Se usó anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante y quimioluminiscencia mejorada (sistema ECL, Amersham) para su detección. Las bandas de proteína se cuantificaron usando densitometría y *software* Image Lab (Bio-Rad Laboratories S. A., Alcobendas, Madrid, España). Para cuantificar las proteínas de cada condición experimental, se midió la densidad relativa de cada banda del *Western Blot*, y a su vez, este valor se normalizó frente al estándar interno (los anticuerpos monoclonales usados como control fueron anti-histona humana 3, anti-tubulina o anti-glucosa-6P-deshidrogenasa (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EE. UU.).

3.20. Análisis estadístico

Los cálculos, así como las representaciones gráficas, se realizaron mediante el programa *Microsoft Office Excel*. Para el análisis estadístico de los resultados que se presentan en este trabajo se utilizó el programa informático *GraphPad Prism 5.0* para Windows.

Los resultados han sido expresados, generalmente, como las medias de los datos recolectados $\pm$ las desviaciones estándar. Los datos obtenidos en los experimentos se analizaron mediante un análisis de la varianza ANOVA y la homogeneidad de las varianzas se analizó con el test de Tukey. La hipótesis nula se rechazó para todos aquellos valores de los test en los que el valor F era significativo con un p-valor menor de 0.05.

Resultados

4. Resultados

4.1. Efectos del Pter y el Resv frente a la exposición aguda a radiación UVB

Con el objeto de evaluar la capacidad fotoprotectora de los estilbenos, los animales de experimentación fueron sometidos a una irradiación aguda de 360 mJ/cm², dosis que equivale al doble de la dosis eritematosa mínima de UVB en la cepa de ratones utilizada (Tan et al., 1970). Los animales fueron tratados tópicamente con Pter o Resv 20 min antes o después del tratamiento. El tratamiento pre y post-irradiación consistió en liposomas vacíos (vehículo control), liposomas con Pter y liposomas con Resv, como principios activos. Como se muestra en la figura 20, la exposición a la radiación UVB en los ratones no tratados (control positivo) y en los tratados con liposomas sin polifenoles (vehículo control) originó alteraciones fenotípicas cutáneas notables: incremento del pliegue cutáneo y grosor de la piel (figura 20), aumento del espesor epidérmico (figura 20 y figura 21) y eritema (figura 22). El aumento de estos parámetros directamente relacionados con el proceso inflamatorio se minimizó en los animales tratados tópicamente con liposomas de Pter o Resv (figura 20, 21 y 22). Además, con la exposición aguda a la radiación UVB aguda, la piel se arrugaba visiblemente debido a la inflamación (figura 22). Es conveniente destacar que el efecto protector de los estilbenos fue significativamente mejor en el grupo de animales tratados previamente a la irradiación (figura 20 y 21).

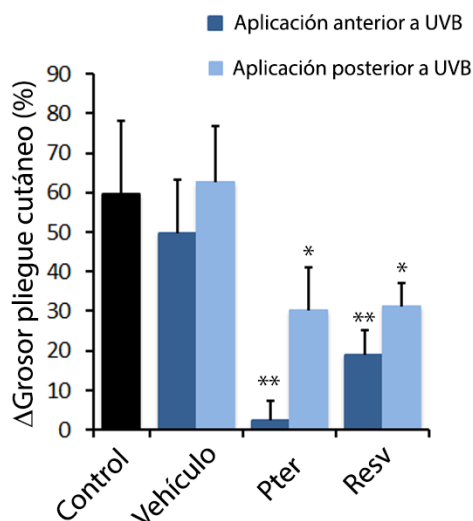


Figura 20: Grosor del pliegue cutáneo de ratones sometidos a radiación UVB aguda. El grosor del pliegue de la piel fue medido con un pie de rey electrónico 24 h después de la irradiación con UVB en ratones de todos los grupos experimentales: Control positivo (solo irradiados con UVB), vehículo (tratados con liposomas vehículo vacíos e irradiados), Pter (animales tratados con liposomas ricos en Pter 1 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ pre y postirradiación) y Resv (tratados con liposomas ricos en Resv 1 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ pre y postirradiación).

Los datos se representan como el promedio $\pm$ desviación estándar ($n = 10$ por grupo experimental). Se utilizó el análisis estadístico ANOVA seguido de test de Tukey para valorar las diferencias significativas entre los grupos. *p-valor < 0.05 y **p-valor < 0.01 comparando todos los grupos irradiados frente a ratones de control positivo irradiados con UVB (Figura 20).

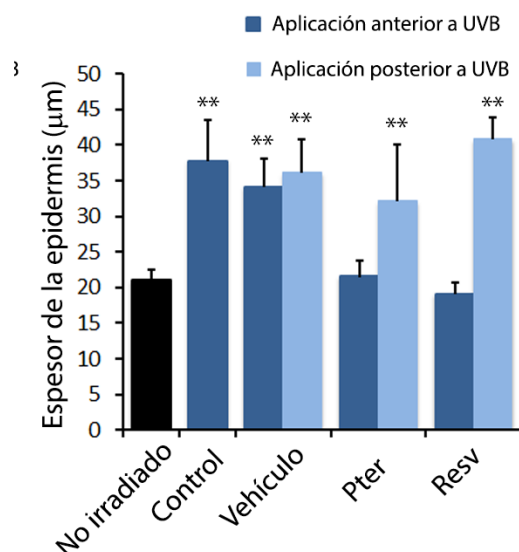


Figura 21: Espesor de la Epidermis de ratones sometidos a radiación UVB aguda. El espesor de la epidermis se midió con el software ImageJ en imágenes de preparaciones de ratones de todos los grupos experimentales mencionados en la figura 20.

Los datos se representan como el promedio $\pm$ desviación estándar ($n = 10$ por grupo experimental). Se utilizó el análisis estadístico ANOVA seguido de test de Tukey para valorar las diferencias significativas entre los grupos. *p-valor < 0.05 y **p-valor < 0.01 comparando todos los grupos irradiados frente a ratones control no irradiados (Figura 21).

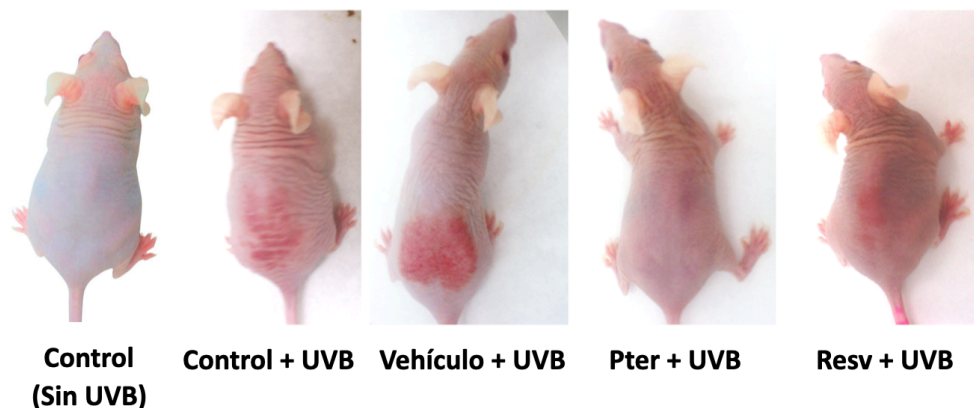


Figura 22. Eritema en ratones tras exposición aguda a UVB. Puede observarse el eritema inducido por UVB una semana después del tratamiento tópico y la irradiación. Grupos experimentales: ratones control sin irradiar, Control+UVB (irradiados con UVB), Vehículo+UVB (tratados con liposomas vehículo vacíos e irradiados), Pter+UVB y Resv+UVB (pretratados con el estilbeno correspondiente e irradiados con UVB). Cada grupo experimental tuvo una $n = 20$.

Mediante análisis histológico, se midió el espesor de la epidermis una semana después de someter a los animales a la radiación UVB. Además del aumento en el espesor de la epidermis se observó una hiperplasia evidente (figura 23), parámetros relacionados con el fotoenvejecimiento. Como se muestra en las figuras 20, 22 y 23, la aplicación tópica de Pter ejerció una mejor protección que la de Resv.

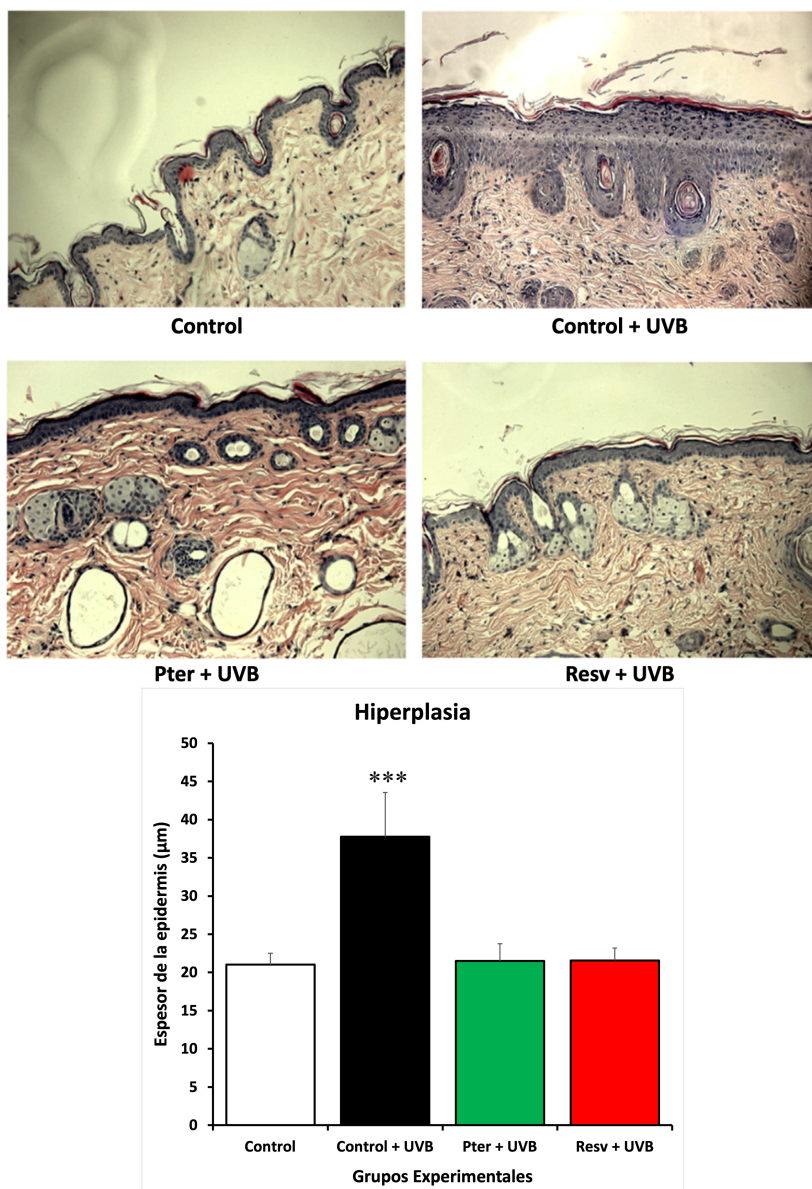


Figura 23. Histología tras exposición aguda a UVB. Tinciones histológicas cutáneas, realizadas con hematoxilina y eosina, de muestras de piel representativas obtenidas de ratones de cada uno de los diferentes grupos experimentales (muestras cogidas una semana después de la administración de UVB). Cada grupo experimental tuvo una $n = 5$, y en las gráficas se representa el análisis estadístico con los siguientes símbolos * p -valor < 0.05 y *** p -valor < 0.0001 comparando todos los grupos irradiados frente a ratones de control.

Como hemos comentado anteriormente, es de vital importancia fisiológica la función protectora que ejerce la piel contra agentes físicos y químicos externos. A parte de la protección frente a elementos externos, también se encarga de regular la pérdida de agua transepidérmica (*TEWL*, por sus siglas en inglés, *transepidermal water loss*) (Indra & Leid, 2011). La pérdida de agua transepidérmica para una piel sana se estima en unos 100 - 150 mL/día/m². En condiciones fisiológicas, la relación entre hidratación y permeabilidad produce una pérdida de agua transepidérmica prácticamente que permite mantener un nivel de hidratación constante. En el momento en que la barrera cutánea se ve alterada, no solo se corre un mayor riesgo de sufrir infecciones, sino que también se produce un aumento de la pérdida de agua transepidérmica y una disminución de la hidratación, lo que da lugar a una piel seca, a descamación y a irritación cutánea. En estado fisiológico normal, la piel es capaz de mantener un balance hídrico constante y de disminuir la permeabilidad y pérdida de agua, pero si sufre algún problema la barrera cutánea se puede incrementar la pérdida de agua transepidérmica. Debido a la importancia de este parámetro para evaluar/cuantificar el estado de la barrera de permeabilidad epidérmica de la piel tras la irradiación con UVB, se midió la *TEWL* en ratones control (sin irradiar) y ratones sometidos a exposición UVB (Indra & Leid, 2011). Los resultados de la medición de *TEWL* indican que ésta aumentó en ratones tratados con UVB (dosis aguda), siendo 18 ± 3 g/m² x h, 24 horas después de la irradiación UVB, frente a 8 ± 2 g/m² x h en ratones control no irradiados ($n = 7$ en ambos casos, $p < 0.01$) (figura 24). Los valores de *TEWL* obtenidos en ratones tratados con Pter o Resv y UVB no fueron significativamente diferentes de los medidos en ratones control no irradiados, demostrando así su potente efecto contra los efectos nocivos de la exposición aguda a radiación UVB.

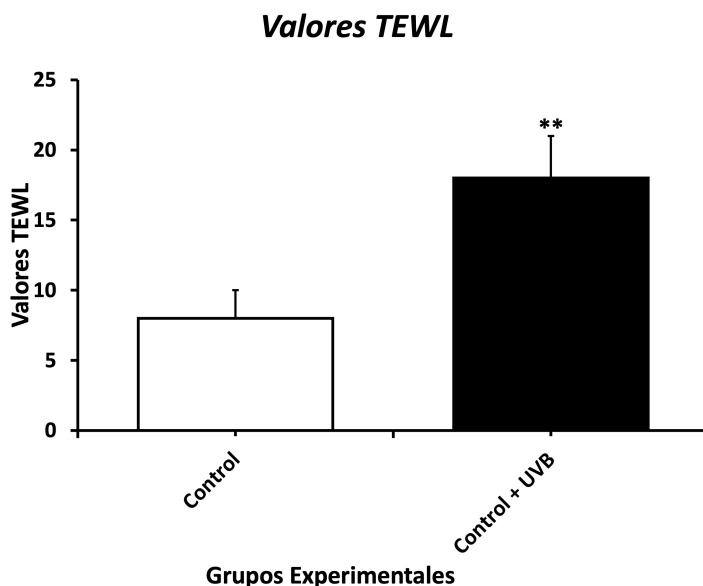


Figura 24. Valores de TEWL. Valores de TEWL de los grupos experimentales Control (No UVB) y Control + UVB. Cada grupo experimental tuvo una $n = 7$, y en las gráficas se representa el análisis estadístico con los siguientes símbolos *p-valor < 0.05 y **p-valor < 0.01 comparando todos los grupos irradiados frente a ratones de control.

Debido a que en estos experimentos iniciales vimos que el tratamiento con estilbenos posterior a la irradiación mostró un reducido poder protector frente a la aparición de lesiones en la piel (figura 20, figura 21, figura 22 y figura 23) y que, por tanto, el potente efecto preventivo frente al desarrollo de lesiones tumorales cutáneas era ofrecido y debido al tratamiento tópico previo a la irradiación de los animales de experimentación, los trabajos experimentales de esta tesis siguientes se realizaron tratando a los animales con los polifenoles previamente a ser sometidos a radiación UVB.

4.2. Análisis de la capacidad de los polifenoles de actuar como filtro físico

Ante la posibilidad de que el efecto fotoprotector mostrado por el Pter y el Resv fuera debido a una acción como filtro físico se determinó el FPS a partir de los datos de absorbancia de ambos polifenoles. La figura 25 muestra los espectros de absorción en el rango de radiación UV-visible.

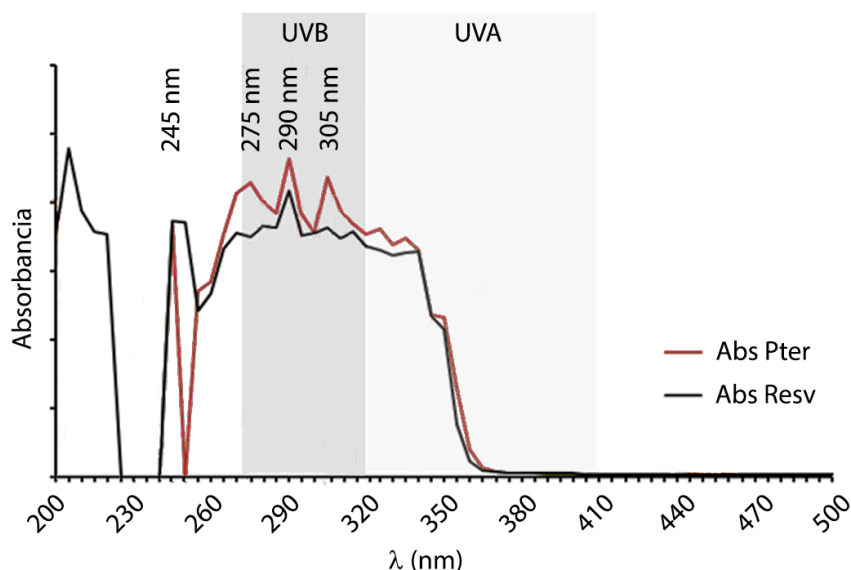


Figura 25. Absorbancia del Pter y el Resv. En esta figura mostramos el espectro de absorbancia para el Pter y el Resv. Los FPS para el Pter y Resv medidos mediante espectrofotometría.

El FPS se calcula en una escala de 0 a 50 y se obtuvieron unos resultados muy similares para ambos polifenoles, siendo éstos de 2.95 ± 0.37 para el Pter y de 3.60 ± 0.42 para el Resv (Figura 26).

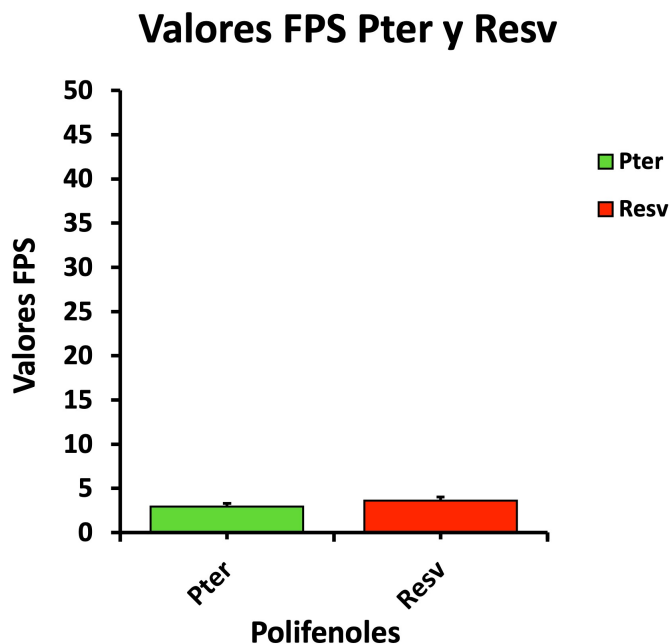


Figura 26. Valores de FPS del Pter y del Resv. Representación del valor del FPS del Pter y el Resv. Los FPS para el Pter y Resv (con una $n = 5$ en cada caso en este ensayo) sobre una escala de 0 a 50. Los datos representados son el promedio $\pm$ la desviación estándar.

Estos resultados se muestran en la figura 26 y nos permiten concluir que un efecto físico directo no puede ser el mecanismo responsable de la protección de la piel frente a la radiación UVB ofrecida por los polifenoles estudiados.

4.3. El Pter, pero no el Resv, previene la carcinogénesis cutánea inducida por la exposición crónica a radiación UVB

Las lesiones cutáneas inducidas por la exposición crónica a radiación UVB son una de las principales causas de carcinogénesis cutánea. Debido al carácter fotoprotector del Pter y del Resv se planteó estudiar comparativamente el posible efecto anticarcinogénico de los polifenoles.

En la figura 27 pueden observarse los efectos de la aplicación tópica de los estilbenos y de la radiación crónica de radiación UVB (3 veces por semana durante 30 semanas 180 mJ/cm²). Aunque el Resv retrasó la aparición del número de tumores en los animales de experimentación respecto a los ratones que no fueron tratados con el polifenol, su capacidad fotoprotectora fue considerablemente menor a la del Pter (Figura 27). Tras las 30 semanas de experimentación, únicamente 2 de los animales del grupo pretratado con Pter desarrollaron tumores, frente al 100% de los animales pretratados con Resv tras 24 semanas (figura 27).

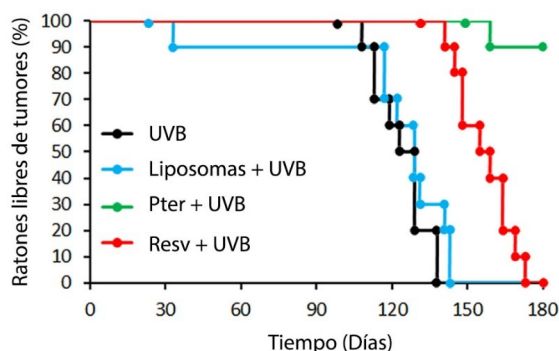


Figura 27. Kaplan-Meier. Incidencia de tumores (% de ratones libres de tumores) (n = 20). Los datos mostrados indican que no hay una diferencia significativa entre los grupos de Control + UVB y Vehículo + UVB por una parte; mientras que en Pter + UVB y Resv + UVB la incidencia es menor, siendo insignificante en el grupo de Pter + UVB y más tardía en el grupo Rev + UVB (aunque también desarrollaron tumores los ratones tratados con Resv + UVB).

En la figura 28 pueden observarse imágenes representativas del aspecto cutáneo de los animales tras 30 semanas desde el inicio del experimento. En esta figura 28 podemos apreciar perfectamente y con claridad que los ratones sin tratamiento tópico e irradiados con UVB y los ratones tratados con liposomas vacíos (sin principio activo) desarrollaron una gran cantidad de tumores y tuvieron un gran desarrollo. Por el contrario, los ratones a los que se les aplicó Resv $1 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ desarrollaron varios tumores, pero más tardíamente (figura 27) y de menor tamaño al final del experimento. Asimismo, podemos observar que los ratones tratados con tópicamente con Pter e irradiados no desarrollaron ningún tumor en el 90% de los casos (figura 28).

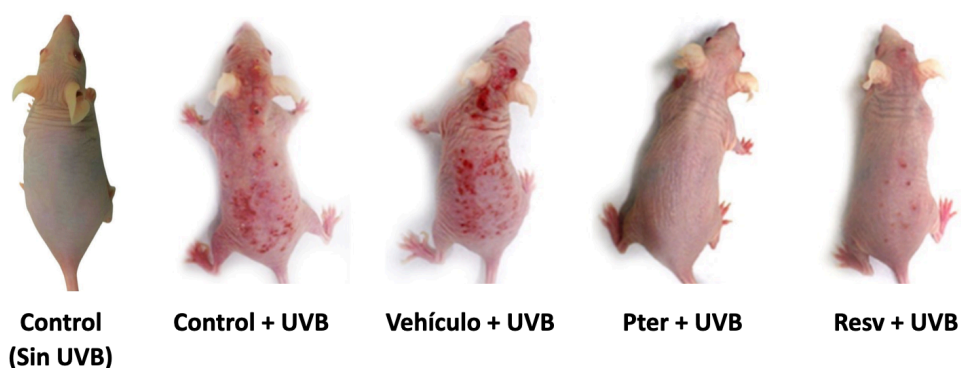


Figura 28. Fotos de los ratones tras exposición crónica a UVB. Fotos representativas de los ratones de los distintos grupos experimentales irradiados al finalizar los tratamientos correspondientes tras 30 semanas ($n = 20$). El control corresponde a un animal no sometido a radiación UVB.

El número de carcinomas de piel cuantificables macroscópicamente en los ratones irradiados, independientemente que no hubieran sido tratados o tratados con liposomas vacíos o con Resv, fue siempre mayor de 10. Sin embargo, el número de carcinomas encontrados en los ratones irradiados y tratados con Pter fue solo 1 tumor en dos animales (figura 29). En la figura 29 puede observarse el número promedio de tumores que aparecieron por ratón. Debido a la densidad y tamaño de los tumores y su solapamiento con el tiempo, hecho que imposibilitaba discernirlos como unidades independientes, se identificaron claramente hasta un máximo de 25

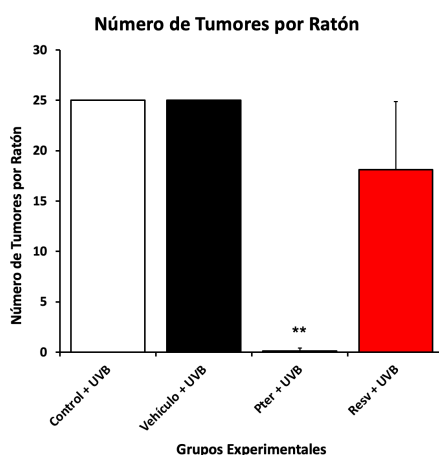


Figura 29. Número promedio de tumores/ratón tras exposición crónica a UVB. Número promedio de tumores desarrollados en cada ratón de cada grupo experimental irradiado, hasta un máximo de 25 tumores por ratón.

Cada grupo experimental tuvo una $n = 20$, y en las gráficas se representa el análisis estadístico con los siguientes símbolos * p -valor $< 0,05$ y ** p -valor $< 0,01$ comparando todos los grupos irradiados frente a ratones de control.

tumores/animal (figura 29).

Las carcinogénesis cutáneas se asocian con una fuerte hiperplasia (figura 30) e infiltración linfocitaria, lo que se aprecia mediante la tinción con hematoxilina y eosina (figura 30).

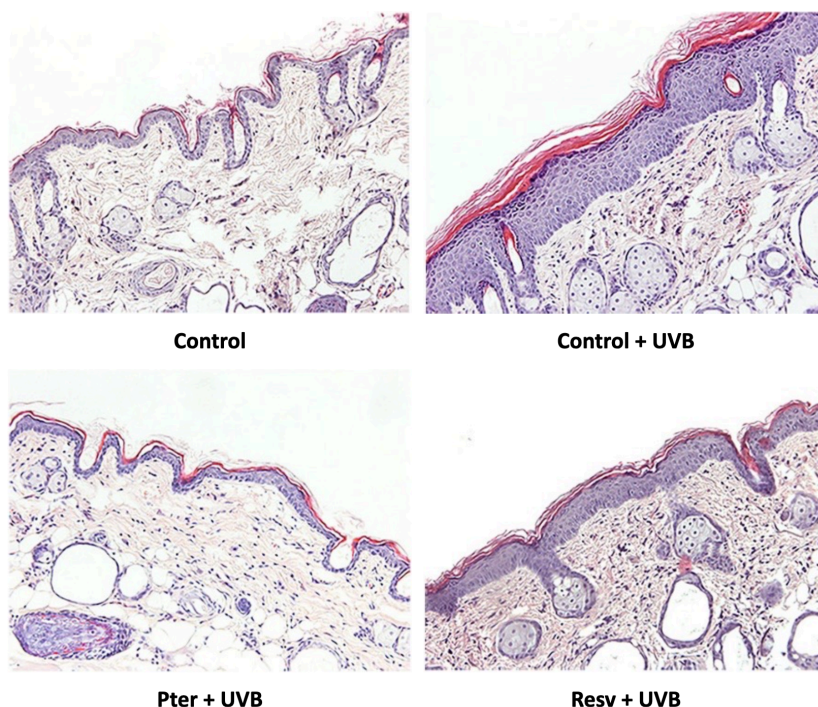


Figura 30. Histología tras exposición crónica a UVB. Imágenes de tinciones con hematoxilina y eosina de muestras representativas de ratones de los grupos experimentales Control (No UVB), Irradiado con UVB ($\pm$ liposomas vehículo sin polifenoles), tratado con Pter + UVB y, por último, tratado con Resv + UVB (semana 24 de tratamiento).

Un dato interesante con respecto a los animales tratados con Pter es que tras 4 meses después de terminar el tratamiento (30 semanas), ninguno de los ratones libres de tumores desarrolló carcinomas de piel .

4.4. Análisis de la capacidad antioxidante endógena polifenólica

Debido a la estrecha relación entre los procesos carcinogénicos cutáneos y el estrés oxidativo originado por la radiación UVB, se planteó la posibilidad de que los efectos antitumorales mostrados anteriormente fueran causa del poder antioxidante endógeno que presentan los estilbenos sujetos a estudio. Para tal fin se evaluó la capacidad antioxidante equivalente a Trolox, técnica comúnmente utilizada en la determinación de la capacidad antioxidante de una sustancia basada en la decoloración del ABTS. En la figura 31 puede observarse la diferente capacidad antioxidante endógena del Pter y del Resv, siendo superior para éste último.

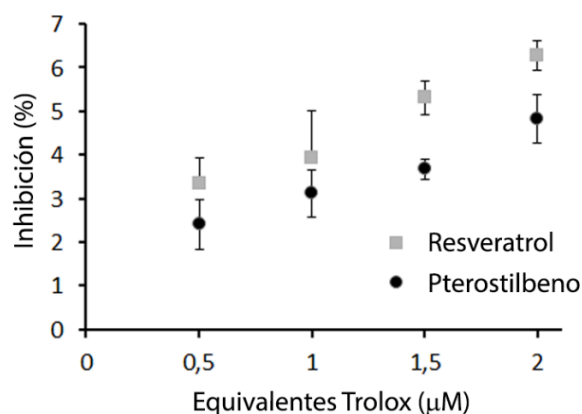


Figura 31. Ensayo antioxidante Trolox. Efecto eliminador de radicales libres del Pter y el Resv en un ensayo libre de células (Trolox) (n = 5).

4.5. Determinación del daño oxidativo

4.5.1. Efecto sobre proteínas

Para detectar alteraciones oxidativas originadas por la radiación UVB e identificar el posible efecto protector a nivel proteico inducido por los polifenoles sujetos a estudio se evaluó la carbonilación proteica. La radiación UVB puede originar dicha carbonilación por la escisión oxidativa del esqueleto proteico, la oxidación directa de varios aminoácidos o la unión de aldehídos producidos por la peroxidación lipídica. Puede observarse en la figura 32 como la radiación UVB induce un aumento en la cantidad de proteínas carboniladas y como el tratamiento con Pter redujo los niveles a prácticamente valores control. También puede apreciarse que los efectos protectores inducidos por el Resv son ligeramente menores que los del Pter.

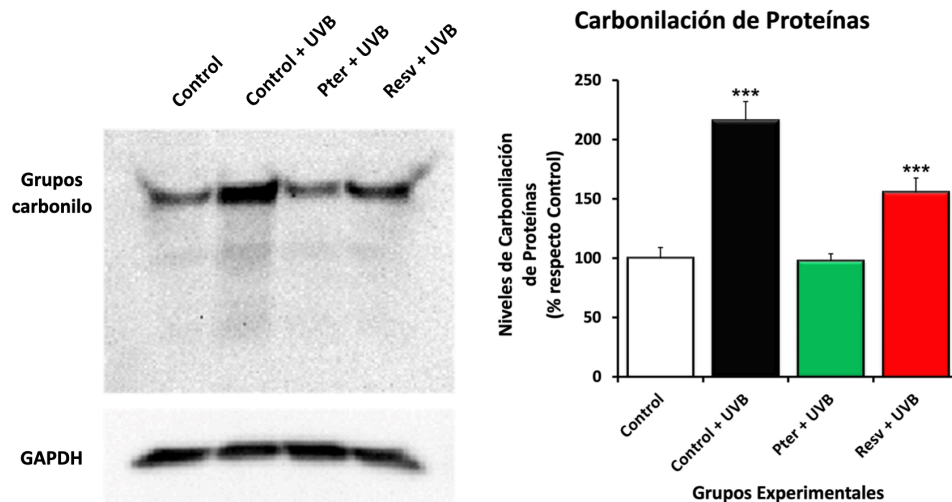


Figura 32. Análisis de oxidación proteica. Western blot de determinación de la carbonilación de proteínas con el histograma correspondiente a la cuantificación de las imágenes de Western blot mediante el software ImageJ. Cada grupo experimental tuvo una $n = 3$, y en las gráficas se representa el análisis estadístico con los siguientes símbolos *p-valor < 0.05 y ***p-valor < 0.01 comparando todos los grupos irradiados frente a ratones de control (No UVB).

4.5.2. Efectos sobre lípidos

De forma análoga se analizó el posible daño oxidativo inducido por la radiación UVB sobre los lípidos de la piel. Los isoprostanos son compuestos similares a las prostaglandinas formados *in vivo* a partir de peroxidación de ácidos grasos esenciales, catalizada por radicales libres. Como biomarcador de estrés oxidativo lipídico se utilizó concretamente el 8-isoprostano u 8-epi-prostaglandina F2 α , el isoprostano más importante derivado de la peroxidación lipídica del ácido araquidónico. Nuestros resultados indican que la radiación UVB incrementa significativamente los niveles de 8-isoprostano, mientras que la aplicación polifenólica previa de los animales de experimentación es capaz de revertir este aumento hasta niveles similares a los de los animales no irradiados. Al igual que en el caso de la carbonilación proteica, el efecto protector del Pter es superior al del Resv (figura 33).

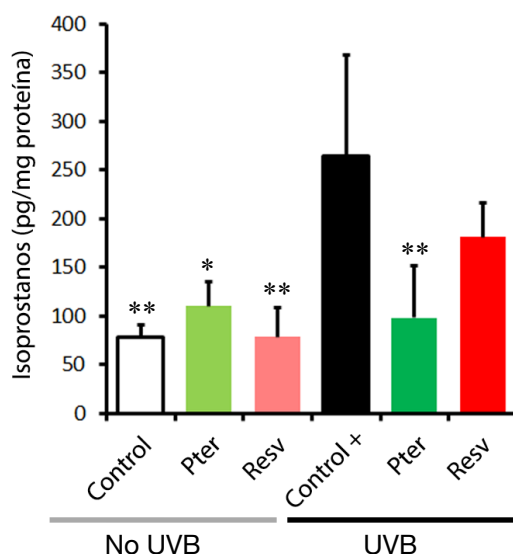


Figura 33. Evaluación de peroxidación lipídica. Resultado de la determinación de isoprostanos en los distintos grupos experimentales tanto irradiados con UVB como no irradiados. Cada grupo experimental tuvo una $n = 10$, y en las gráficas se representa el análisis estadístico ANOVA y el test de Tukey con los siguientes símbolos: *p-valor < 0.05 y **p-valor < 0.01 comparando los grupos frente a ratones control + (UVB).

4.5.3. Efectos sobre el ADN

Para la determinación sobre el daño infligido por la radiación UVB sobre el ADN se evaluaron los niveles del biomarcador de estrés oxidativo 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-2'dG). En la figura 34 se aprecia como la radiación UVB incrementa notablemente los niveles de 8-OH-2'dG en el grupo control irradiado y cómo el tratamiento con los polifenoles disminuyen sensiblemente el daño inducido sobre el ADN, aunque sin recuperarse los valores control.

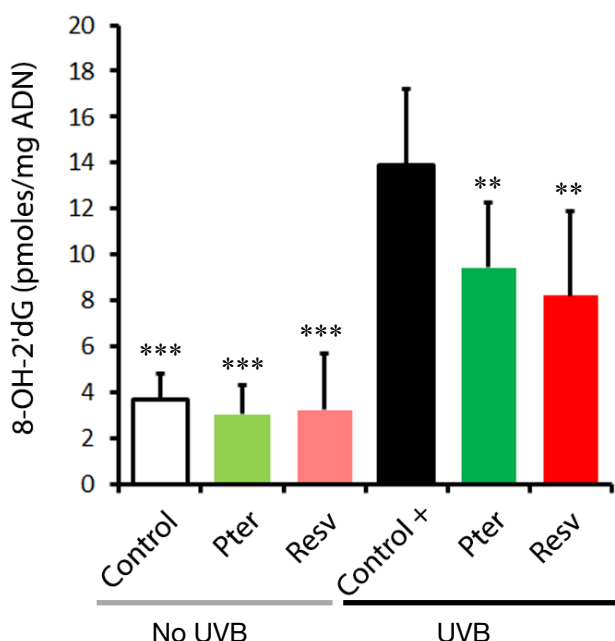


Figura 34. Determinación oxidación del DNA. Resultado de la determinación de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-2'dG) en los distintos grupos experimentales tanto irradiados con UVB como no irradiados. Cada grupo experimental tuvo una $n = 10$, y en las gráficas se representa el análisis estadístico ANOVA y el test de Tukey con los siguientes símbolos: **p-valor < 0.01 y ***p-valor < 0.001 comparando los grupos frente a ratones de control + (UVB).

4.6. Análisis de las defensas antioxidantes endógenas a nivel cutáneo

4.6.1. Glutación

El GSH es el tiol no proteico con propiedades antioxidantes más abundante en las células de mamífero y, por ello, tiene una gran importancia en la fisiología celular. Para evaluar como se veía afectado el estatus redox por la radiación UVB y el tratamiento polifenólico en homogenados de piel se midieron los niveles de GSH, cuyos resultados se muestran en la figura 35.

Puede observarse como la radiación UVB disminuyó notablemente los niveles de GSH, reduciendo las defensas contra el estrés oxidativo celular. Además el nivel de GSH se ve aumentado con el tratamiento previo a la irradiación con ambos estilbenos (figura 35).

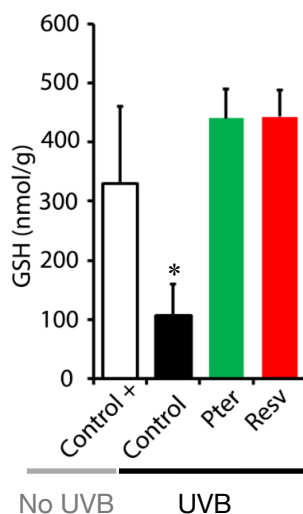


Figura 35. Cuantificación del GSH en piel. Efectos de los estilbenos estudiados sobre la cantidad de GSH (en relación con el número de capas de células epidérmicas), expresado en nmol/g.

Cada grupo experimental tuvo una $n = 10$, y en las gráficas se representa el análisis estadístico con los siguientes símbolos *p-valor < 0.05 comparando todos los grupos irradiados frente a ratones de control.

4.6.2. Análisis de expresión y actividad enzimática antioxidante

Con el objetivo de evaluar la contribución de los polifenoles en la defensa contra el estrés oxidativo originado por la radiación UVB, se determinaron las expresiones y actividades de las principales enzimas antioxidantes. La radiación UVB disminuyó la expresión génica (figura 36) y la actividad enzimática (figura 37) tanto de la CAT como de la SOD en comparación con la condición Control sin irradiar. Dicho efecto fue revertido con el tratamiento con Pter, alcanzándose valores sin diferencias estadísticas con los animales no irradiados. El efecto mostrado por el Resv tanto a nivel de expresión como sobre la actividad enzimática fue moderado ya que no se observaron diferencias significativas con respecto los efectos observados en el control positivo. Por lo que respecta a los resultados obtenidos en la medición tanto de la expresión génica como de la actividad enzimática de la GPx, partíamos de niveles relativamente bajos, que fueron incrementados por efecto de la exposición a radiación UVB. De esta manera, al igual que sucedió con las determinaciones de la CAT y la SOD, el tratamiento con Pter restauró unos niveles de actividad enzimática y expresión muy similares a las del grupo control sin irradiar (No UVB). Sin embargo, no sucedió lo mismo con el tratamiento con Resv, ya que los valores obtenidos no diferían significativamente de los del grupo Control + irradiado con UVB. A continuación se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de la expresión en la Figura 36 y de las actividad enzimáticas en la Figura 37 de los enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPx.

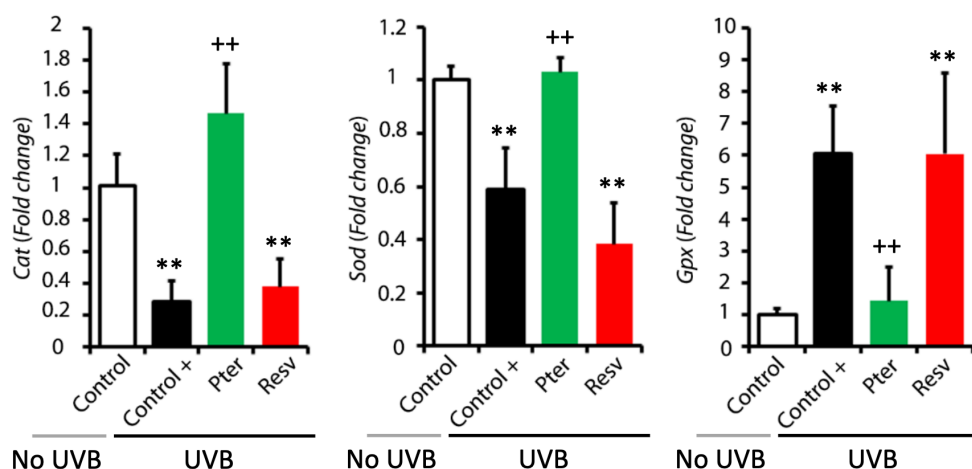


Figura 36. Expresión génica de enzimas antioxidantes. Efectos del tratamiento tópico con Pter y Resv previos a la irradiación sobre la expresión génica de los genes codificantes de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPx. Cada grupo experimental tuvo una $n = 10$, y en las gráficas se representa el análisis estadístico con los siguientes símbolos *p-valor < 0.05 y **p-valor < 0.01 comparando todos los grupos irradiados frente a ratones control. ++ p-valor < 0.01 comparando ratones tratados con Pter o Resv irradiados con UVB frente al grupo control +.

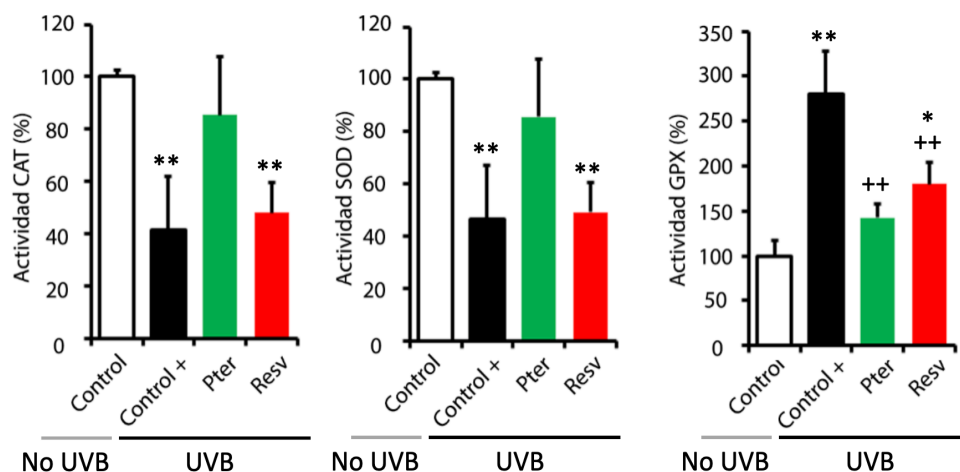


Figura 37. Actividad enzimática de enzimas antioxidantes. Efectos del tratamiento tópico con Pter y Resv previos a la irradiación sobre las actividades enzimáticas de los enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPx. Cada grupo tuvo una $n = 10$, y en las gráficas se representa el análisis estadístico con los siguientes símbolos *p-valor < 0,05 y **p-valor < 0,01 comparando todos los grupos irradiados frente a ratones control. ++ p-valor < 0.01 comparando ratones tratados con Pter o Resv irradiados con UVB frente al grupo control +.

Estos resultados indican que la aplicación tópica preventiva de Pter es capaz de mitigar la reducción considerable de las actividades enzimáticas CAT y SOD provocada por la exposición crónica a radiación UVB, rescatando los niveles tanto de expresión como de actividad enzimática a los del grupo experimental control no irradiado, y, por tanto, previniendo el estrés oxidativo causado por la radiación. Por el contrario, el Resv no presentó este tipo de efecto antioxidante y no fue capaz de rescatar los niveles de expresión génica y actividad de estas enzimas en cuestión.

4.7. Análisis farmacocinético cutáneo y plasmático del Pter tras su administración tópica

Como se ha mostrado, el Pter posee una acción anticarcinogénica superior a la de su análogo estructural Resv. Además, el Pter moduló la expresión y actividad de las principales enzimas antioxidantes celulares. Con el objeto de profundizar en los mecanismos moleculares fotoprotectores desencadenados por el Pter se realizaron un conjunto de ensayos *in vitro*. Para ello, en primer lugar, sabiendo que la biodisponibilidad de este tipo de compuestos es baja, se determinó el tiempo de vida media del Pter en piel y plasma tras su aplicación tópica. Esta determinación permitió extrapolar los tiempos y concentraciones de tratamiento en los que el Pter no se ha metabolizado a los ensayos realizados en cultivo celular.

Los niveles de Pter en la piel y el plasma fueron de aproximadamente 150 $\mu\text{mol/kg}$ de peso húmedo dentro de las primeras 6 h después de la administración tópica (figura 38). Estos valores fueron decayendo durante las siguientes 6 horas, siendo mínimos pero detectables hasta 24 horas tras la aplicación tópica del estilbeno a una concentración de 1 $\mu\text{mol/cm}^2$.

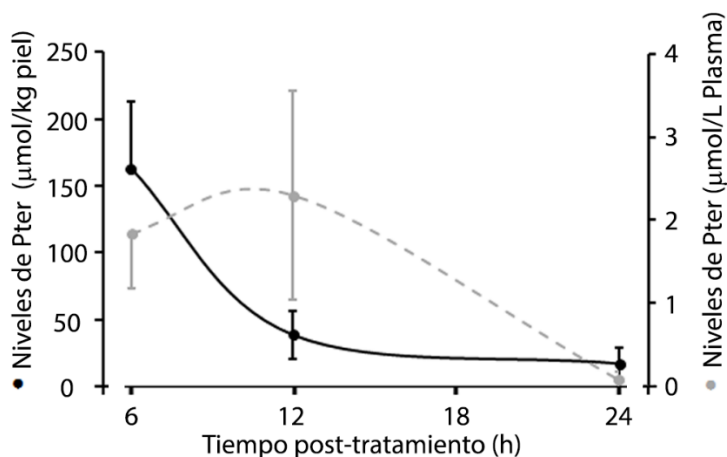


Figura 38. Análisis farmacocinético el Pter en piel. Niveles de Pter en la piel y el plasma de ratones a diferentes tiempos tras su aplicación (Pter 1 $\mu\text{mol/cm}^2$). El tamaño muestral de estos experimentos fue de $n = 5$.

Además, se determinó la biodisponibilidad en piel tanto del Pter como de sus metabolitos: Pter glucuronidado y Pter sulfatado. Como se ha indicado, los niveles de Pter en la piel tras 12 horas de aplicación tópica se ven notablemente disminuidos (figura 39). A su vez puede observarse como los niveles plasmáticos del estilbeno van aumentando progresivamente debido a su absorción y distribución sistémica. A partir de las 12 horas, la disminución de los niveles de Pter a nivel cutáneo influye en que los valores plasmáticos se vayan reduciendo progresivamente (figu-

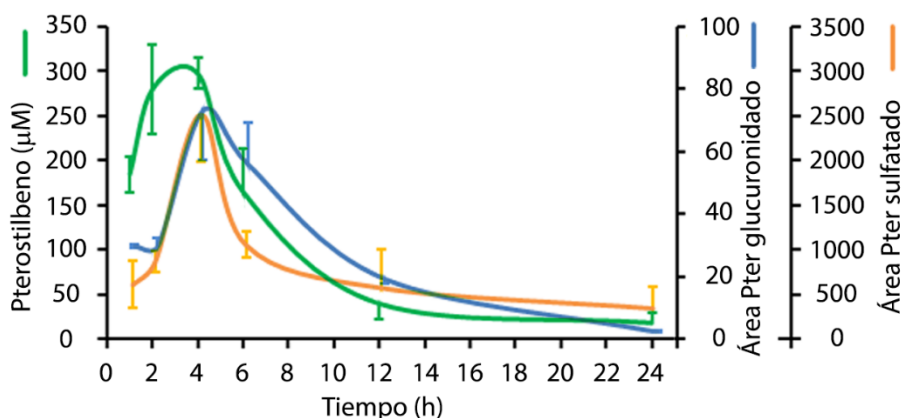


Figura 39. Biodisponibilidad del Pter en piel. Biodisponibilidad del Pter y sus metabolitos en la piel de ratones no irradiados a lo largo del tiempo, hasta 24h post-aplicación tópica (Pter 1 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$). El tamaño muestral de estos experimentos fue de $n = 5$.

ra 39).

En la figura 39 se muestran los niveles de Pter cutáneos así como los principales productos de su metabolismo derivados de reacciones de glucuronidación y sulfatación. En la gráfica puede apreciarse como los niveles del estilbeno en la epidermis van aumentando hasta las 4 horas aproximadamente indicando su absorción. Puede observarse como la absorción del Pter se corresponde con una degradación paulatina del Pter, detectándose a nivel cutáneo tras la absorción de éste, sus derivados glucuronidados y sulfatados.

4.8. Citotoxicidad del Pter *in vitro* en células HaCaT

Paralelamente a los experimentos *in vivo*, ya explicados anteriormente, se realizaron experimentos *in vitro* con el objetivo de evaluar si el tratamiento con Pter podía causar algún tipo de efectos citotóxicos sobre células HaCaT. Para ello, las células fueron sometidas a diferentes concentraciones de Pter. Las concentraciones testadas fueron 0, 10 μM , 20 μM y 50 μM , y los resultados se presentan en la Figura 40.

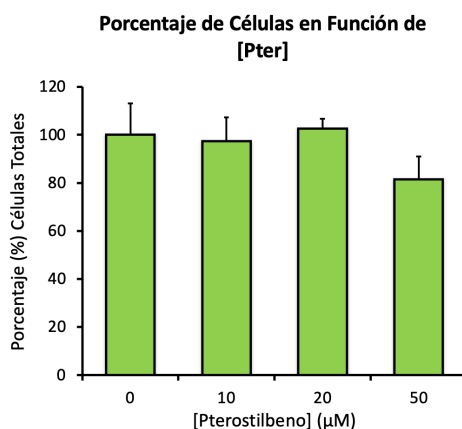


Figura 40. Ensayo de citotoxicidad del Pter. Porcentaje de células en cultivo en función de la concentración de Pter en cultivos celulares de células HaCaT (n = 10).

Los resultados que podemos observar en la Figura 40 indican que las concentraciones 10 μM y 20 μM son capaces de no producir citotoxicidad en las células sometidas a estudio.

4.9. Mecanismo molecular implicado en la acción antioxidante del pterostilbeno

Es conocido que el factor de transcripción Nrf2 regula la expresión basal e inducible de una amplia gama de genes de enzimas antioxidantes y de fase II como la de la CAT, la SOD, la GPx, la hemooxigenasa-1, la NAD(P)H quinona oxidoreductasa y la γ -glutamato-cisteína ligasa (γ GCL), por citar algunos de ellos. Cuando está inactivo, este factor de transcripción permanece en el citoplasma unido a la proteína Keap1 y a la ubiquitina ligasa Cul3, impidiendo su translocación nuclear y regulando su degradación por el proteasoma. En condiciones de estrés oxidativo se produce la disociación de Keap1 y Nrf2 se acumula en el núcleo transactivando el elemento de respuesta antioxidante (ARE, por sus siglas en inglés de *antioxidant response element*) en la región promotora de los genes diana (Pervaiz & Holme, 2009). Por esta razón, investigamos el papel potencial del Pter sobre la inducción de Nrf2, como regulador clave de la respuesta antioxidante y en la protección de las células de la piel contra el daño inducido por los rayos UVB.

Los queratinocitos son el tipo de célula predominante en la epidermis, la capa más externa de la piel, constituyendo el 90 % de las células que se encuentran en dicha ubicación tisular. Así pues, realizamos un conjunto de experimentos *in vitro* con células HaCaT, una línea de queratinocitos humanos utilizados habitualmente en investigación por su alta capacidad de diferenciación y proliferación en cultivo *in vitro*, para analizar el papel de Nrf2.

Para los experimentos *in vitro* se utilizó Pter y no sus metabolitos, pues se ha demostrado en diversas ocasiones que el Pter es biológicamente más activo que sus metabolitos glucuronidados y sulfatados (Estrela et al., 2013). Como se muestra en la Figura 41, la translocación de Nrf2 al núcleo aumenta a medida que aumenta la concentración de Pter añadido (dentro del intervalo de biodisponibilidad de Pter en la piel) en células HaCaT cultivadas.

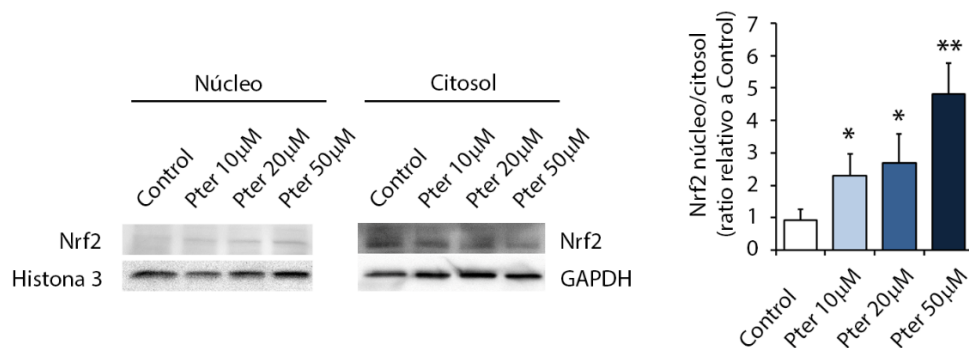


Figura 41. Ensayo de activación de Nrf2 meditada por Pter en células HaCaT. En esta Figura 41 demostramos que el Pter promueve la activación de Nrf2 en las células HaCaT mediante un ensayo de western blot. Se añadió Pter a células HaCaT cultivadas 24 h después de la siembra. Aquí se muestra la detección de Nrf2 por western blot y su correspondiente densitometría. En las gráficas se representa el análisis estadístico ANOVA y el test de Tukey con los siguientes símbolos: * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ comparando cada valor con los controles ($n = 5$ en todas las condiciones).

Mediante experimentos de inmunotinción de fluorescencia, dónde cultivos celulares de células HaCaT fueron sometidos a tratamiento con Pter 20 μ M 24h después de ser sembradas, se confirmaron estos resultados de Nrf2 (Figura 42) mostrando un aumento de la fluorescencia ligada a Nrf2 nuclear en presencia de Pter (Figura 42).

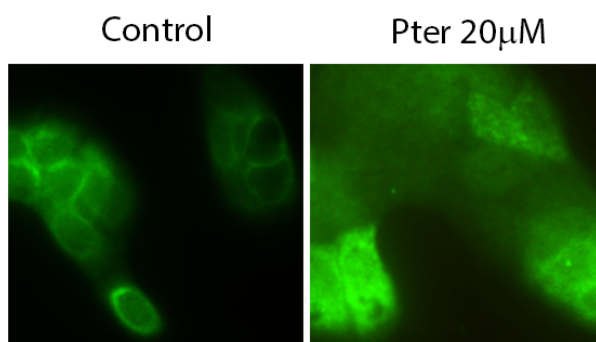


Figura 42. Ensayo de inmunofluorescencia de translocación nuclear de Nrf2 en células HaCaT. Imágenes de Microscopia de fluorescencia en las que demostramos que el Pter promueve la translocación de Nrf2 al núcleo en las células HaCaT mediante un ensayo de inmunofluorescencia. Se añadió Pter a células HaCaT cultivadas 24 h después de la siembra. Aquí se muestra la detección de Nrf2 por western blot, donde podemos ver una mayor intensidad de marca fluorescente en los núcleos de células tratadas con Pter.

De acuerdo con el aumento inducido por Pter en Nrf2 nuclear, también se detectó una mayor expresión de algunas moléculas dependientes de Nrf2, como son γ -GCL y Trx, en presencia de Pter (Figura 43). Asimismo, y en concordancia con el aumento de γ -GCL inducido por Pter, también se observó un aumento consecuente en los niveles de GSH intracelular (Figura 44), lo que sugiere una estrecha relación entre el efecto fotoprotector provocado por Pter y su capacidad para modular la respuesta antioxidante dependiente de Nrf2.

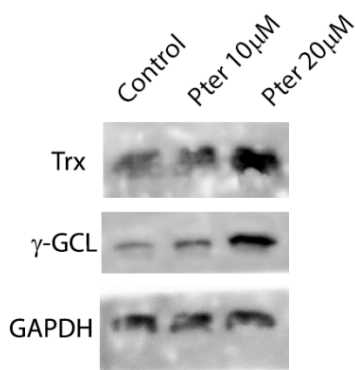


Figura 43. Expresión de moléculas dependientes de Nrf2. En esta Figura 43 vemos que el Pter promueve el aumento de la expresión de γ -GCL y Trx (moléculas dependientes de Nrf2) en las células HaCaT mediante un ensayo de western blot. Se añadió Pter a células HaCaT cultivadas 24 h después de la siembra.

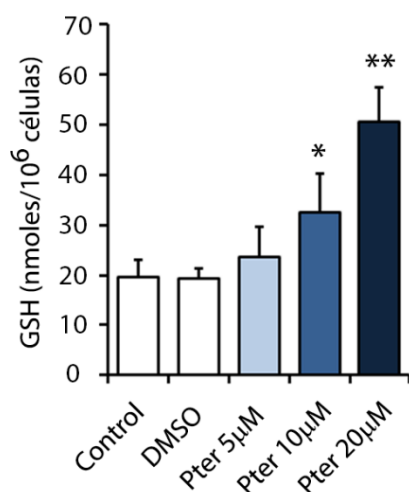


Figura 44. Cuantificación de la expresión de moléculas dependientes de Nrf2. En esta Figura 44 vemos los resultados del GSH medido en células HaCaT sometidas a tratamiento con Pter 24 h post siembra.

* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ comparando cada valor con los controles ($n = 5$ en todas las condiciones).

Discusión

5. Discusión

Los estudios epidemiológicos indican que la radiación UV solar es la principal responsable del desarrollo de tumores cutáneos y del fotoenvejecimiento (Berwick & Garcia, 2020; Salminen et al., 2022). La exposición de la piel a la radiación solar UV puede causar, dependiendo de la dosis, inflamación, estrés oxidativo, daño directo y daño mediado por ROS en el ADN, desregulación de las vías de señalización celular e inmunosupresión, todo lo cual promueve el cáncer de piel (Afaq et al., 2005). Así pues, en respuesta a la problemática creciente que representa el cáncer de piel en la población mundial, se ha propuesto a los polifenoles de origen vegetal, por sus propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladoras y anti-oxidantes, como uno de los grupos de moléculas más prometedores que pueden explotarse como agentes quimiopreventivos/terapéuticos para una variedad de trastornos de la piel, incluido el cáncer de piel (Asensi et al., 2011; Garg et al., 2020). De hecho, se han sugerido potenciales propiedades anticancerígenas y fotoprotectoras para diferentes polifenoles, incluidos los del té verde, las proantocianidinas de semilla de uva, el Resv, la silimarina, la luteolina o la genisteína (Farjadmand et al., 2021; Nichols & Katiyar, 2010). Asimismo, y a pesar de tener un FPS mínimo, el extracto de té que contiene EGCG tiene efectos protectores contra el daño del ADN y la inmunosupresión inducida por los rayos UV (en parte debido a su capacidad para reducir el estrés oxidativo, inhibir el factor proinflamatorio NF- κ B, y facilitar la reparación del daño del ADN) (Jia et al., 2023; Katiyar, 2011; Matsui et al., 2009; Morley et al., 2005).

Se ha demostrado que el Pter es tan potente como el Resv en la inhibición de NF- κ B, AP-1, COX-2 e iNOS activados con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) en la epidermis de ratón (Cichocki et al., 2008), y que también es capaz de inhibir potentemente la carcinogénesis cutánea de ratón inducida por 7,12-dimetil-benz[a]antraceno/TPA (Tsai et al., 2012). Como se muestra en esta tesis doctoral, la aplicación tópica de Pter es claramente superior a la de Resv en la prevención de daños agudos y crónicos en la piel inducidos por la radiación UVB. En la figura 27

podemos ver que el Resv no pudo ejercer protección, ya que el 50 % de los ratones tratados con Resv desarrollaron carcinomas de piel en la semana 21 y el 100 % en la semana 30. Otros polifenoles utilizados en otros ensayos con el mismo protocolo (incluyendo curcumina, EGCG, epicatequina, apigenina, genisteína, ácido elágico o luteína) no dieron mejores resultados que el Resv ([Estrela & Asensi, 2009](#)). Además, la administración tópica de Pter (en dosis terapéuticamente eficaces) no induce ninguna toxicidad cutánea aparente, como sugiere la comparación de las características histológicas de ratones control no tratados y ratones tratados con Pter que recibieron radiaciones UVB crónicas. Es conveniente tener presente que ninguno de los ratones libres de tumores (tratados tópicamente con Pter) desarrollaron carcinomas durante los tres o cuatro meses después del tratamiento, hecho de fundamental relevancia para evaluar el efecto protector y antitumoral del Pter. Como se muestra en la figura 28, la piel de los ratones tratados con radiación UVB crónica y Pter presentan el mismo aspecto saludable, sin ninguna anomalía ni lesión cutánea, que la de los ratones control no irradiados. Esta ausencia de toxicidad cutánea aparente también parece ser coherente con un estudio previo en el que los ratones fueron alimentados durante 28 días con dosis de 0, 30, 300 y 3000 mg/kg de peso corporal/día de Pter. Este estudio, en el cual se administró de forma oral el Pter a los ratones, mostró que el número de glóbulos rojos y el hematocrito aumentaron después de la administración de Pter en comparación con los grupos control; asimismo, el examen histopatológico y la evaluación de los parámetros bioquímicos no revelaron alteraciones con respecto a los signos clínicos o el peso de los órganos en ninguna de las dosis estudiadas ([Ruiz et al., 2009](#)). No se observó mortalidad incluso con la dosis más alta administrada en este experimento ([Ruiz et al., 2009](#)).

Es conveniente destacar que el Pter y el Resv presentan un FPS muy reducido (ver figura 26), lo que nos permite concluir que un efecto físico directo no puede ser el mecanismo responsable de la protección de la piel frente a la radiación UVB ofrecida por la aplicación tópica de los polifenoles estudiados. Según la bibliografía un efecto fotoprotector potente debido a un filtro físico debería obtener un valor de FPS cercano a 50 ([Syring et al., 2016](#)). Adicionalmente, se ha observado que el Pter no presenta actividad quelante del hierro (resultados no presentados

en esta tesis). Por estos motivos, planteamos que el efecto fotoprotector del Pter sea debido fundamentalmente a un mecanismo/proceso biológico. En este sentido se han propuesto varios mecanismos y dianas celulares implicadas en los procesos de fotoprotección en las que pueden participar los polifenoles bioactivos, como la modulación de diversas vías de señalización celular (por ejemplo, la ruta de señalización de NF- κ B y miembros del complejo AP-1, MAPKs, PI3K/Akt y STAT3), actividades antiinflamatorias/antiinmunosupresoras, o regulación de genes implicados en la reparación del ADN dañado por escisión de nucleótidos, etc. (Afaq & Katiyar, 2011; Cháirez-Ramírez et al., 2021; Isacescu et al., 2023; Islam et al., 2023).

Nuestros resultados actuales indican que el Pter disminuye el daño oxidativo inducido por la radiación UVB y regula tanto la expresión como la actividad de un grupo de enzimas antioxidantes implicadas en el mecanismo de detoxificación celular frente al estrés oxidativo (figura 36 y 37). Los resultados de nuestros estudios demuestran que la exposición crónica a UVB en ratones SKH-1 (180 mJ/cm², tres dosis por semana durante 30 semanas) reduce significativamente la expresión y la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD (que presentan altos niveles en los grupos control). En este contexto, hemos descubierto que el pretratamiento tópico de los animales de experimentación con liposomas con Pter fue capaz de revertir este efecto nocivo y rescatar los valores de expresión y actividad de CAT y SOD a los niveles del grupo control negativo no irradiado (figura 36 y 37). Aunque los resultados de la gráfica de expresión y actividad enzimática de la GPx mostraron un perfil inverso a los de la CAT y SOD, obteniendo valores relativamente bajos en el grupo control, y siendo aumentados por la radiación UVB (figura 36 y 37), el Pter también fue capaz de mantener valores de actividad GPx a niveles similares a los del grupo control negativo no irradiado. Este efecto diferencial en el caso de la GPx, podría deberse, posiblemente, a un mecanismo de compensación celular que puedan presentar las células epiteliales, al ver considerablemente reducidas las actividades de CAT y SOD por la exposición a la radiación UVB. El pretratamiento tópico con Resv no mostró los potentes efectos beneficiosos del Pter y no fue capaz de restaurar los niveles a los valores del grupo control negativo (figura 36 y 37). Es conveniente destacar, también, que la administración tópica facilita el uso de dosis relativamente altas de Pter, por tanto, es posible que parte de esta

fotoprotección se deba a efectos antioxidantes directos. Además, la ausencia de hiperplasia e infiltración de células inflamatorias en los ratones tratados con UVB y Pter, en comparación con los ratones tratados con UVB únicamente (figura 23 y figura 30), también respalda la conocida y estudiada actividad antiinflamatoria/antiinmunosupresora de los polifenoles. Aun así, el efecto del Pter evitando la disminución de las actividades enzimáticas antioxidantes y el GSH, inducida por la UVB, también sugiere un mecanismo adicional.

Como se ha indicado en apartados anteriores, las ROS pueden causar daños en el ADN, propiciando mutaciones, y aumentar las vías de señalización procarcinogénicas que favorecen el crecimiento y la proliferación celular (Ciążyńska et al., 2021; Ray et al., 2012). En relación a lo que acabamos de comentar, el control de los niveles de ROS por parte del Pter podría ser un mecanismo primario de importancia mediante el cual este polifenol pudiera ser particularmente efectivo, pues controlando la generación de ROS podría prevenir una inducción excesiva de ciertas rutas moleculares como NF- κ B, AP-1 y MAPK o la fosforilación de tirosina de STAT3, que como se ha indicado previamente, son vías activadoras de la proliferación celular (Bito & Nishigori, 2012; Garg et al., 2020). En la investigación realizada durante el desarrollo de esta tesis doctoral, nos centramos en parte en la señalización de Nrf2 como un posible mecanismo implicado en el mecanismo molecular fotoprotector del Pter, ya que se sabe que la vía Keap1-Nrf2-ARE controla la respuesta al estrés oxidativo (Rotblat et al., 2012). El mecanismo de activación de Nrf2 por los polifenoles se asocia a la ruptura del complejo Keap1-Nrf2, probablemente a través de la interacción con los tioles presentes en Keap1. Esta interacción podría implicar la modificación del tiol ya sea por alquilación directa o por oxidación a la forma disulfuro (Bensasson et al., 2008; Lee-Hilz et al., 2006; Li et al., 2021). De esta manera, como Keap1 actúa como un inhibidor de Nrf2, uniéndose a él y manteniéndolo secuestrado en el citosol, al disociarse el complejo Keap1-Nrf2, el factor de transcripción queda “libre” siendo capaz de translocarse al núcleo para ejercer su función y activar la transcripción de diversos genes de respuesta a estrés oxidativo. Adicionalmente, otros estudios anteriores indican que el Pter previno la tumorigénesis de colon inducida por azoximetano, ya que su administración durante 6 semanas se asoció a un aumento en la expresión de enzimas antioxidan-

tes, como la hemooxigenasa-1 y la GR, a través de la activación de la señalización de Nrf2 (Chiou et al., 2011). Asimismo, el tratamiento de queratinocitos HaCaT con Resv dio como resultado un aumento en la localización nuclear de Nrf2, una disminución de Keap1 citosólico y protección contra la apoptosis inducida por radiación UVA (Liu et al., 2011). Además, otros ensayos demostraron que el Pter indujo una activación significativa de Nrf2, dosis y tiempo dependiente, en células β pancreáticas de rata INS-1E tratadas con estreptozotocina (Bhakkiyalakshmi et al., 2014).

Nuestros resultados en células HaCaT indican que el Pter aumenta la translocación de Nrf2 al núcleo y, consecuentemente, la expresión de moléculas dependientes de Nrf2 y relacionadas con la respuesta al estrés oxidativo (Figura 41 y Figura 42). Estos hechos respaldan la idea, como se sugirió en estudios anteriores (Panieri et al., 2023; Schäfer et al., 2010), de que Nrf2 puede ser un regulador central de la protección frente a la radiación UV en la epidermis. Sin embargo, sería interesante realizar experimentos adicionales utilizando ratones *knockout* del gen Nrf2 que permitan obtener resultados concluyentes sobre la implicación y participación a nivel molecular del factor de transcripción en el mecanismo fotoprotector y anticancerígeno cutáneo que ejerce el Pter frente a la radiación UVB *in vivo*. En este sentido, nuestros resultados también están en concordancia con el estudio previo de Saw et al. (Saw et al., 2014), cuyos resultados demuestran que la deficiencia de Nrf2, en ratones C57BL/6, aumenta la inflamación de la piel inducida por UVB (una dosis única de 300 mJ/cm²) y el daño de la matriz extracelular. Además, hallazgos recientes también indican que la actividad supresora de tumores del p53 está relacionada con su papel en el mantenimiento del estado redox de las células (Liu et al., 2020; Rotblat et al., 2012). Como ejemplo adicional, podemos citar que mediante el uso de un modelo de inactivación de p53, se demostró que la falta de expresión de algunas proteínas antioxidantes (como por ejemplo la Sestrin 1 y 2, la GPx y la glutaminasa mitocondrial activada por fosfato) está asociada con un aumento de ROS celular, lo que favorece la oxidación del ADN, las mutaciones, y la tumorigénesis (Rotblat et al., 2012; Sablina et al., 2005). Por lo tanto, la posible corregulación de Nrf2 y p53, a nivel cutáneo, es un mecanismo factible que también merece ser estudiado en profundidad.

Finalmente, aunque según los resultados presentados en esta tesis doctoral (y en otros estudios previos) la actividad antioxidante y la tasa de absorción del Pter parecen ser más potentes que las del Resv, sería conveniente realizar una comparación más profunda al respecto y abordarse esta cuestión en futuros estudios ([Bangash et al., 2023](#); [Estrela et al., 2013](#); [Nichols & Katiyar, 2010](#)). Además, las siguientes vías de señalización molecular deberían ser exploradas en profundidad para establecer diferencias significativas adicionales entre ambos estilbenos naturales (Pter y Resv): Nrf2 y la posible corregulación de p53 y/o c-Myc, MAPK, PI3K/Akt, STAT3, expresión de genes de reparación por escisión de nucleótidos, proliferación celular dependiente de ciclina D1/CDK4, evasión de apoptosis y angiogénesis.

Conclusiones

6. Conclusiones

Tras todos los experimentos y estudios realizados durante la realización de esta tesis doctoral, podemos extraer las siguientes conclusiones finales:

1. El Pter disminuyó la inflamación y el aumento del grosor cutáneo inducido por la radiación UVB aguda (360 mJ/cm^2), así como las arrugas e hiperplasia de la piel asociadas al fotoenvejecimiento.
2. El Pter, y no el Resv, previno de manera efectiva la carcinogénesis cutánea inducida por la radiación UVB crónica (180 mJ/cm^2 , tres dosis por semana durante 30 semanas). El 90 % de los ratones tratados con Pter no desarrollaron carcinomas de piel, mientras que un gran número de tumores se observaron en todos los controles irradiados con UVB.
3. Este efecto anticancerígeno se asoció con el mantenimiento de las defensas antioxidantes de la piel cercanas a los valores control negativo (ratones no tratados); y con una inhibición de la oxidación inducida por la radiación UVB.
4. El mecanismo molecular subyacente al efecto fotoprotector del Pter fue evaluado adicionalmente utilizando queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT, demostrando que dicha protección implica la regulación de la respuesta antioxidante dependiente del factor de transcripción Nrf2.
5. Los resultados obtenidos permiten postular el uso tópico del Pter para prevenir de forma eficaz la carcinogénesis inducida por la radiación solar.

Bibliografía

7. Bibliografia

- Afaq, F., & Katiyar, S. K. (2011). Polyphenols: skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. *Mini Rev Med Chem*, 11(14), 1200-1215. <https://doi.org/10.2174/13895575111091200>
- Afaq, F., Adhami, V. M., & Ahmad, N. (2003). Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 186(1), 28-37. [https://doi.org/10.1016/s0041-008x\(02\)00014-5](https://doi.org/10.1016/s0041-008x(02)00014-5)
- Afaq, F., Adhami, V. M., & Mukhtar, H. (2005). Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat Res*, 571(1-2), 153-173. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.07.019>
- Afaq, F., Syed, D. N., Malik, A., Hadi, N., Sarfaraz, S., Kweon, M. H., . . . Mukhtar, H. (2007). Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis. *J Invest Dermatol*, 127(1), 222-232. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700510>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Molecular biology of the cell (G. Science., Ed. 5th ed.).
- Albini, A., Tosetti, F., Li, V. W., Noonan, D. M., & Li, W. W. (2012). Cancer prevention by targeting angiogenesis. *Nat Rev Clin Oncol*, 9(9), 498-509. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2012.120>
- Almquist, L. M., Karagas, M. R., Christensen, B. C., Welsh, M. M., Perry, A. E., Storm, C. A., & Nelson, H. H. (2011). The role of TP53 and MDM2 polymorphisms in TP53 mutagenesis and risk of non-melanoma skin cancer. *Carcinogenesis*, 32(3), 327-330. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq256>
- Alonso, L., & Fuchs, E. (2003). Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 Suppl 1(Suppl 1), 11830-11835. <https://doi.org/10.1073/pnas.1734203100>
- Amaria, R. N., Postow, M., Burton, E. M., Tetzlaff, M. T., Ross, M. I., Torres-Cabala, C., . . . Tawbi, H. A. (2022). Neoadjuvant relatlimab and nivolumab in resec-

table melanoma. *Nature*, 611(7934), 155-160. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05368-8>

Amarowicz, R., Carle, R., Dongowski, G., Durazzo, A., Galensa, R., Kammerer, D., . . . Piskula, M. K. (2009). Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. *Mol Nutr Food Res*, 53 Suppl 2, S151-183. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700486>

American Academy of Dermatology. Retrieved 14/12/2023 from www.aad.org

Amiot, M. J., Riva, C., & Vinet, A. (2016). Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: a systematic review. *Obes Rev*, 17(7), 573-586. <https://doi.org/10.1111/obr.12409>

Asensi, M., Ortega, A., Mena, S., Feddi, F., & Estrela, J. M. (2011). Natural polyphenols in cancer therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 48(5-6), 197-216. <https://doi.org/10.3109/10408363.2011.631268>

Atkinson, J., Epand, R. F., & Epand, R. M. (2008). Tocopherols and tocotrienols in membranes: a critical review. *Free Radic Biol Med*, 44(5), 739-764. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.11.010>

Australasian Society for Dermatology Research (ASDR). Retrieved 14/12/2023 from www.asdr.org.au

Azam, S., Jakaria, M., Kim, I. S., Kim, J., Haque, M. E., & Choi, D. K. (2019). Regulation of Toll-Like Receptor (TLR) Signaling Pathway by Polyphenols in the Treatment of Age-Linked Neurodegenerative Diseases: Focus on TLR4 Signaling. *Front Immunol*, 10, 1000. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01000>

Baliga, M. S., & Katiyar, S. K. (2006). Chemoprevention of photocarcinogenesis by selected dietary botanicals. *Photochem Photobiol Sci*, 5(2), 243-253. <https://doi.org/10.1039/b505311k>

Banerjee, N., Kim, H., Talcott, S. T., Turner, N. D., Byrne, D. H., & Mertens-Talcott, S. U. (2016). Plum polyphenols inhibit colorectal aberrant crypt foci formation in rats: potential role of the miR-143/protein kinase B/mammalian target of rapamycin axis. *Nutr Res*, 36(10), 1105-1113. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.06.008>

Bangash, Y., Saleem, A., Akhtar, M. F., Anwar, F., Akhtar, B., Sharif, A., . . . Khan, A. (2023). Pterostilbene reduces the progression of atopic dermatitis via modula-

ting inflammatory and oxidative stress biomarkers in mice. *Inflammopharmacology*, 31(3), 1289-1303. <https://doi.org/10.1007/s10787-023-01214-z>

Barar, J. (2012). Targeting tumor microenvironment: the key role of immune system. *Bioimpacts*, 2(1), 1-3. <https://doi.org/10.5681/bi.2012.001>

Beckman, J. S., & Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, 271(5 Pt 1), C1424-1437. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.271.5.C1424>

Behl, T., Upadhyay, T., Singh, S., Chigurupati, S., Alsubayiel, A. M., Mani, V., . . . Bungau, S. G. (2021). Polyphenols Targeting MAPK Mediated Oxidative Stress and Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Molecules*, 26(21). <https://doi.org/10.3390/molecules26216570>

Benavides, F., Oberyszyn, T. M., VanBuskirk, A. M., Reeve, V. E., & Kusewitt, D. F. (2009). The hairless mouse in skin research. *J Dermatol Sci*, 53(1), 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2008.08.012>

Benlloch, M., Obrador, E., Valles, S. L., Rodriguez, M. L., Sirerol, J. A., Alcácer, J., . . . Estrela, J. M. (2016). Pterostilbene Decreases the Antioxidant Defenses of Aggressive Cancer Cells In Vivo: A Physiological Glucocorticoids- and Nrf2-Dependent Mechanism. *Antioxid Redox Signal*, 24(17), 974-990. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6437>

Bensasson, R. V., Zoete, V., Dinkova-Kostova, A. T., & Talalay, P. (2008). Two-step mechanism of induction of the gene expression of a prototypic cancer-protective enzyme by diphenols. *Chem Res Toxicol*, 21(4), 805-812. <https://doi.org/10.1021/tx7002883>

Berwick, M., & Garcia, A. (2020). Solar UV Exposure and Mortality from Skin Tumors: An Update. *Adv Exp Med Biol*, 1268, 143-154. https://doi.org/10.1007/978-3-030-46227-7_7

Bhakkialakshmi, E., Shalini, D., Sekar, T. V., Rajaguru, P., Paulmurugan, R., & Ramkumar, K. M. (2014). Therapeutic potential of pterostilbene against pancreatic beta-cell apoptosis mediated through Nrf2. *Br J Pharmacol*, 171(7), 1747-1757. <https://doi.org/10.1111/bph.12577>

Biolo, G., Antonione, R., & De Cicco, M. (2007). Glutathione metabolism in sepsis. *Crit Care Med*, 35(9 Suppl), S591-595. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000278913.19123.13>

- Bito, T., & Nishigori, C. (2012). Impact of reactive oxygen species on keratinocyte signaling pathways. *J Dermatol Sci*, 68(1), 3-8. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.06.006>
- Boland, G. M., & Gershenwald, J. E. (2016). Principles of Melanoma Staging. *Cancer Treat Res*, 167, 131-148. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22539-5_5
- Bonaccio, M., Pounis, G., Cerletti, C., Donati, M. B., Iacoviello, L., de Gaetano, G., & Investigators, M.-S. S. (2017). Mediterranean diet, dietary polyphenols and low grade inflammation: results from the MOLI-SANI study. *Br J Clin Pharmacol*, 83(1), 107-113. <https://doi.org/10.1111/bcp.12924>
- Boukamp, P. (2011). Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. In M. R. P. R. Dummer, K. Iwatsuki, A. Green, N. M. Elwan (Ed.), *Skin-Cancer. A World-Wide Perspective* (pp. 45-54). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-05072-5>
- Bragulla, H. H., & Homberger, D. G. (2009). Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat*, 214(4), 516-559. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x>
- Bravo, L. (2009). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
- Brewster, D. H., Bhatti, L. A., Inglis, J. H., Nairn, E. R., & Doherty, V. R. (2007). Recent trends in incidence of nonmelanoma skin cancers in the East of Scotland, 1992-2003. *Br J Dermatol*, 156(6), 1295-1300. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.07892.x>
- Brodland, D. G. (2023). Mohs Micrographic Surgery for Melanoma: Evidence, Controversy, and a Critical Review of Excisional Margin Guidelines. *Dermatol Clin*, 41(1), 79-88. <https://doi.org/10.1016/j.det.2022.07.008>
- Brošková, Z., Drábíková, K., Sotníková, R., Fialová, S., & Knežl, V. (2013). Effect of plant polyphenols on ischemia-reperfusion injury of the isolated rat heart and vessels. *Phytother Res*, 27(7), 1018-1022. <https://doi.org/10.1002/ptr.4825>
- Buhrmann, C., Shayan, P., Kraeche, P., Popper, B., Goel, A., & Shakibaei, M. (2015). Resveratrol induces chemosensitization to 5-fluorouracil through up-regulation of intercellular junctions, Epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis in colorectal cancer. *Biochem Pharmacol*, 98(1), 51-68. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.08.105>

- Burke, K. E. (2010). Photoaging: the role of oxidative stress. *G Ital Dermatol Venereol*, 145(4), 445-459.
- Cabral, A., Voskamp, P., Cleton-Jansen, A. M., South, A., Nizetic, D., & Backendorf, C. (2001). Structural organization and regulation of the small proline-rich family of cornified envelope precursors suggest a role in adaptive barrier function. *J Biol Chem*, 276(22), 19231-19237. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100336200>
- Cameron, M. C., Lee, E., Hibler, B. P., Barker, C. A., Mori, S., Cordova, M., . . . Rossi, A. M. (2019). Basal cell carcinoma: Epidemiology; pathophysiology; clinical and histological subtypes; and disease associations. *J Am Acad Dermatol*, 80(2), 303-317. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.03.060>
- Cao, H., Brehm, M., Hynan, L., & Goff, H. W. (2019). Wrinkles, brown spots, and cancer: Relationship between appearance- and health-based knowledge and sunscreen use. *J Cosmet Dermatol*, 18(2), 558-562. <https://doi.org/10.1111/jocd.12712>
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J Nutr Biochem*, 24(8), 1415-1422. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>
- Carmichael, S. W. (2014). The tangled web of Langer's lines. *Clin Anat*, 27(2), 162-168. <https://doi.org/10.1002/ca.22278>
- Cartlidge, P. (2000). The epidermal barrier. *Semin Neonatol*, 5(4), 273-280. <https://doi.org/10.1053/siny.2000.0013>
- Castrisos, G., & Lewandowski, R. (2021). Narrative review of the epidemiology/biology of basal cell carcinoma: a need for public health consensus. *ANZ J Surg*, 91(6), 1098-1103. <https://doi.org/10.1111/ans.16522>
- Cháirez-Ramírez, M. H., de la Cruz-López, K. G., & García-Carrancá, A. (2021). Polyphenols as Antitumor Agents Targeting Key Players in Cancer-Driving Signaling Pathways. *Front Pharmacol*, 12, 710304. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.710304>
- Chang, C. M., Chang, P. Y., Tu, M. G., Lu, C. C., Kuo, S. C., Amagaya, S., . . . Yang, J. S. (2012). Epigallocatechin gallate sensitizes CAL-27 human oral squamous cell carcinoma cells to the anti-metastatic effects of gefitinib (Iressa) via synergistic suppression of epidermal growth factor receptor and matrix metalloproteinase-2. *Oncol Rep*, 28(5), 1799-1807. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1991>

- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*, 49(3), 481-493. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625>
- Chen, A. C., Halliday, G. M., & Damian, D. L. (2013). Non-melanoma skin cancer: carcinogenesis and chemoprevention. *Pathology*, 45(3), 331-341. <https://doi.org/10.1097/PAT.0b013e32835f515c>
- Chen, L., Hu, J. Y., & Wang, S. Q. (2012). The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. *J Am Acad Dermatol*, 67(5), 1013-1024. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2012.02.009>
- Chiou, Y. S., Tsai, M. L., Nagabhushanam, K., Wang, Y. J., Wu, C. H., Ho, C. T., & Pan, M. H. (2011). Pterostilbene is more potent than resveratrol in preventing azoxymethane (AOM)-induced colon tumorigenesis via activation of the NF-E2-related factor 2 (Nrf2)-mediated antioxidant signaling pathway. *J Agric Food Chem*, 59(6), 2725-2733. <https://doi.org/10.1021/jf2000103>
- Christenson, L. J., Borrowman, T. A., Vachon, C. M., Tollefson, M. M., Otley, C. C., Weaver, A. L., & Roenigk, R. K. (2005). Incidence of basal cell and squamous cell carcinomas in a population younger than 40 years. *JAMA*, 294(6), 681-690. <https://doi.org/10.1001/jama.294.6.681>
- Chu, S. S., Chang, Y. L., & Lou, P. J. (2001). Primary cutaneous adenoid cystic carcinoma with regional lymph node metastasis. *J Laryngol Otol*, 115(8), 673-675. <https://doi.org/10.1258/0022215011908595>
- Chuang, D. Y., Simonyi, A., Cui, J., Lubahn, D. B., Gu, Z., & Sun, G. Y. (2016). Botanical Polyphenols Mitigate Microglial Activation and Microglia-Induced Neurotoxicity: Role of Cytosolic Phospholipase A2. *Neuromolecular Med*, 18(3), 415-425. <https://doi.org/10.1007/s12017-016-8419-5>
- Ciążyńska, M., Olejniczak-Staruch, I., Sobolewska-Sztychny, D., Narbutt, J., Ski-bińska, M., & Lesiak, A. (2021). Ultraviolet Radiation and Chronic Inflammation-Molecules and Mechanisms Involved in Skin Carcinogenesis: A Narrative Review. *Life (Basel)*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/life11040326>
- Cichocki, M., Paluszczak, J., Szafer, H., Piechowiak, A., Rimando, A. M., & Baer-Dubowska, W. (2008). Pterostilbene is equally potent as resveratrol in inhibiting 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activated NFkappaB, AP-1, COX-2, and iNOS in mouse epidermis. *Mol Nutr Food Res*, 52 Suppl 1, S62-70. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700466>

- Cleaver, J. E. (2005). Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer*, 5(7), 564-573. <https://doi.org/10.1038/nrc1652>
- Colomer, R., Sarrats, A., Lupu, R., & Puig, T. (2017). Natural Polyphenols and their Synthetic Analogs as Emerging Anticancer Agents. *Curr Drug Targets*, 18(2), 147-159. <https://doi.org/10.2174/1389450117666160112113930>
- Corrie, P., Meyer, N., Berardi, R., Guidoboni, M., Schlueter, M., Kolovos, S., . . . Laramée, P. (2022). Comparative efficacy and safety of targeted therapies for BRAF-mutant unresectable or metastatic melanoma: Results from a systematic literature review and a network meta-analysis. *Cancer Treat Rev*, 110, 102463. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2022.102463>
- Cortés-Rojo, C., & Rodríguez-Orozco, A. R. (2011). Importance of oxidative damage on the electron transport chain for the rational use of mitochondria-targeted antioxidants. *Mini Rev Med Chem*, 11(7), 625-632. <https://doi.org/10.2174/138955711795906879>
- Costa, S. L., Silva, V. D., Dos Santos Souza, C., Santos, C. C., Paris, I., Muñoz, P., & Segura-Aguilar, J. (2016). Impact of Plant-Derived Flavonoids on Neurodegenerative Diseases. *Neurotox Res*, 30(1), 41-52. <https://doi.org/10.1007/s12640-016-9600-1>
- Crain, P. F. (1990). Preparation and enzymatic hydrolysis of DNA and RNA for mass spectrometry. *Methods Enzymol*, 193, 782-790. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)93450-y](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)93450-y)
- D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., & Scott, T. (2013). UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci*, 14(6), 12222-12248. <https://doi.org/10.3390/ijms140612222>
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Dal, H., Boldemann, C., & Lindelöf, B. (2008). Trends during a half century in relative squamous cell carcinoma distribution by body site in the Swedish population: support for accumulated sun exposure as the main risk factor. *J Dermatol*, 35(2), 55-62. <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2008.00416.x>
- Daya-Grosjean, L., & Sarasin, A. (2005). The role of UV induced lesions in skin carcinogenesis: an overview of oncogene and tumor suppressor gene modifications

in xeroderma pigmentosum skin tumors. *Mutat Res*, 571(1-2), 43-56. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.11.013>

De Lamirande, E., & O'Flaherty, C. (2008). Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim Biophys Acta*, 1784(1), 106-115. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.08.024>

De Paepe, K., Houben, E., Adam, R., Wiesemann, F., & Rogiers, V. (2005). Validation of the VapoMeter, a closed unventilated chamber system to assess transepidermal water loss vs. the open chamber Tewameter. *Skin Res Technol*, 11(1), 61-69. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2005.00101.x>

De Vries, E., Louwman, M., Bastiaens, M., de Gruijl, F., & Coebergh, J. W. (2004). Rapid and continuous increases in incidence rates of basal cell carcinoma in the southeast Netherlands since 1973. *J Invest Dermatol*, 123(4), 634-638. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23306.x>

Deutsch, J., Dippel, E., & Delank, K. W. (2023). [Cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck]. *Laryngorhinootologie*, 102(3), 186-193. <https://doi.org/10.1055/a-1953-7374>

Dey, P. M., & Harborne, J. B. (1989). *Methods in Plant Biochemistry: Plant Phenolics v. I*. Academic Press.

Diffey, B.L., & Robson, J. (1989). A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum. *J Soc of Cosmet Chem*, 40, 127-133.

Donkó, A., Péterfi, Z., Sum, A., Leto, T., & Geiszt, M. (2005). Dual oxidases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360(1464), 2301-2308. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1767>

Dreher, D., & Junod, A. F. (1996). Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer*, 32A(1), 30-38. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(95\)00531-5](https://doi.org/10.1016/0959-8049(95)00531-5)

Dröge, W. (2002). Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp Gerontol*, 37(12), 1333-1345. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(02\)00175-4](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(02)00175-4)

Dunaway, S., Odin, R., Zhou, L., Ji, L., Zhang, Y., & Kadekaro, A. L. (2018). Natural Antioxidants: Multiple Mechanisms to Protect Skin From Solar Radiation. *Front Pharmacol*, 9, 392. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00392>

- Elias, P. M., & Steinhoff, M. (2008). "Outside-to-inside" (and now back to "outside") pathogenic mechanisms in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 128(5), 1067-1070. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.88>
- Elias, P. M., Hatano, Y., & Williams, M. L. (2008). Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: outside-inside-outside pathogenic mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*, 121(6), 1337-1343. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.01.022>
- Elias, P. M., Williams, M. L., Holleran, W. M., Jiang, Y. J., & Schmuth, M. (2008). Pathogenesis of permeability barrier abnormalities in the ichthyoses: inherited disorders of lipid metabolism. *J Lipid Res*, 49(4), 697-714. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800002-JLR200>
- Emerit, I. (2011). Cytogenetic methods for detection of oxidative stress and evaluation of antioxidant therapy in hepatitis C infection. *Hepatitis Monthly*, 11(6), 434.
- Escobar, J., Cubells, E., Enomoto, M., Quintás, G., Kuligowski, J., Fernández, C. M., . . . Vento, M. (2013). Prolonging in utero-like oxygenation after birth diminishes oxidative stress in the lung and brain of mice pups. *Redox Biol*, 1(1), 297-303. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.04.002>
- Espectro visible. (2023, 5 de diciembre). *Wikipedia, La enciclopedia libre*. Fecha de consulta: 13:11, diciembre 5, 2023 desde https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Espectro_visible&oldid=155824398.
- Estrela, J. M., & Asensi, M. (2009). *Pterostilbene (pter) for use in the prevention and/or treatment of skin diseases, damages or injuries*. (Spain Patent No. U. o. Valencia.
- Estrela, J. M., Mena, S., Obrador, E., Benlloch, M., Castellano, G., Salvador, R., & Dellinger, R. W. (2017). Polyphenolic Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy: Bioavailability versus Bioefficacy. *J Med Chem*, 60(23), 9413-9436. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01026>
- Estrela, J. M., Ortega, A., Mena, S., Rodriguez, M. L., & Asensi, M. (2013). Pterostilbene: Biomedical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 50(3), 65-78. <https://doi.org/10.3109/10408363.2013.805182>
- Euvrard, S., Kanitakis, J., & Claudy, A. (2003). Skin cancers after organ transplantation. *The New England Journal of Medicine*, 348(17), 1681-1691. <https://doi.org/10.1056/nejmra022137>

- Fan, H., Oro, A. E., Scott, M. P., & Khavari, P. A. (1997). Induction of basal cell carcinoma features in transgenic human skin expressing Sonic Hedgehog. *Nat Med*, 3(7), 788-792. <https://doi.org/10.1038/nm0797-788>
- Farage, M. A., Miller, K. W., Elsner, P., & Maibach, H. I. (2007). Structural characteristics of the aging skin: a review. *Cutan Ocul Toxicol*, 26(4), 343-357. <https://doi.org/10.1080/15569520701622951>
- Farjadmand, F., Karimpour-Razkenari, E., Nabavi, S. M., Ardekani, M. R. S., & Saeedi, M. (2021). Plant Polyphenols: Natural and Potent UV-Protective Agents for the Prevention and Treatment of Skin Disorders. *Mini Rev Med Chem*, 21(5), 576-585. <https://doi.org/10.2174/1389557520666201109121246>
- Fenske, N. A., & Lober, C. W. (1986). Structural and functional changes of normal aging skin. *J Am Acad Dermatol*, 15(4 Pt 1), 571-585. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(86\)70208-9](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(86)70208-9)
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W., Comber, H., . . . Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, 49(6), 1374-1403. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.027>
- Fernández-Aceñero, M. J., Manzarbeitia, F., Mestre, M. J., & Requena, L. (2000). p53 expression in two cases of spiradenocarcinomas. *Am J Dermatopathol*, 22(2), 104-107. <https://doi.org/10.1097/00000372-200004000-00003>
- Ferrer, P., Asensi, M., Segarra, R., Ortega, A., Benlloch, M., Obrador, E., . . . Estrella, J. M. (2005). Association between pterostilbene and quercetin inhibits metastatic activity of B16 melanoma. *Neoplasia*, 7(1), 37-47. <https://doi.org/10.1593/neo.04337>
- Forstrom, J. W., Zakowski, J. J., & Tappel, A. L. (1978). Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry*, 17(13), 2639-2644. <https://doi.org/10.1021/bi00606a028>
- Fraga, C. G., Croft, K. D., Kennedy, D. O., & Tomás-Barberán, F. A. (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct*, 10(2), 514-528. <https://doi.org/10.1039/c8fo01997e>
- Franceschi, S., Levi, F., Randimbison, L., & La Vecchia, C. (1996). Site distribution of different types of skin cancer: New aetiological clues. *Int J Cancer*, 67(1),

24–28. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19960703\)67:1<24::aid-ijc6>3.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19960703)67:1<24::aid-ijc6>3.0.co;2-1)

Friedman, O. (2005). Changes associated with the aging face. *Facial Plast Surg Clin North Am*, 13(3), 371-380. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2005.04.004>

Gado, F., Digiacomo, M., Salsano, J. E., Macchia, M., & Manera, C. (2021). Phenolic Compounds in Prevention and Treatment of Skin Cancers: A Review. *Curr Med Chem*, 28(33), 6730-6752. <https://doi.org/10.2174/0929867328666210324160324>

Galaris, D., & Pantopoulos, K. (2008). Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 45(1), 1-23. <https://doi.org/10.1080/10408360701713104>

Gałecka, E., Jacewicz, R., Mrowicka, M., Florkowski, A., & Gałecki, P. (2008). [Antioxidative enzymes--structure, properties, functions]. *Pol Merkur Lekarski*, 25(147), 266-268.

Garg, A. K., Buchholz, T. A., & Aggarwal, B. B. (2005). Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols. *Antioxid Redox Signal*, 7(11-12), 1630-1647. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1630>

Garg, C., Sharma, H., & Garg, M. (2020). Skin photo-protection with phytochemicals against photo-oxidative stress, photo-carcinogenesis, signal transduction pathways and extracellular matrix remodeling-An overview. *Ageing Res Rev*, 62, 101127. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101127>

Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. Texto Atlas de Histología. In M.-H. I. E. S.A. (Ed.), (2nd ed.). W. B. Saunders Company.

Gordon, R. (2013). Skin cancer: an overview of epidemiology and risk factors. *Semin Oncol Nurs*, 29(3), 160-169. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2013.06.002>

Guinot, C., Malvy, D. J., Ambroisine, L., Latreille, J., Mauger, E., Tenenhaus, M., . . . Tschachler, E. (2002). Relative contribution of intrinsic vs extrinsic factors to skin aging as determined by a validated skin age score. *Arch Dermatol*, 138(11), 1454-1460. <https://doi.org/10.1001/archderm.138.11.1454>

Guzman, A. K., Schmults, C. D., & Ruiz, E. S. (2023). Squamous Cell Carcinoma: An Update in Staging, Management, and Postoperative Surveillance Strategies. *Dermatol Clin*, 41(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.det.2022.07.004>

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harris, R. B., Griffith, K., & Moon, T. E. (2001). Trends in the incidence of nonmelanoma skin cancers in southeastern Arizona, 1985-1996. *J Am Acad Dermatol*, 45(4), 528-536. <https://doi.org/10.1067/mjd.2001.114742>
- Harvell, J. D., & Maibach, H. I. (1994). Percutaneous absorption and inflammation in aged skin: a review. *J Am Acad Dermatol*, 31(6), 1015-1021. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(94\)70273-x](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(94)70273-x)
- Hayes, R. C., Leonfellner, S., Pilgrim, W., Liu, J., & Keeling, D. N. (2007). Incidence of nonmelanoma skin cancer in New Brunswick, Canada, 1992 to 2001. *J Cutan Med Surg*, 11(2), 45-52. <https://doi.org/10.2310/7750.2007.00010>
- Heath, M. S., & Bar, A. (2023). Basal Cell Carcinoma. *Dermatol Clin*, 41(1), 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.det.2022.07.005>
- Heppt, M. V., & Heinzerling, L. (2022). [Pigmented lesions of the mucosa]. *Dermatologie (Heidelb)*, 73(9), 682-691. <https://doi.org/10.1007/s00105-022-05039-9>
- Hindley, C., & Philpott, A. (2013). The cell cycle and pluripotency. *Biochem J*, 451(2), 135-143. <https://doi.org/10.1042/BJ20121627>
- Hirsch, P., & Helwig, E. B. (1961). Chondroid syringoma: Mixed tumor of skin, salivary gland type. *Archives of Dermatology*, 84(5), 835. <https://doi.org/10.1001/archderm.1961.01580170129018>
- Hoensch, H., & Oertel, R. (2012). [Anti-inflammatory effects of tea-flavonoids]. *Dtsch Med Wochenschr*, 137(51-52), 2738-2740. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1327348>
- Hollman, P. C. (2014). Unravelling of the health effects of polyphenols is a complex puzzle complicated by metabolism. *Arch Biochem Biophys*, 559, 100-105. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.04.013>
- Honda, R., & Yasuda, H. (1999). Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J*, 18(1), 22-27. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.1.22>
- Hou, Y., Wang, K., Wan, W., Cheng, Y., Pu, X., & Ye, X. (2018). Resveratrol provides neuroprotection by regulating the JAK2/STAT3/PI3K/AKT/mTOR pathway

after stroke in rats. *Genes Dis*, 5(3), 245-255. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.06.001>

Hübbe, M. L., Jæhger, D. E., Andresen, T. L., & Andersen, M. H. (2020). Leveraging Endogenous Dendritic Cells to Enhance the Therapeutic Efficacy of Adoptive T-Cell Therapy and Checkpoint Blockade. *Front Immunol*, 11, 578349. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.578349>

Hügel, H. M., Jackson, N., May, B., Zhang, A. L., & Xue, C. C. (2016). Polyphenol protection and treatment of hypertension. *Phytomedicine*, 23(2), 220-231. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.12.012>

Indra, A. K., & Leid, M. (2011). Epidermal permeability barrier measurement in mammalian skin. *Methods Mol Biol*, 763, 73-81. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-191-8_4

Isacescu, E., Chiroi, P., Zanoaga, O., Nutu, A., Budisan, L., Pirlog, R., . . . Berindan-Neagoe, I. (2023). Melanoma Cellular Signaling Transduction Pathways Targeted by Polyphenols Action Mechanisms. *Antioxidants (Basel)*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/antiox12020407>

Islam, M. A., Medha, M. M., Nahar, A. U., Al Fahad, M. A., Siraj, M. A., & Seidel, V. (2023). Cancer Protective Role of Selected Dietary Polyphenols via Modulating Keap1/Nrf2/ARE and Interconnected Signaling Pathways. *Nutr Cancer*, 75(4), 1065-1102. <https://doi.org/10.1080/01635581.2023.2183546>

Jensen, J. M., & Proksch, E. (2009). The skin's barrier. *G Ital Dermatol Venereol*, 144(6), 689-700.

Jia, Y., Mao, Q., Yang, J., Du, N., Zhu, Y., & Min, W. (2023). (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Protects Human Skin Fibroblasts from Ultraviolet a Induced Photoaging. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 16, 149-159. <https://doi.org/10.2147/CCID.-S398547>

Joerger, A. C., & Fersht, A. R. (2007). Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene*, 26(15), 2226-2242. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210291>

Jonason, A. S., Kunala, S., Price, G. J., Restifo, R. J., Spinelli, H. M., Persing, J. A., . . . Brash, D. E. (1996). Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(24), 14025-14029. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.14025>

- Kampschulte, N., Alasmer, A., Empl, M. T., Krohn, M., Steinberg, P., & Schebb, N. H. (2020). Dietary Polyphenols Inhibit the Cytochrome P450 Monooxygenase Branch of the Arachidonic Acid Cascade with Remarkable Structure-Dependent Selectivity and Potency. *J Agric Food Chem*, 68(34), 9235-9244. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04690>
- Kang, N. J., Shin, S. H., Lee, H. J., & Lee, K. W. (2011). Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. *Pharmacol Ther*, 130(3), 310-324. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.02.004>
- Kang, S., Chung, J. H., Lee, J. H., Fisher, G. J., Wan, Y. S., Duell, E. A., & Voorhees, J. J. (2003). Topical N-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet-light-induced signaling that leads to photoaging in human skin in vivo. *J Invest Dermatol*, 120(5), 835-841. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12122.x>
- Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*, 12(4), 390-399; quiz 400-391.
- Katiyar, S. K. (2011). Green tea prevents non-melanoma skin cancer by enhancing DNA repair. *Arch Biochem Biophys*, 508(2), 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.11.015>
- Katiyar, S. K., Korman, N. J., Mukhtar, H., & Agarwal, R. (1997). Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. *J Natl Cancer Inst*, 89(8), 556-566. <https://doi.org/10.1093/jnci/89.8.556>
- Kim, Y., Stolarska, M. A., & Othmer, H. G. (2011). The role of the microenvironment in tumor growth and invasion. *Prog Biophys Mol Biol*, 106(2), 353-379. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2011.06.006>
- Kishimoto, Y., Tani, M., & Kondo, K. (2013). Pleiotropic preventive effects of dietary polyphenols in cardiovascular diseases. *Eur J Clin Nutr*, 67(5), 532-535. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.29>
- Kligman, A. M., & Koblenzer, C. (1997). Demographics and psychological implications for the aging population. *Dermatol Clin*, 15(4), 549-553. [https://doi.org/10.1016/s0733-8635\(05\)70464-2](https://doi.org/10.1016/s0733-8635(05)70464-2)
- Korkina, L. G., De Luca, C., Kostyuk, V. A., & Pastore, S. (2009). Plant polyphenols and tumors: from mechanisms to therapies, prevention, and protection against toxicity of anti-cancer treatments. *Curr Med Chem*, 16(30), 3943-3965. <https://doi.org/10.2174/092986709789352312>

- Krayem, M., Ghanem, G. E., & Van Gestel, D. (2022). Recent advances in radio-sensitivity determinants in melanoma. *Curr Opin Oncol*, 34(2), 131-138. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000818>
- Kuriyama, I., Nakajima, Y., Nishida, H., Konishi, T., Takeuchi, T., Sugawara, F., . . . Mizushima, Y. (2013). Inhibitory effects of low molecular weight polyphenolics from *Inonotus obliquus* on human DNA topoisomerase activity and cancer cell proliferation. *Mol Med Rep*, 8(2), 535-542. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1547>
- Kuzmich, N. N., Sivak, K. V., Chubarev, V. N., Porozov, Y. B., Savateeva-Lyubimova, T. N., & Peri, F. (2017). TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. *Vaccines (Basel)*, 5(4). <https://doi.org/10.3390/vaccines5040034>
- Latkowski, J. A., Freedberg, I. M., Eisen, A. Z., Wolff, K., Goldsmith, L. A., Katz, S. I., & Fitzpatrick, T. B. (1999). Epidermal cell kinetics, Epidermal differentiation and keratinization. In *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine* (5th ed., pp. 133–143). McGraw-Hill.
- Laurent, C., Chabi, B., Fouret, G., Py, G., Sairafi, B., Elong, C., Gaillet, S., Cristol, J. P., Coudray, C., & Feillet-Coudray, C. (2012). Polyphenols decreased liver NADPH oxidase activity, increased muscle mitochondrial biogenesis and decreased gastrocnemius age-dependent autophagy in aged rats. *Free Radical Research*, 46(9), 1140-1149. <https://doi.org/10.3109/10715762.2012.694428>
- Lazaroff, J., & Bolotin, D. (2023). Targeted Therapy and Immunotherapy in Melanoma. *Dermatol Clin*, 41(1), 65-77. <https://doi.org/10.1016/j.det.2022.07.007>
- Lecour, S., & Lamont, K. T. (2011). Natural polyphenols and cardioprotection. *Mini Rev Med Chem*, 11(14), 1191-1199. <https://doi.org/10.2174/13895575111091191>
- Lee-Hilz, Y. Y., Boerboom, A. M., Westphal, A. H., Berkel, W. J., Aarts, J. M., & Rietjens, I. M. (2006). Pro-oxidant activity of flavonoids induces EpRE-mediated gene expression. *Chem Res Toxicol*, 19(11), 1499-1505. <https://doi.org/10.1021/tx060157q>
- Levi, F., Te, V. C., Randimbison, L., Erler, G., & La Vecchia, C. (2001). Trends in skin cancer incidence in Vaud: an update, 1976-1998. *Eur J Cancer Prev*, 10(4), 371-373. <https://doi.org/10.1097/00008469-200108000-00011>

- Li, A. N., Li, S., Zhang, Y. J., Xu, X. R., Chen, Y. M., & Li, H. B. (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6(12), 6020-6047. <https://doi.org/10.3390/nu6126020>
- Li, Q., Qiu, Z., Wang, Y., Guo, C., Cai, X., Zhang, Y., . . . Tang, J. (2021). Tea polyphenols alleviate hydrogen peroxide-induced oxidative stress damage through the Mst/Nrf2 axis and the Keap1/Nrf2/HO-1 pathway in murine RAW264.7 cells. *Exp Ther Med*, 22(6), 1473. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10908>
- Ling, G., Chadwick, C. A., Berne, B., Potten, C. S., Pontén, J., & Pontén, F. (2001). Epidermal p53 response and repair of thymine dimers in human skin after a single dose of ultraviolet radiation: effects of photoprotection. *Acta Derm Venereol*, 81(2), 81-86. <https://doi.org/10.1080/00015550152384173>
- Ling, G., Persson, Å., Berne, B., Uhlén, M., Lundeberg, J., & Pontén, F. (2001). Persistent p53 mutations in single cells from normal human skin. *Am J Pathol*, 159(4), 1247-1253. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)62511-4](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)62511-4)
- Liu, X., Fan, L., Lu, C., Yin, S., & Hu, H. (2020). Functional Role of p53 in the Regulation of Chemical-Induced Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 6039769. <https://doi.org/10.1155/2020/6039769>
- Liu, Y., Chan, F., Sun, H., Yan, J., Fan, D., Zhao, D., . . . Zhou, D. (2011). Resveratrol protects human keratinocytes HaCaT cells from UVA-induced oxidative stress damage by downregulating Keap1 expression. *Eur J Pharmacol*, 650(1), 130-137. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.10.009>
- Lynch, K. T., Hu, Y., Farrow, N. E., Song, Y., Meneveau, M. O., Kwak, M., . . . Slingluff, C. L. (2023). Regional control after precision lymph node dissection for clinically evident melanoma metastasis. *J Surg Oncol*, 127(1), 140-147. <https://doi.org/10.1002/jso.27100>
- Mahdavi Gorabi, A., Sadat Ravari, M., Sanaei, M. J., Davaran, S., Kesharwani, P., & Sahebkar, A. (2022). Immune checkpoint blockade in melanoma: Advantages, shortcomings and emerging roles of the nanoparticles. *Int Immunopharmacol*, 113(Pt A), 109300. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109300>
- Maier, C. M., & Chan, P. H. (2002). Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist*, 8(4), 323-334. <https://doi.org/10.1177/107385840200800408>

Malstrom, B., Andreasson, L., & Reinhammer, B. (1975). *The Enzymes* (P. Boyer, Ed.). XIIB, Academic Press.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79(5), 727-747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>

Marcil, I., & Stern, R. S. (2000). Risk of developing a subsequent nonmelanoma skin cancer in patients with a history of nonmelanoma skin cancer: a critical review of the literature and meta-analysis. *Arch Dermatol*, 136(12), 1524-1530. <https://doi.org/10.1001/archderm.136.12.1524>

Marklund, S. (1980). Distribution of CuZn superoxide dismutase and Mn superoxide dismutase in human tissues and extracellular fluids. *Acta Physiol Scand Suppl*, 492, 19-23.

Martínez, N., Sánchez-Beato, M., Carnero, A., Moneo, V., Tercero, J. C., Fernández, I., . . . Piris, M. A. (2005). Transcriptional signature of Ecteinascidin 743 (Yondelis, Trabectedin) in human sarcoma cells explanted from chemo-naïve patients. *Mol Cancer Ther*, 4(5), 814-823. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-04-0316>

Martini, F. (2004). Fundamentals of Anatomy and Physiology. In. San Francisco, CA, USA: Benjamin - Cummings.

Matsui, M. S., Hsia, A., Miller, J. D., Hanneman, K., Scull, H., Cooper, K. D., & Baron, E. (2009). Non-sunscreen photoprotection: antioxidants add value to a sunscreen. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 14(1), 56-59. <https://doi.org/10.1038/jidsymp.2009.14>

Matsui, M. S., Hsia, A., Miller, J. D., Hanneman, K., Scull, H., Cooper, K. D., & Baron, E. (2009). Non-sunscreen photoprotection: antioxidants add value to a sunscreen. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 14(1), 56-59. <https://doi.org/10.1038/jidsymp.2009.14>

McCallion, R., & Li Wan Po, A. (1993). Dry and photo-aged skin: manifestations and management. *J Clin Pharm Ther*, 18(1), 15-32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.1993.tb00562.x>

McCormack, D., & McFadden, D. (2012). Pterostilbene and cancer: current review. *J Surg Res*, 173(2), e53-61. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.09.054>

- McSweeney, M., & Seetharaman, K. (2015). State of polyphenols in the drying process of fruits and vegetables. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 55(5), 660-669. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.670673>
- Meeran, S. M., & Katiyar, S. K. (2008). Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. *Front Biosci*, 13, 2191-2202. <https://doi.org/10.2741/2834>
- Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem*, 52, 711-760. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.003431>
- Morley, N., Clifford, T., Salter, L., Campbell, S., Gould, D., & Curnow, A. (2005). The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate and green tea can protect human cellular DNA from ultraviolet and visible radiation-induced damage. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 21(1), 15-22. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0781.2005.00119.x>
- Naik, P. P., & Desai, M. B. (2022). Basal Cell Carcinoma: A Narrative Review on Contemporary Diagnosis and Management. *Oncol Ther*, 10(2), 317-335. <https://doi.org/10.1007/s40487-022-00201-8>
- Nair, S., Li, W., & Kong, A. N. (2007). Natural dietary anti-cancer chemopreventive compounds: redox-mediated differential signaling mechanisms in cytoprotection of normal cells versus cytotoxicity in tumor cells. *Acta Pharmacol Sin*, 28(4), 459-472. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00549.x>
- Narayanan, D. L., Saladi, R. N., & Fox, J. L. (2010). Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol*, 49(9), 978-986. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2010.04474.x>
- Newman, P. J., Berndt, M. C., Gorski, J., White, G. C., Lyman, S., Paddock, C., & Muller, W. A. (1990). PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*, 247(4947), 1219-1222. <https://doi.org/10.1126/science.1690453>
- Nichols, J. A., & Katiyar, S. K. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res*, 302(2), 71-83. <https://doi.org/10.1007/s00403-009-1001-3>
- Nicolson, G. L. (2007). Metabolic syndrome and mitochondrial function: molecular replacement and antioxidant supplements to prevent membrane peroxidation

and restore mitochondrial function. *J Cell Biochem*, 100(6), 1352-1369. <https://doi.org/10.1002/jcb.21247>

Osinsky, S., Bubnovskaya, L., Ganusevich, I., Kovelskaya, A., Gumenyuk, L., Olijnichenko, G., & Merentsev, S. (2011). Hypoxia, tumour-associated macrophages, microvessel density, VEGF and matrix metalloproteinases in human gastric cancer: interaction and impact on survival. *Clin Transl Oncol*, 13(2), 133-138. <https://doi.org/10.1007/s12094-011-0630-0>

Ostrowski, S. M., & Fisher, D. E. (2021). Biology of Melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am*, 35(1), 29-56. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2020.08.010>

Ouyang, H., Hou, K., Peng, W., Liu, Z., & Deng, H. (2018). Antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of total polyphenols from onion. *Saudi J Biol Sci*, 25(7), 1509-1513. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.08.005>

Ozben, T. (2007). Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci*, 96(9), 2181-2196. <https://doi.org/10.1002/jps.20874>

Pandima Devi, K., Rajavel, T., Daglia, M., Nabavi, S. F., Bishayee, A., & Nabavi, S. M. (2017). Targeting miRNAs by polyphenols: Novel therapeutic strategy for cancer. *Semin Cancer Biol*, 46, 146-157. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.02.001>

Panieri, E., Telkoparan-Akillilar, P., & Saso, L. (2023). NRF2, a crucial modulator of skin cells protection against vitiligo, psoriasis, and cancer. *Biofactors*, 49(2), 228-250. <https://doi.org/10.1002/biof.1912>

Papageorgiou, C., Apalla, Z., Manoli, S. M., Lallas, K., Vakirlis, E., & Lallas, A. (2021). Melanoma: Staging and Follow-Up. *Dermatol Pract Concept*, 11(Suppl 1), e2021162S. <https://doi.org/10.5826/dpc.11S1a162S>

Pereira, M., Carreira, H., Vales, C., Rocha, V., Azevedo, A., & Lunet, N. (2012). Trends in hypertension prevalence (1990-2005) and mean blood pressure (1975-2005) in Portugal: a systematic review. *Blood Press*, 21(4), 220-226. <https://doi.org/10.3109/08037051.2012.666380>

Pereira, M., Peleteiro, B., Capewell, S., Bennett, K., Azevedo, A., & Lunet, N. (2012). Changing patterns of cardiovascular diseases and cancer mortality in Portugal, 1980-2010. *BMC Public Health*, 12, 1126. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-1126>

- Pervaiz, S., & Holme, A. L. (2009). Resveratrol: its biologic targets and functional activity. *Antioxid Redox Signal*, 11(11), 2851-2897. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2412>
- Pfeifer, G. P., & Besaratinia, A. (2012). UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochem Photobiol Sci*, 11(1), 90–97. <https://doi.org/10.1039/c1pp05144j>
- Pierce, B. A. (2012). Genetics: A conceptual approach . (W. H. Freeman., Ed. 7th ed.).
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouysegu, L. (2011). Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl*. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Quoc Trung, L., Espinoza, J. L., Takami, A., & Nakao, S. (2013). Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis in malignant NK cells via JAK2/STAT3 pathway inhibition. *PLoS One*, 8(1), e55183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055183>
- Qureshi, A. A., Laden, F., Colditz, G. A., & Hunter, D. J. (2008). Geographic variation and risk of skin cancer in US women. Differences between melanoma, squamous cell carcinoma, and basal cell carcinoma. *Arch Intern Med*, 168(5), 501-507. <https://doi.org/10.1001/archinte.168.5.501>
- Ray, P. D., Huang, B. W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*, 24(5), 981-990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
- Read, R. L., & Thompson, J. F. (2021). The role of regional chemotherapy for advanced limb melanoma in the era of potentially effective systemic therapies. *Melanoma Res*, 31(4), 290-297. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000740>
- Ribero, S., Stucci, L. S., Marra, E., Marconcini, R., Spagnolo, F., Orgiano, L., . . . Bataille, V. (2018). Effect of Age on Melanoma Risk, Prognosis and Treatment Response. *Acta Derm Venereol*, 98(7), 624-629. <https://doi.org/10.2340/00015555-2944>
- Rogiers, V. (1995). Transepidermal water loss measurements in patch test assessment: the need for standardisation. *Curr Probl Dermatol*, 23, 152-158. <https://doi.org/10.1159/000424310>

- Rogiers, V., & Group, E. (2001). EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14(2), 117-128. <https://doi.org/10.1159/000056341>
- Rotblat, B., Melino, G., & Knight, R. A. (2012). NRF2 and p53: Januses in cancer? *Oncotarget*, 3(11), 1272-1283. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.754>
- Roy, P., Nigam, N., Singh, M., George, J., Srivastava, S., Naqvi, H., & Shukla, Y. (2010). Tea polyphenols inhibit cyclooxygenase-2 expression and block activation of nuclear factor-kappa B and Akt in diethylnitrosoamine induced lung tumors in Swiss mice. *Invest New Drugs*, 28(4), 466-471. <https://doi.org/10.1007/s10637-009-9274-0>
- Ruiz, M. J., Fernández, M., Picó, Y., Mañes, J., Asensi, M., Carda, C., . . . Estrela, J. M. (2009). Dietary administration of high doses of pterostilbene and quercetin to mice is not toxic. *J Agric Food Chem*, 57(8), 3180-3186. <https://doi.org/10.1021/jf803579e>
- Sablina, A. A., Budanov, A. V., Ilyinskaya, G. V., Agapova, L. S., Kravchenko, J. E., & Chumakov, P. M. (2005). The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med*, 11(12), 1306-1313. <https://doi.org/10.1038/nm1320>
- Saeidnia, S., & Abdollahi, M. (2013). Antioxidants: friends or foe in prevention or treatment of cancer: the debate of the century. *Toxicol Appl Pharmacol*, 271(1), 49-63. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.05.004>
- Saginala, K., Barsouk, A., Aluru, J. S., & Rawla, P. (2021). Epidemiology of Melanoma. *Med Sci (Basel)*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/medsci9040063>
- Salminen, A., Kaarniranta, K., & Kauppinen, A. (2022). Photoaging: UV radiation-induced inflammation and immunosuppression accelerate the aging process in the skin. *Inflamm Res*, 71(7-8), 817-831. <https://doi.org/10.1007/s00011-022-01598-8>
- Sampieri, K., & Fodde, R. (2012). Cancer stem cells and metastasis. *Semin Cancer Biol*, 22(3), 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.03.002>
- Sandström, J., Nilsson, P., Karlsson, K., & Marklund, S. L. (1994). 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J Biol Chem*, 269(29), 19163-19166.
- Sarkar, S., Mazumder, S., Saha, S. J., & Bandyopadhyay, U. (2016). Management of Inflammation by Natural Polyphenols: A Comprehensive Mechanistic Update.

Curr Med Chem, 23(16), 1657-1695. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160418115540>

Saw, C. L., Yang, A. Y., Huang, M. T., Liu, Y., Lee, J. H., Khor, T. O., . . . Kong, A. N. (2014). Nrf2 null enhances UVB-induced skin inflammation and extracellular matrix damages. *Cell Biosci*, 4, 39. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-4-39>

Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*, 130(8S Suppl), 2073S-2085S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.8.2073S>

Schadendorf, D., van Akkooi, A. C. J., Berking, C., Griewank, K. G., Gutzmer, R., Hauschild, A., . . . Ugurel, S. (2018). Melanoma. *Lancet*, 392(10151), 971-984. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31559-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31559-9)

Schäfer, M., Dütsch, S., auf dem Keller, U., & Werner, S. (2010). Nrf2: a central regulator of UV protection in the epidermis. *Cell Cycle*, 9(15), 2917-2918. <https://doi.org/10.4161/cc.9.15.12701>

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

Schor, A. M., & Schor, S. L. (1983). Tumour angiogenesis. *J Pathol*, 141(3), 385-413. <https://doi.org/10.1002/path.1711410315>

Seiverling, E. V., Stevens, K., Dorr, G., Prentiss, M. A., Stoddard, H., Houk, L., . . . Ahrens, H. (2022). Impact of multimodal dermatoscopy training on skin biopsies by primary care providers. *J Am Acad Dermatol*, 87(5), 1119-1121. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2022.01.027>

Sharma, P., Montes de Oca, M. K., Alkeswani, A. R., McClees, S. F., Das, T., El-mets, C. A., & Afaq, F. (2018). Tea polyphenols for the prevention of UVB-induced skin cancer. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 34(1), 50-59. <https://doi.org/10.1111/phpp.12356>

Sharma, S. D., & Katiyar, S. K. (2010). Dietary grape seed proanthocyanidins inhibit UVB-induced cyclooxygenase-2 expression and other inflammatory mediators in UVB-exposed skin and skin tumors of SKH-1 hairless mice. *Pharm Res*, 27(6), 1092-1102. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0050-9>

- Shen, Z., Kauttu, T., Seppänen, H., Vainionpää, S., Ye, Y., Wang, S., . . . Puolakkainen, P. (2013). Both macrophages and hypoxia play critical role in regulating invasion of gastric cancer in vitro. *Acta Oncol*, 52(4), 852-860. <https://doi.org/10.3109/0284186X.2012.718444>
- Shin, D. W. (2020). Various biological effects of solar radiation on skin and their mechanisms: implications for phototherapy. *Anim Cells Syst (Seoul)*, 24(4), 181-188. <https://doi.org/10.1080/19768354.2020.1808528>
- Sies, H. (2010). Polyphenols and health: update and perspectives. *Arch Biochem Biophys*, 501(1), 2-5. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.04.006>
- Simonyi, A., Wang, Q., Miller, R. L., Yusof, M., Shelat, P. B., Sun, A. Y., & Sun, G. Y. (2005). Polyphenols in cerebral ischemia: novel targets for neuroprotection. *Mol Neurobiol*, 31(1-3), 135-147. <https://doi.org/10.1385/MN:31:1-3:135>
- Singh, S. S., Rai, S. N., Birla, H., Zahra, W., Rathore, A. S., & Singh, S. P. (2020). NF-κB-Mediated Neuroinflammation in Parkinson's Disease and Potential Therapeutic Effect of Polyphenols. *Neurotox Res*, 37(3), 491-507. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-00147-2>
- Sirerol, J. A., Feddi, F., Mena, S., Rodriguez, M. L., Sirera, P., Aupí, M., Pérez, S., Asensi, M., Ortega, A., & Estrela, J. M. (2015). Topical treatment with pterostilbene, a natural phytoalexin, effectively protects hairless mice against UVB radiation-induced skin damage and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med*, 85, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.027>
- Slemmer, J. E., Shacka, J. J., Sweeney, M. I., & Weber, J. T. (2008). Antioxidants and free radical scavengers for the treatment of stroke, traumatic brain injury and aging. *Curr Med Chem*, 15(4), 404-414. <https://doi.org/10.2174/092986708783497337>
- Sommer, L. (2005). Checkpoints of melanocyte stem cell development. *Sci STKE*, 2005(298), pe42. <https://doi.org/10.1126/stke.2982005pe42>
- Sonawane, S. K., & Chinnathambi, S. (2021). Epigallocatechin-3-gallate modulates Tau Post-translational modifications and cytoskeletal network. *Oncotarget*, 12(11), 1083-1099. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27963>
- Spearman, R. I. C. (1973). *The Integument: A Textbook of Skin Biology*. Cambridge University Press.

- Stang, A., Ziegler, S., Büchner, U., Ziegler, B., Jöckel, K. H., & Ziegler, V. (2007). Malignant melanoma and nonmelanoma skin cancers in Northrhine-Westphalia, Germany: a patient- vs. diagnosis-based incidence approach. *Int J Dermatol*, 46(6), 564-570. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2006.03056.x>
- Staples, M. P., Elwood, M., Burton, R. C., Williams, J. L., Marks, R., & Giles, G. G. (2006). Non-melanoma skin cancer in Australia: the 2002 national survey and trends since 1985. *Med J Aust*, 184(1), 6-10. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.2006.tb00086.x>
- Storniolo, C. E., Roselló-Catafau, J., Pintó, X., Mitjavila, M. T., & Moreno, J. J. (2014). Polyphenol fraction of extra virgin olive oil protects against endothelial dysfunction induced by high glucose and free fatty acids through modulation of nitric oxide and endothelin-1. *Redox Biol*, 2, 971-977. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.07.001>
- Struijk, L., Hall, L., van der Meijden, E., Wanningen, P., Bavinck, J. N., Neale, R., . . . Feltkamp, M. C. (2006). Markers of cutaneous human papillomavirus infection in individuals with tumor-free skin, actinic keratoses, and squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15(3), 529-535. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0747>
- Sun, E., Xu, H., Liu, Q., Zhou, J., Zuo, P., & Wang, J. (1995). The mechanism for the effect of selenium supplementation on immunity. *Biol Trace Elem Res*, 48(3), 231-238. <https://doi.org/10.1007/BF02789405>
- Surien, O., Masre, S. F., Basri, D. F., & Ghazali, A. R. (2022). Chemopreventive Effects of Oral Pterostilbene in Multistage Carcinogenesis of Skin Squamous Cell Carcinoma Mouse Model Induced by DMBA/TPA. *Biomedicines*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112743>
- Suthanthiran, M., Solomon, S. D., Williams, P. S., Rubin, A. L., Novogrodsky, A., & Stenzel, K. H. (1984). Hydroxyl radical scavengers inhibit human natural killer cell activity. *Nature*, 307(5948), 276-278. <https://doi.org/10.1038/307276a0>
- Suzuki, Y. J., Forman, H. J., & Sevanian, A. (1997). Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med*, 22(1-2), 269-285. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(96\)00275-4](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(96)00275-4)
- Syring, F., Weigmann, H. J., Schanzer, S., Meinke, M. C., Knorr, F., & Lademann, J. (2016). Investigation of Model Sunscreen Formulations Comparing the Sun Pro-

tection Factor, the Universal Sun Protection Factor and the Radical Formation Ratio. *Skin Pharmacol Physiol*, 29(1), 18-23. <https://doi.org/10.1159/000441037>

Tan, E. M., Freeman, R. G., & Stoughton, R. B. (1970). Action spectrum of ultraviolet light-induced damage to nuclear DNA in vivo. *J Invest Dermatol*, 55(6), 439-443. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12260585>

Teng, W. L., Huang, P. H., Wang, H. C., Tseng, C. H., & Yen, F. L. (2021). Pterostilbene Attenuates Particulate Matter-Induced Oxidative Stress, Inflammation and Aging in Keratinocytes. *Antioxidants (Basel)*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/antiox10101552>

Terashvili, M., Pratt, P. F., Gebremedhin, D., Narayanan, J., & Harder, D. R. (2006). Reactive oxygen species cerebral autoregulation in health and disease. *Pediatr Clin North Am*, 53(5), 1029-1037, xi. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2006.08.003>

Timár, J., & Ladányi, A. (2022). Molecular Pathology of Skin Melanoma: Epidemiology, Differential Diagnostics, Prognosis and Therapy Prediction. *Int J Mol Sci*, 23(10). <https://doi.org/10.3390/ijms23105384>

Tsai, M. L., Lai, C. S., Chang, Y. H., Chen, W. J., Ho, C. T., & Pan, M. H. (2012). Pterostilbene, a natural analogue of resveratrol, potently inhibits 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)/12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced mouse skin carcinogenesis. *Food Funct*, 3(11), 1185-1194. <https://doi.org/10.1039/c2fo30105a>

Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>

Turpaev, K. T. (2002). Reactive oxygen species and regulation of gene expression. *Biochemistry (Mosc)*, 67(3), 281-292. <https://doi.org/10.1023/a:1014819832003>

Uitto, J., Richard, G., & McGrath, J. A. (2007). Diseases of epidermal keratins and their linker proteins. *Exp Cell Res*, 313(10), 1995-2009. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.03.029>

Ursini, F., Maiorino, M., & Gregolin, C. (1985). The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta*, 839(1), 62-70. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(85\)90182-5](https://doi.org/10.1016/0304-4165(85)90182-5)

- Verma, S., Singh, A., Kumari, A., Tyagi, C., Goyal, S., Jamal, S., & Grover, A. (2017). Natural polyphenolic inhibitors against the antiapoptotic BCL-2. *J Recept Signal Transduct Res*, 37(4), 391-400. <https://doi.org/10.1080/10799893.2017.1298129>
- Viscardi, G., Tralongo, A. C., Massari, F., Lambertini, M., Mollica, V., Rizzo, A., . . . Ferrara, R. (2022). Comparative assessment of early mortality risk upon immune checkpoint inhibitors alone or in combination with other agents across solid malignancies: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*, 177, 175-185. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2022.09.031>
- Visioli, F., De La Lastra, C. A., Andres-Lacueva, C., Aviram, M., Calhau, C., Casano, A., . . . Edeas, M. (2011). Polyphenols and human health: a prospectus. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 51(6), 524-546. <https://doi.org/10.1080/10408391003698677>
- Wagstaff, W., Mwamba, R. N., Grullon, K., Armstrong, M., Zhao, P., Hendren-Santiago, B., . . . Haydon, R. C. (2022). Melanoma: Molecular genetics, metastasis, targeted therapies, immunotherapies, and therapeutic resistance. *Genes Dis*, 9(6), 1608-1623. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.04.004>
- Waldmann, T. A. (2018). Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028472>
- Walocko, F., Chelliah, P., Kolitz, E., Awerman, J., Nijhawan, R. I., & Srivastava, D. (2022). Basal cell carcinoma histopathologic upgrading and Mohs micrographic surgery: a single institution, retrospective review. *Arch Dermatol Res*, 314(7), 705-707. <https://doi.org/10.1007/s00403-021-02212-3>
- Wan, G., Nguyen, N., Liu, F., DeSimone, M. S., Leung, B. W., Rajeh, A., . . . Semenov, Y. R. (2022). Prediction of early-stage melanoma recurrence using clinical and histopathologic features. *NPJ Precis Oncol*, 6(1), 79. <https://doi.org/10.1038/s41698-022-00321-4>
- Warskulat, U., Reinen, A., Grether-Beck, S., Krutmann, J., & Häussinger, D. (2004). The osmolyte strategy of normal human keratinocytes in maintaining cell homeostasis. *J Invest Dermatol*, 123(3), 516-521. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23313.x>
- Weigelt, B., Peterse, J. L., & van 't Veer, L. J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*, 5(8), 591-602. <https://doi.org/10.1038/nrc1670>

- Weigelt, B., Peterse, J. L., & van 't Veer, L. J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*, 5(8), 591-602. <https://doi.org/10.1038/nrc1670>
- Welti, M., Dimitriou, F., Gutzmer, R., & Dummer, R. (2022). Triple Combination of Immune Checkpoint Inhibitors and BRAF/MEK Inhibitors in. *Cancers (Basel)*, 14(22). <https://doi.org/10.3390/cancers14225489>
- Werbowski-Ogilvie, T. E., & Bhatia, M. (2008). Pluripotent human stem cell lines: what we can learn about cancer initiation. *Trends Mol Med*, 14(8), 323-332. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.06.005>
- Williamson, G. (2013). Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Mol Nutr Food Res*, 57(1), 48-57. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200511>
- Winterbourn, C. C., & Hampton, M. B. (2008). Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med*, 45(5), 549-561. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004>
- Wölfle, U., Haarhaus, B., & Schempp, C. M. (2013). The photoprotective and antioxidative properties of luteolin are synergistically augmented by tocopherol and ubiquinone. *Planta Med*, 79(11), 963-965. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1328716>
- Wong, R., Geyer, S., Weninger, W., Guimberteau, J. C., & Wong, J. K. (2016). The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp Dermatol*, 25(2), 92-98. <https://doi.org/10.1111/exd.12832>
- Wyluda, E. J., Cheng, J., Schell, T. D., Haley, J. S., Mallon, C., Neves, R. I., . . . Drabick, J. J. (2015). Durable complete responses off all treatment in patients with metastatic malignant melanoma after sequential immunotherapy followed by a finite course of BRAF inhibitor therapy. *Cancer Biol Ther*, 16(5), 662-670. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1026507>
- Wysocki, A. B. (1999). Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. *Nurs Clin North Am*, 34(4), 777-797, v.
- Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., & Matar, C. (2018). The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/nu10111618>

Yu, R., Hebbar, V., Kim, D. W., Mandlekar, S., Pezzuto, J. M., & Kong, A. N. (2001). Resveratrol inhibits phorbol ester and UV-induced activator protein 1 activation by interfering with mitogen-activated protein kinase pathways. *Mol Pharmacol*, 60(1), 217-224. <https://doi.org/10.1124/mol.60.1.217>

Zhou, H., Beevers, C. S., & Huang, S. (2011). The targets of curcumin. *Curr Drug Targets*, 12(3), 332-347. <https://doi.org/10.2174/138945011794815356>

Zimniak, P. (2008). Detoxification reactions: relevance to aging. *Ageing Res Rev*, 7(4), 281-300. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2008.04.001>